

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 220**

51 Int. Cl.:

A61K 36/886	(2006.01)	A61K 9/08	(2006.01)
A61K 31/715	(2006.01)	A61K 9/19	(2006.01)
A61K 9/14	(2006.01)	A61K 31/736	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 37/02	(2006.01)		
A61P 37/04	(2006.01)		
C08B 37/04	(2006.01)		
C08L 5/00	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61K 45/06	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.01.2011 PCT/US2011/020402**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2012 WO12094010**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2011 E 11854913 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2661274**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de polisacáridos de áloe**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2020

73 Titular/es:
**BESPOKE BIOSCIENCE, LLC (100.0%)
14951 N. Dallas Parkway Suite 400
Dallas, TX 75254, US**

72 Inventor/es:
DANHOF, IVAN, E.

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 742 220 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

Composiciones y procedimientos de polisacáridos de áloe

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere en general al campo de los polisacáridos de áloe, y más particularmente, a composiciones de polisacáridos de áloe y al uso de tales composiciones como inmunomoduladores y para el tratamiento de diferentes tipos de cánceres.

Técnica antecedente

Sin limitar el alcance de la invención, sus antecedentes se describen en relación con las composiciones, los procedimientos de preparación y los usos terapéuticos de los polisacáridos de Aloe Vera.

10 La Patente de Estados Unidos No. 7,196,072 expedida a Pasco et al. (2007) describe una fracción de polisacárido soluble en agua compleja que tiene una potente actividad inmunoestimuladora aislada de Aloe vera. La fracción de polisacárido tiene un peso molecular aparente superior a 2 millones de daltons con glucosa, galactosa, manosa y arabinosa como sus componentes principales. La invención describe además
15 composiciones farmacéuticas que contienen la fracción de polisacárido instantánea, opcionalmente en combinación con portadores y/o excipientes farmacéuticos aceptables. Estas composiciones farmacéuticas se pueden usar para proporcionar inmunoestimulación a un individuo que necesita dicho tratamiento administrando a dicho individuo una cantidad eficaz de la composición.

20 La Patente de Estados Unidos No. 6,083,508 expedida a Avalos y Danhof (2000) describe un proceso para formar un producto de áloe solo a partir del residuo de hoja obtenido después de filetear las hojas de áloe que tienen un filete interno que se retira del mismo. De acuerdo con la patente '508, el residuo se transforma en una suspensión mediante molienda y el producto de áloe se genera a partir de la suspensión. Además, las etapas para preparar el producto de áloe comprenden limpiar una hoja de áloe antes de filetearla, separar la suspensión formada en un líquido y sólidos y tratar adicionalmente el líquido separado para eliminar los laxantes antes de
25 formar el producto de áloe. Además, también se puede realizar un proceso que incluya todas las etapas anteriores para formar el líquido.

30 La Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2006/0084629 (Needleman y Needleman, 2006) divulga una combinación de dos fracciones especializadas de cadena larga, de alto peso molecular, aisladas de Aloe Vera y Maitake TD para estimular la actividad del sistema inmunitario que comprende polisacáridos de alto peso molecular y cadena larga que activan la respuesta inmunitaria natural del cuerpo, provocando un aumento en la producción de macrófagos, células T, células B, células asesinas naturales, citocinas y anticuerpos. Estos polisacáridos de cadena larga junto con otros ingredientes activos pueden proporcionar un soporte adecuado del sistema inmunitario, evitando así enfermedades debilitantes como el cáncer, las enfermedades cardíacas y el envejecimiento.

35 La Patente de Estados Unidos No. 5,773,425 expedida a Carrington Laboratories, Inc. describe un proceso para formar un producto de áloe utilizando un Aloe vera líquido estabilizado como material de partida, que se precipita principalmente con etanol y luego es liofilizado.

Divulgación de la invención

40 La presente invención describe una composición de polisacárido de áloe y el uso de la composición como agente inmunomodulador y para el tratamiento de diferentes tipos de cánceres seleccionados de leucemias y linfomas, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de colon, enfermedades inmunitarias, particularmente neoplasias relacionadas con el sistema inmunitario.

45 La presente invención proporciona un procedimiento para preparar un polvo fino de un extracto de polimanano como producto final que comprende las etapas de: (i) pesar una cantidad específica de un polvo de áloe liofilizado como producto de partida, en el que la cantidad se corrige por un contenido de humedad, (ii) disolver el polvo de áloe liofilizado en agua desionizada para formar una solución, (iii) agregar un primer volumen de un disolvente alcohólico a la solución para formar una primera mezcla; en la que la proporción del disolvente alcohólico al agua desionizada es al menos 2,5:1, (iv) permitir que la primera mezcla se asiente durante al menos 8 horas, (v) extraer un volumen de una solución sobrenadante de la primera mezcla y agregar un segundo volumen del disolvente alcohólico al volumen de la solución sobrenadante para formar una segunda mezcla, (vi)
50 centrifugar la segunda mezcla, (vii) observar la presencia de un precipitado en la segunda mezcla, (viii) agregar un tercer volumen de disolvente alcohólico a la primera mezcla si se observa algún precipitado en la segunda mezcla, (viii) decantar el sobrenadante de la primera mezcla por sifón, en el que la decantación se realiza solo si no se observa precipitado en la segunda mezcla, (ix) filtrar el precipitado de la primera mezcla usando un papel de filtro y un embudo de succión al vacío, (x) recuperar el polvo del extracto de polimanano del embudo de
55 succión mediante raspado, (xi) colocar en un congelador el polvo del extracto de polimanano en un matraz de liofilización tapado durante al menos 8 horas, (xii) liofilizar el polvo congelado del extracto de polimanano en un

liofilizador y (xiii) moler el polvo liofilizado del extracto de polimanano en un molino hasta obtener una textura muy fina.

5 En un aspecto, el procedimiento comprende además la etapa de pesar, etiquetar y almacenar el polvo fino del extracto de polimanano en un recipiente. El producto de partida en polvo de áloe liofilizado como se describe en la realización de la presente invención se deriva de una especie de Aloe seleccionada del grupo que consiste en *Aloe vera*, *Aloe arborescens*, *Aloe aristata*, *Aloe dichotoma*, *Aloe nyeriensis*, *Aloe variegata*, *Aloe barbadensis* y *Aloe Wildii*. El producto de partida en polvo de áloe liofilizado usado en la presente invención comprende polisacáridos de áloe, en el que los polisacáridos de áloe comprenden uno o más polisacáridos de cadena pequeña, cadena mediana, cadena grande, cadena muy grande, o cualquier combinación de estos. En un aspecto específico, el disolvente alcohólico se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, alcohol isopropílico y propanol. En otro aspecto, los polisacáridos de áloe comprenden además azúcares simples, seleccionados del grupo que consiste en glucosa, manosa, arabinosa y galactosa y tienen un peso molecular que varía de 11.500 daltons a más de 10.000.000 de daltons.

15 En otro aspecto, el polvo de áloe liofilizado tiene al menos el 25 % de polisacáridos de áloe. En otro aspecto más, el polvo de áloe liofilizado tiene 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 95 % de polisacáridos de áloe. El polvo de áloe liofilizado como se describe en el procedimiento de la presente invención comprende al menos 14 % de polisacáridos de áloe que tienen un peso molecular de 66.000 daltons, al menos 9 % de polisacáridos de áloe que tienen un peso molecular de 480.000 daltons, al menos 3,5 % de polisacáridos de áloe que tienen un peso molecular de 1.000.000 de daltons, al menos 2,4 % de polisacáridos de áloe que tienen un peso molecular de 2.000.000 de daltons.

20 En un aspecto específico del procedimiento relacionado con la composición de polisacárido de áloe en el polvo de áloe liofilizado, aproximadamente 1,32 %-6,36 % de los polisacáridos de áloe tienen un peso molecular de 2.000.000 de daltons, 2,55 %-3,89 % tienen un peso molecular de 1.000.000, y 63,85 %-73,36 % de polisacáridos de áloe tienen un peso molecular de 480.000 daltons. En un aspecto, el polvo de áloe liofilizado puede contener una o más especies residuales de pequeño peso molecular, seleccionadas del grupo que consiste en glucosa, ácidos orgánicos, ácido láctico, ácidos málicos, ácidos cítricos y ácido aspártico. En otro aspecto, la una o más especies residuales de pequeño peso molecular están presentes en cantidades que oscilan entre el 14 %-24 %. En otro aspecto más, el polvo fino del extracto de polimanano se usa en la preparación de una composición farmacéutica para ser usado el tratamiento de una o más malignidades seleccionadas del grupo que consiste en leucemias y linfomas, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de colon y para el tratamiento de uno o más trastornos inmunitarios.

25 En otra realización, la presente invención divulga una formulación inyectable estéril de un extracto de polimanano que comprende: una cantidad especificada de extracto de polimanano muy fino disuelto en agua desionizada y uno o más conservantes farmacéuticos. El uno o más conservantes farmacéuticos que se pueden usar en la formulación descrita anteriormente en la presente memoria se seleccionan del grupo que consiste en parabenos, ácido benzoico y sus sales, mercuriales, sales de amonio cuaternario, alcohol bencílico y otros alcoholes relacionados y fenoles. En un aspecto específico, el conservante es el alcohol bencílico. En un aspecto, el extracto de polimanano comprende polisacáridos de áloe, en el que los polisacáridos de áloe comprenden uno o más polisacáridos de cadena pequeña, cadena mediana, cadena grande, cadena muy grande, o cualquiera de sus combinaciones. En otro aspecto, los polisacáridos de áloe comprenden además azúcares simples, seleccionados del grupo que consiste en glucosa, manosa, arabinosa y galactosa.

30 En otros aspectos específicos, los polisacáridos de áloe tienen un peso molecular que varía de 11.500 daltons a más de 10.000.000 de daltons y el extracto de polimanano tiene al menos 25 % de polisacáridos de áloe, en el que el extracto de polimanano tiene 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 95 % de polisacáridos de áloe. En un aspecto relacionado, el extracto de polimanano comprende al menos el 14 % de los polisacáridos de áloe que tienen un peso molecular de 66.000 daltons, al menos el 9 % tiene un peso molecular de 480.000 daltons, al menos el 3,5% tiene un peso molecular de 1.000.000 de daltons y al menos 2,4 % de polisacáridos de áloe que tienen un peso molecular de 2.000.000 de daltons. La composición de la presente invención se usa en el tratamiento de uno o más cánceres seleccionados del grupo que consiste en leucemias y linfomas, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de colon, para inmunomodulación, inmunoestimulación o para el tratamiento de un individuo con un sistema inmunitario comprometido o una enfermedad inmunitaria. La composición de la presente invención provoca un aumento del 75-80 % en una o más células asesinas naturales (NK).

35 En otra realización más, la presente invención describe un tratamiento para uno o más cánceres seleccionados del grupo que consiste en leucemias y linfomas, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de colon, que comprende las siguientes etapas: identificar un individuo que necesita tratamiento frente a uno o más cánceres e inyectar una formulación de extracto de polimanano inyectable estéril dos o tres veces en una semana en una dosificación suficiente para tratar el uno o más cánceres, en el que la formulación de extracto de polimanano inyectable estéril comprende una cantidad especificada de extracto de polimanano muy fino disuelto en agua desionizada; y uno o más conservantes farmacéuticos. El procedimiento comprende además las etapas de: extraer muestras de sangre del individuo a uno o más intervalos especificados y medir un nivel de una proteína caspasa 3 en la sangre y comparar el nivel obtenido con el nivel anterior a la inyección, en el que un nivel

aumentado en la caspasa 3 está directamente relacionado con un nivel aumentado de apoptosis de una o más células cancerosas.

En un aspecto, la dosificación de la formulación de extracto de polimanano inyectable estéril depende de un peso, una edad, un origen étnico y un género del individuo. En otro aspecto, el extracto de polimanano comprende polisacáridos de áloe, en el que los polisacáridos de áloe comprenden uno o más polisacáridos de cadena pequeña, cadena mediana, cadena grande, cadena muy grande, o cualquiera de sus combinaciones. En otro aspecto más, los polisacáridos de áloe tienen un peso molecular que varía entre 11.500 daltons a más de 10.000.000 de daltons. El extracto de polimanano como se describe en el procedimiento de la presente invención tiene al menos un 25 % de polisacáridos de áloe. El extracto de polimanano del procedimiento de la presente invención provoca un aumento del 75-80 % en una o más células asesinas naturales (NK).

En una realización, la presente invención divulga un procedimiento de inmunomodulación o inmunoestimulación en un individuo con un sistema inmunitario comprometido o una enfermedad inmunitaria que comprende las etapas de: (i) identificar al individuo con el sistema inmunitario comprometido o una enfermedad inmunitaria y que necesita inmunomodulación o inmunoestimulación, (ii) administrar intravenosamente una dosificación especificada de una formulación de extracto de polimanano inyectable estéril, en el que la formulación del extracto de polimanano inyectable estéril comprende una cantidad especificada de extracto de polimanano muy fino disuelto en agua desionizada; y uno o más conservantes farmacéuticos, en los que la dosificación de la formulación de extracto de polimanano inyectable estéril depende de un peso, una edad, un origen étnico y un género del individuo, (iii) extraer muestras de sangre del individuo en uno o más de los intervalos especificados, y medir un nivel de un factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en la sangre y comparar el nivel obtenido con el nivel previo a la inyección; en el que un nivel incrementado en el TNF α indica inmunomodulación o inmunoestimulación. En un aspecto específico, la enfermedad inmunitaria es una neoplasia relacionada con el sistema inmunitario. En un aspecto, el extracto de polimanano comprende polisacáridos de áloe, en el que los polisacáridos de áloe comprenden uno o más polisacáridos de cadena pequeña, cadena mediana, cadena grande, cadena muy grande, o cualquier combinación de estos. En otro aspecto, el extracto de polimanano causa un aumento del 75-80 % en una o más células asesinas naturales (NK). En otro aspecto más, el extracto de polimanano tiene al menos un 25 % de polisacáridos de áloe.

Descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de las características y ventajas de la presente invención, ahora se hace referencia a la descripción detallada de la invención junto con las figuras adjuntas y en las que:

La **figura 1** muestra un cromatograma de exclusión por tamaño de un polisacárido de áloe que muestra los tiempos de retención de las diferentes subunidades de glucosa y manosa;

La **figura 2** muestra el cromatograma de exclusión por tamaño de un polisacárido de áloe que muestra los picos correspondientes a las diferentes subunidades de glucosa y manosa;

La **figura 3** es el perfil de resonancia magnética nuclear de protones del extracto de polimanano de la presente invención;

La **figura 4A** es un cromatograma de HPLC que muestra las cantidades de polisacárido en cada grupo molecular de polisacárido en un concentrado de polisacárido de áloe precipitado con metanol;

La **figura 4B** es el perfil de resonancia magnética nuclear de protones de un concentrado de polisacárido de áloe precipitado con metanol;

La **figura 5A** es un cromatograma de HPLC que muestra las cantidades de polisacárido en cada grupo molecular de polisacárido en un concentrado de polisacárido de áloe precipitado con etanol;

La **figura 5B** es el perfil de resonancia magnética nuclear de protones de un concentrado de polisacárido de áloe precipitado con etanol;

La **figura 6A** es un cromatograma de HPLC que muestra las cantidades de polisacárido en cada grupo molecular de polisacárido en un concentrado de polisacárido de áloe precipitado con alcohol isopropílico;

La **figura 6B** es el perfil de resonancia magnética nuclear de protones de un concentrado de polisacárido de áloe precipitado con alcohol isopropílico;

La **figura 7A** es un cromatograma de HPLC que muestra las cantidades de polisacárido en cada grupo molecular de polisacárido en un concentrado de polisacárido de áloe precipitado con propanol; y

La **figura 7B** es el perfil de resonancia magnética nuclear de protones de un concentrado de polisacárido de áloe precipitado con propanol.

Descripción de la invención

Si bien la fabricación y el uso de diversas realizaciones de la presente invención se discuten en detalle a continuación, debe apreciarse que la presente invención proporciona muchos conceptos inventivos aplicables que pueden realizarse en una amplia variedad de contextos específicos. Las realizaciones específicas discutidas aquí son meramente ilustrativas de formas específicas de hacer y usar la invención y no delimitan el alcance de la invención.

Para facilitar la comprensión de la presente invención, se definen varios términos a continuación. Los términos definidos en la presente memoria tienen significados tal como los entiende comúnmente una persona con experiencia ordinaria en las áreas relevantes para la presente invención. Los términos como "un", "una" y "el/la" no pretenden referirse solo a una entidad singular, sino que incluyen la clase general de la cual se puede usar un ejemplo específico para ilustración. La terminología en la presente memoria se utiliza para describir realizaciones específicas de la invención, pero su uso no delimita la invención, excepto en lo que se describe en las reivindicaciones.

La presente invención describe un proceso para preparar un extracto de polimanano y el uso de dicho extracto en la forma de una inyección como un compuesto inmunoestimulador. La estimulación inmunitaria se evalúa utilizando macrófagos/monocitos de origen humano y el tipo de célula se evalúa para la secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).

En general, se considera que los polisacáridos de áloe son aquellas moléculas compuestas predominantemente de azúcares simples que contienen glucosa y manosa que tienen longitudes de cadenas de 10.000 daltons a aquellas con pesos moleculares de 10.000.000 de daltons. Cuanto mayor es el contenido de manosa y mayor es la longitud de la cadena, mayor es la actividad inmunomoduladora expresada por los polisacáridos. Las diferentes cadenas largas no ramificadas que comprenden estos polisacáridos de áloe se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1: Composiciones de polisacárido de áloe y acciones farmacológicas.

	# de residuos de azúcar	Peso Mol. (daltons)	Acciones farmacológicas
Polisacáridos de cadena pequeña	70-650	11.500-100.000	> Diabetes Inhibición de la tirosinasa (aclaramiento de la piel) Actividad antiinflamatoria (inhibición de Cox-2)
Polisacáridos de cadena mediana	1.500	250.000	Antioxidante Protege el corazón, pulmones (enfisema) y el sistema nervioso (parkinsonismo)
Polisacáridos de cadena grande	4.000-5.000	650.000	Antibacteriano Inducción de la curación
Polisacáridos muy grandes	8.000-9.000	2.000.000 - 10.000.000	- Actividad inmunomoduladora Estimulación de β -linfocitos con la elaboración de anticuerpos Nivel creciente de células asesinas naturales Liberación de grandes cantidades de TNF α para causar angiogénesis en heridas y promoción de la curación.

Los polisacáridos de áloe con pesos moleculares de 100.000 daltons o más se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2: Composiciones y pesos moleculares de polisacáridos de áloe que tienen pesos moleculares de 100.000 o más.

	Peso Mol. (daltons)	Componentes principales
Aloerida	2.000.000-10.000.000	Arabinosa, galactosa, glucosa, manosa
Acemanano	900.000-1.500.000	glucosa, manosa
Manapol	500.000-900.000	glucosa, manosa
Aloemanano	100.000-500.000	glucosa, manosa

5 El material precursor para el extracto de polimanano es descrito por los inventores en una patente anterior (Patente de Estados Unidos No. 6,083,508- Avalos y Danhof, 2000) titulada "Procedimiento de procesamiento de hojas de áloe". El certificado de análisis del material precursor del extracto de polimanano se presenta en la Tabla 3.

10 La figura 1 es un cromatograma de exclusión por tamaño de una preparación de polisacárido de áloe que muestra tiempos de retención de subunidades de glucosa y manosa de diversos tamaños. La figura 2 es un cromatograma de exclusión por tamaño de una preparación de polisacárido de áloe que identifica pesos moleculares que varían de 100 a 10.000.000 de daltons. La figura 3 es el perfil de resonancia magnética nuclear de protones del extracto de polimanano de la presente invención. La figura 3 muestra: (i) la ausencia de los conservantes estándar: benzoato de sodio y sorbato de potasio, (ii) la presencia de monohexosis más pequeñas, (iii) los picos de ácido isocítrico que indican que se empleó una metodología de hoja entera en el procesamiento del material crudo de áloe, (iv) la presencia de picos de ácido málico: un marcador primario de Aloe vera, (v) la presencia del pico de aloerida/acemanano en la porción de polisacárido del perfil que confirma la presencia de las grandes especies de polisacáridos, y (vi) están presentes los grupos acetilo confirmando la presencia de los glucomananos, polisacáridos parcialmente acetilados.

20 Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) de una preparación de áloe antes de la extracción de polimanano: Equipo: El sistema HPLC es una bomba Hitachi L-7100 y un automuestreador 7250 emparejado con un refractómetro diferencial Waters 410. La SEC es un gel Tosoh Biosep G6000 PWXL TSK de 30 cm x 7,8 mm que funciona en un calentador de columna a 70 °C. Los estándares de peso molecular son de Sigma: 2.000.000 de daltons, 1.000.000 de daltons, 480.000 daltons, 66.000 daltons y 180 daltons (glucosa). La fase móvil es agua desionizada con un caudal de 0,70 ml/min. El volumen de inyección es de 10 ul. El procedimiento de la SEC es descrito por Pugh et al. (2001).¹

Tabla 3: Certificado de análisis de material precursor de extracto de polimanano.

Parámetro	Intervalo Constituyente	Valor determinado	Evaluación
<u>Polvo:</u>			
Color:	Blanco a bronceado claro	Blanquecino	Cumple
Características:	Finamente granular	Finamente granular	Cumple
Reología:	Fluye libremente	Fluye libremente	Cumple
Gusto:	Salado	Salado	Cumple
Prueba de yodo:	Negativo	Negativo	Cumple
Humedad:	2,2-7,0 %	3,70 %	Cumple

ES 2 742 220 T3

(continuación)

Parámetro	Intervalo Constituyente	Valor determinado	Evaluación
Solubilidad:	Completo	Completo	Cumple
Minerales:			
Ca ⁺⁺	>25 mg/gramo	56,3 mg/gramo	Cumple
Mg ⁺⁺	>10 mg/gramo	14,3 mg/gramo	Cumple
Ácidos orgánicos:			
Cítrico:	Presente	Presente	Cumple
Isocítrico:	Presente	Presente	Cumple
Láctico:	<25 mg/gramo	12 ppm	Cumple
Málico:	>250 mg/gramo	410 mg/gramo	Cumple
Antraquinonas;			
Aloina A:	<0,05 ppm	0,02 ppm	Cumple
Aloina B:	<0,03 ppm	0,01 ppm	Cumple
Áloe-emodina	ppm	0,005 ppm	Cumple
Emodina:	<0,01 ppm	0,001 ppm	Cumple
Valor Brix:	<1,0	Negativo	Cumple

Tabla 4: Resultados de la SEC para la preparación de áloe antes de la extracción de polimanano.

Áloe					
#09116					
Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	∑ Área	% de Área	Tamaño molecular
0:30	0,0000	0,0000			
1:00	0,0000	0,0000			
1:30	0,0000	0,0000			
2:00	0,0000	0,0000			
2:30	0,0000	0,0000			

ES 2 742 220 T3

(continuación)

Áloe

#09116

Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	∑ Área	% de Área	Tamaño molecular
3:00	0,0000	0,0000			
3:30	0,0000	0,0000			
4:00	0,0000	0,0000			
4:30	0,0000	0,0000			
5:00	0,0000	0,0000			
5:30	0,0000	0,0000			
6:00	0,0000	0,0000			
6:30	0,0000	0,0000			
7:00	0,0000	0,0000			
7:30	0,0000	0,0000			
8:00	0,0000	0,0000			
8:30	0,0000	0,0000			
9:00	0,0000	0,0000			
9:30	0,0010	0,0014			
10:00	0,0020	0,0046			
10:30	0,0015	0,0058	0,012	2.44 %	2 X 10⁶
11:00	0,0010	0,0042			
11:30	0,0015	0,0039			
12:00	0,0015	0,0049			
12:30	0,0015	0,0049	0,018	3.69 %	1 X 10⁶
13:00	0,0015	0,0049			
13:30	0,0020	0,0056			
14:00	0,0020	0,0065			

ES 2 742 220 T3

(continuación)

<u>Áloe</u>					
#09116					
Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	∑ Área	% de Área	Tamaño molecular
14:30	0,0025	0,0072			
15:00	0,0030	0,0088			
15:30	0,0040	0,0111	0,044	9,09 %	4,80 X 10⁵
16:00	0,0050	0,0144			
16:30	0,0055	0,0169			
17:00	0,0060	0,0186			
17:30	0,0070	0,0209	0,071	14,59 %	6,6 X 10⁴
18:00	0,0080	0,0241			
18:30	0,0090	0,0274			
19:00	0,0110	0,0320			
19:30	0,0130	0,0385			
20:00	0,0155	0,0457			
20:30	0,0170	0,0524			
21:00	0,0240	0,0649			
21:30	0,0005	0,0457			
22:00	0,0004	0,0015			
22:30	0,0005	0,0014			
23:00	0,0004	0,0015			
23:30	0,0003	0,0012			
24:00	0,0000	0,0000	0,340	70,20 %	
	0,0000	0,4849		100,00 %	

Estudio de evaluación de precipitante de áloe: se pipetearon muestras de 25 ml de áloe concentrado COATS en vasos de precipitados de 200 ml y se añadieron al vaso de precipitados 125 ml de diversos líquidos precipitantes de polisacárido y se agitaron completamente. Los polisacáridos precipitados se recogieron por filtración a través de papeles de filtro deshidratados y tarados que, después de la filtración, se colocaron en el horno de secado

5 durante la noche. A la mañana siguiente se determinó el peso seco del polisacárido precipitado. Los inventores estudiaron cuatro precipitantes alcohólicos, incluyendo metanol, etanol, alcohol isopropílico y propanol. Los polvos se pasaron a través de un procedimiento de HPLC que determinó las diversas cantidades de todas las especies moleculares que se registraron con la determinación de las cantidades de polisacáridos en cada uno de los grupos moleculares de polisacáridos, incluyendo mayor que 2.000.000 de daltons, mayor que 1.000.000 de daltons, mayor que 480.000 daltons, mayor que 66.000 daltons, y la fracción residual que contiene las especies moleculares muy pequeñas, por ejemplo, glucosa que tiene un peso molecular de 180. (Los datos de HPLC se muestran en las Tablas 6-9). Los cromatogramas de HPLC correspondientes a los cuatro precipitantes metanol, etanol, alcohol isopropílico y propanol se muestran en las figuras 4A, 5A, 6A y 7A, respectivamente. También se obtuvieron perfiles de resonancia magnética nuclear de protones de los precipitados y se muestran en las figuras 4B, 5B, 6B y 7B. Los datos recopilados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Datos del estudio de evaluación de precipitantes de áloe.

Precipitante:	PM 2,0 x 10 ⁶	PM 1,0 x 10 ⁶	PM 4,8 x 10 ⁵	PM 6,6 x 10 ⁴	PM residual
METANOL	6,36%	3,89%	68,56%	6,92%	14,27%
ETANOL	2,52%	3,21%	70,70%	6,94%	16,57%
ALCOHOL ISOPROPÍLICO	1,32%	3,43%	73,36%	5,91%	15,99%
PROPANOL	2,74%	2,55%	63,85%	6,92%	23,94%

15 Tabla 6: Datos de HPLC que muestran las cantidades de polisacárido en cada grupo molecular de polisacárido en un concentrado de polisacárido de áloe precipitado con etanol.

<u>Áloe</u>					
#09423-A					
Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	Σ Área	% de Área	Tamaño molecular
0:30	0,0000	0,0000			
1:00	0,0000	0,0000			
1:30	0,0000	0,0000			
2:00	0,0000	0,0000			
2:30	0,0000	0,0000			
3:00	0,0000	0,0000			
3:30	0,0010	0,0014			
4:00	0,0010	0,0033			
4:30	0,0010	0,0033			
5:00	0,0005	0,0026			
5:30	0,0005	0,0016			

ES 2 742 220 T3

(continuación)

<u>Áloe</u>					
#09423-A					
Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	∑ Área	% de Área	Tamaño molecular
6:00	0,0005	0,0016			
6:30	0,0080	0,0119			
7:00	0,0030	0,0191	0,045	6,36%	2 X 10⁶
7:30	0,0020	0,0084			
8:00	0,0030	0,0079			
8:30	0,0040	0,0111	0,027	3,89%	1 X 10⁶
9:00	0,0060	0,0158			
9:30	0,0070	0,0209			
10:00	0,0090	0,0255			
10:30	0,0130	0,0348			
11:00	0,0180	0,0491			
11:30	0,0220	0,0640			
12:00	0,0250	0,0756			
12:30	0,0230	0,0785			
13:00	0,0170	0,0665			
13:30	0,0040	0,0374			
14:00	0,0050	0,0144	0,482	68,56%	4,80 X 10⁵
14:30	0,0050	0,0163			
15:00	0,0050	0,0163			
15:30	0,0050	0,0163	0,049	6,93%	6,6 X 10⁴
16:00	0,0060	0,0176			
16:30	0,0070	0,0209			
17:00	0,0050	0,0200			

(continuación)

<u>Áloe</u>					
#09423-A					
Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	∑ Área	% de Área	Tamaño molecular
17:30	0,0040	0,0149			
18:00	0,0030	0,0116			
18:30	0,0020	0,0084			
19:00	0,0010	0,0051			
19:30	0,0000	0,0019			
20:00	0,0000	0,0000			
20:30	0,0000	0,0000			
21:00	0,0000	0,0000			
21:30	0,0000	0,0000			
22:00	0,0000	0,0000			
22:30	0,0000	0,0000			
23:00	0,0000	0,0000			
23:30	0,0000	0,0000			
24:00	0,0000	0,0000	0,100	14,27%	
	0,0000	0,7036		100,00%	

Tabla 7: Datos de HPLC que muestran las cantidades de polisacárido en cada grupo molecular de polisacárido en un concentrado de polisacárido de áloe precipitado con etanol.

<u>Áloe</u>					
#09423-B					
Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	∑ Área	% Área	Tamaño molecular
0:30	0,0000	0,0000			
1:00	0,0000	0,0000			
1:30	0,0000	0,0000			

ES 2 742 220 T3

(continuación)

<u>Áloe</u>					
#09423-B					
Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	∑ Área	% Área	Tamaño molecular
2:00	0,0000	0,0000			
2:30	0,0000	0,0000			
3:00	0,0000	0,0000			
3:30	0,0000	0,0000			
4:00	0,0005	0,0007			
4:30	0,0010	0,0023			
5:00	0,0005	0,0026			
5:30	0,0005	0,0016			
6:00	0,0010	0,0023			
6:30	0,0010	0,0033			
7:00	0,0015	0,0039	0,017	2,52%	2 X 10⁶
7:30	0,0020	0,0056			
8:00	0,0020	0,0065			
8:30	0,0040	0,0093	0,021	3,21%	1 X 10⁶
9:00	0,0050	0,0144			
9:30	0,0070	0,0190			
10:00	0,0100	0,0269			
10:30	0,0130	0,0366			
11:00	0,0160	0,0464			
11:30	0,0200	0,0575			
12:00	0,0240	0,0705			
12:30	0,0210	0,0739			
13:00	0,0185	0,0648			

ES 2 742 220 T3

(continuación)

<u>Áloe</u>					
#09423-B					
Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	Σ Área	% Área	Tamaño molecular
13:30	0,0050	0,0416			
14:00	0,0060	0,0176	0,469	70,76%	4,80 X 10⁵
14:30	0,0050	0,0181			
15:00	0,0040	0,0149			
15:30	0,0040	0,0130	0,046	6,94%	6,6 X 10⁴
16:00	0,0050	0,0144			
16:30	0,0075	0,0197			
17:00	0,0080	0,0251			
17:30	0,0035	0,0198			
18:00	0,0025	0,0100			
18:30	0,0050	0,0116			
19:00	0,0000	0,0094			
19:30	0,0000	0,0000			
20:00	0,0000	0,0000			
20:30	0,0000	0,0000			
21:00	0,0000	0,0000			
21:30	0,0000	0,0000			
22:00	0,0000	0,0000			
22:30	0,0000	0,0000			
23:00	0,0000	0,0000			
23:30	0,0000	0,0000			
24:00	0,0000	0,0000	0,110	16,57%	
	0,0000	0,6630		100,00%	

ES 2 742 220 T3

Tabla 8: Datos de HPLC que muestran las cantidades de polisacárido en cada grupo molecular de polisacárido en un concentrado de polisacárido de áloe precipitado con alcohol isopropílico.

<u>Áloe</u>					
#09423-C					
Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	∑ Área	% Área	Tamaño molecular
0:30	0,0000	0,0000			
1:00	0,0000	0,0000			
1:30	0,0000	0,0000			
2:00	0,0000	0,0000			
2:30	0,0001	0,0001			
3:00	0,0000	0,0002			
3:30	0,0000	0,0000			
4:00	0,0000	0,0000			
4:30	0,0001	0,0001			
5:00	0,0001	0,0003			
5:30	0,0001	0,0003			
6:00	0,0001	0,0003			
6:30	0,0015	0,0023			
7:00	0,0015	0,0049	0,009	1,32%	2 X 10⁶
7:30	0,0020	0,0056			
8:00	0,0025	0,0072			
8:30	0,0035	0,0095	0,022	3,43%	1 X 10⁶
9:00	0,0060	0,0148			
9:30	0,0080	0,0223			
10:00	0,0095	0,0281			
10:30	0,0120	0,0343			
11:00	0,0165	0,0452			

ES 2 742 220 T3

(continuación)

<u>Áloe</u>					
#09423-C					
Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	∑ Área	% Área	Tamaño molecular
11:30	0,0190	0,0571			
12:00	0,0200	0,0631			
12:30	0,0215	0,0671			
13:00	0,0200	0,0678			
13:30	0,0100	0,0513			
14:00	0,0045	0,0249	0,476	73,36%	4,80 X 10⁵
14:30	0,0040	0,0139			
15:00	0,0035	0,0123			
15:30	0,0040	0,0121	0,038	5,91%	6,6 X 10⁴
16:00	0,0065	0,0164			
16:30	0,0096	0,0254			
17:00	0,0075	0,0283			
17:30	0,0030	0,0182			
18:00	0,0020	0,0084			
18:30	0,0010	0,0051			
19:00	0,0000	0,0019			
19:30	0,0000	0,0000			
20:00	0,0000	0,0000			
20:30	0,0000	0,0000			
21:00	0,0000	0,0000			
21:30	0,0000	0,0000			
22:00	0,0000	0,0000			
22:30	0,0000	0,0000			

(continuación)

<u>Áloe</u>					
#09423-C					
Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	∑ Área	% Área	Tamaño molecular
23:00	0,0000	0,0000			
23:30	0,0000	0,0000			
24:00	0,0000	0,0000	0,104	15,99%	
	0,0000	0,6487		100,00%	

Tabla 9: datos de HPLC que muestran las cantidades de polisacárido en cada grupo molecular de polisacárido en un concentrado de polisacárido de áloe precipitado con propanol.

<u>Áloe</u>					
#09423-C					
Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	∑ Área	% Área	Tamaño molecular
0:30	0,0000	0,0000			
1:00	0,0000	0,0000			
1:30	0,0000	0,0000			
2:00	0,0000	0,0000			
2:30	0,0001	0,0001			
3:00	0,0000	0,0002			
3:30	0,0000	0,0000			
4:00	0,0000	0,0000			
4:30	0,0001	0,0001			
5:00	0,0001	0,0003			
5:30	0,0001	0,0003			
6:00	0,0001	0,0003			
6:30	0,0015	0,0023			
7:00	0,0015	0,0049	0,009	1,32 %	2 X 10⁶

ES 2 742 220 T3

(continuación)

<u>Áloe</u>					
#09423-C					
Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	∑ Área	% Área	Tamaño molecular
7:30	0,0020	0,0056			
8:00	0,0025	0,0072			
8:30	0,0035	0,0095	0,022	3,43 %	1 X 10⁵
9:00	0,0060	0,0148			
9:30	0,0080	0,0223			
10:00	0,0095	0,0281			
10:30	0,0120	0,0343			
11:00	0,0165	0,0452			
11:30	0,0190	0,0571			
12:00	0,0200	0,0631			
12:30	0,0215	0,0671			
13:00	0,0200	0,0678			
13:30	0,0100	0,0513			
14:00	0,0045	0,0249	0,476	73,36 %	4,80 X 10⁵
14:30	0,0040	0,0139			
15:00	0,0035	0,0123			
15:30	0,0040	0,0121	0,038	5,91 %	6,6 X 10⁴
16:00	0,0065	0,0164			
16:30	0,0096	0,0254			
17:00	0,0075	0,0283			
17:30	0,0030	0,0182			
18:00	0,0020	0,0084			
18:30	0,0010	0,0051			

(continuación)

<u>Áloe</u>					
#09423-C					
Tiempo de retención	Índice de refracción	Área	∑ Área	% Área	Tamaño molecular
19:00	0,0000	0,0019			
19:30	0,0000	0,0000			
20:00	0,0000	0,0000			
20:30	0,0000	0,0000			
21:00	0,0000	0,0000			
21:30	0,0000	0,0000			
22:00	0,0000	0,0000			
22:30	0,0000	0,0000			
23:00	0,0000	0,0000			
23:30	0,0000	0,0000			
24:00	0,0000	0,0000	0,104	15,99 %	
	0,0000	0,6487		100,00 %	

5 El extracto de polimanano se prepara por precipitación. El polvo de áloe liofilizado descrito anteriormente se pesó después de corregir adecuadamente el contenido de humedad. Por ejemplo, si el contenido de humedad es 3,7 % y se necesitan 80 gramos, los inventores pesaron 82,96 gramos (80 g+(3,7 % x 80) g). El polvo de áloe pesado se disolvió completamente en un galón de agua desionizada (D.I) en un recipiente de precipitación de acero inoxidable. Se agregaron 2,5 galones de etanol al 95% y se agitó para asegurar la mezcla completa. El recipiente se cubrió con una tapa de acero inoxidable y la mezcla se dejó sedimentar durante la noche.

10 Al día siguiente, se tomaron 2 ml de sobrenadante transparente, se añadieron 5 ml de etanol al 95 % y la muestra se centrifugó a 3.000 rpm durante 20 minutos. La muestra se examinó para determinar la precipitación; si no se observó ningún precipitado, la precipitación se consideró completa. Si se observó algún grado significativo de precipitación, se añadió etanol al 95% adicional al recipiente de precipitación antes de proceder. El fluido sobrenadante transparente en el recipiente de precipitación se decantó por sifón sin alterar el precipitado en el fondo del recipiente. El precipitado blanco en el fondo se separó usando un embudo de succión (papel de filtro cuantitativo sin cenizas Whatman No. 42®). El material precipitado se eliminó raspándolo en un matraz de liofilización Virtis de 600 ml, y distribuyendo el material sobre un lado del matraz para formar una capa delgada con una gran área de superficie expuesta. El matraz de liofilización se colocó en un congelador de carcasa durante la noche. Al día siguiente, el matraz de liofilización enfriado con su contenido congelado se colocó en un liofilizador que funciona a -90 °C y 1/3 de atmósfera durante 24 horas. El liofilizador se apagó y el polvo liofilizado se colocó en un molino de polvo pequeño hasta que se redujo a un polvo fino molido uniformemente. El polvo molido se pesó y se colocó en pequeños recipientes de plástico y los recipientes se almacenaron en un congelador.

25 Preparación de una solución inyectable de extracto de polimanano: el polvo de extracto de polimanano (PME) preparado como se describe anteriormente se pesó (1,5 g) después de corregir el contenido de humedad y tenía un contenido de aloerida de al menos 2 % según lo determinado por cromatografía de exclusión de tamaño. A 125 ml de agua tibia desionizada se añadió 1 ml de HCl concentrado y se agitó, seguido de la adición lenta del

polvo de PME con agitación constante. La agitación continuó hasta que todo el polvo de PME se disolvió y la solución fue transparente e incolora, se añadió una cantidad adicional de HCl concentrado para obtener un pH de 1,6 a 1,7 (medido continuamente usando un medidor de pH). Se agregó agua desionizada adicional para ajustar el volumen a 150 ml seguido de un monitoreo de pH para asegurar un pH de 1,6-1,7. La solución de PME se vertió luego en un matraz de sistema de filtro Corning® de 150 ml con un tamaño de poro de 0,45 µm. El sistema de matraz se colocó en un refrigerador y el filtrado se transfirió a un matraz de sistema de filtro Corning® de 150 ml con un tamaño de poro de 0,22 µm y se colocó en un refrigerador durante la noche. Bajo condiciones estériles, la parte superior del filtro del sistema de filtro se retiró y la botella se selló con un tapón estéril. Las botellas se transfirieron a un laboratorio de compuestos y, bajo una campana estéril, se añadió alcohol bencílico al 0,9 % como conservante (porque el producto final es para uso en dosificaciones múltiples) y la solución se colocó en viales de vidrio estériles de 10 ml y se selló con un cierre para dosificaciones múltiples. Los viales están etiquetados con un número de lote, número de control, fecha de fabricación, fecha de vencimiento de 6 meses junto con los nombres del médico y el paciente.

Evaluación de la actividad inmunomoduladora de PME: La actividad inmunoestimuladora se evalúa utilizando macrófagos/monocitos de origen humano obtenidos de la American Type Culture Collection (ATCC) en Maryland. El tipo celular se evaluó para la secreción de TNF α . Bajo condiciones celulares estándar, se introdujo una pequeña cantidad del producto PME final en el cultivo. Se tomaron muestras a las 6, 12 y 24 horas y se evaluaron los niveles de TNF α . No se usó una cantidad específica de TNF α debido a la variabilidad en los diferentes lotes de células. En un entorno clínico, se espera que la respuesta inmunomoduladora varíe debido a los cambios en los factores hemotológicos, como el recuento total de leucocitos, el recuento diferencial de macrófagos/monocitos, el número de receptores de manosa en la superficie de las células blancas, la cantidad de proteína portadora que se enlaza a manosa, etc.

El perfil de los glóbulos blancos varía con las células que entran y salen constantemente del torrente sanguíneo. La afinidad de los receptores de manosa celular por el PME supera con creces la de la proteína que se enlaza a la manosa. A medida que los nuevos macrófagos/monocitos ingresan al torrente sanguíneo, el PME se transfiere a las nuevas células desde la proteína circulante que se enlaza a la manosa. El enlace de PME a la proteína de enlace a la manosa de macrófagos/monocitos da como resultado la liberación de una serie de citocomunicadores. Los citocomunicadores que incluyen TNF- α , IL-1 β , INF- γ , IL-2 e IL-6 restablecen a la normalidad la función de vigilancia deteriorada del sistema inmunitario que había fallado en su función de detección de neoplasmas en el paciente con cáncer permitiendo que el sistema inmunitario del paciente identifique y elimine las células malignas.

Los polisacáridos de aloe en el extracto de polimanano que tienen pesos moleculares de 1.000.000, 300.000, 100.000, 50.000 y 25.000 mostraron actividad de caspasa. Esta actividad de caspasa 3, caspasa 9 y citocromo-C es clave en el tratamiento de malignidades por la composición de la presente invención, ya que la caspasa 3 es un mediador de la apoptosis de células tumorales. Se ha demostrado que la actividad inmunitaria moduladora de la caspasa 3 iniciadora (apical) y la caspasa 3 efectora (ejecutadora), así como el citocromo-C, existe y se considera que es el sistema mediador de la apoptosis de las células tumorales.

Los inventores probaron la composición descrita en la presente memoria en 104 pacientes con diferentes tipos de cáncer. La leucemia y los linfomas fueron más sensibles al extracto de polimanano de la presente invención (> 98 %). Los cánceres de próstata, mama y colon también respondieron al extracto de polimanano de la presente invención. Para la prueba el extracto de polimanano fue administrado como una inyección. Se reconstituyeron 10 mg del extracto de polimanano en agua estéril para inyección para dar una concentración final de ~10 mg/ml. Esto se inyectó 2 a 3 veces por semana. Luego se tomaron muestras de suero de los pacientes a intervalos regulares y se monitoreó la actividad de la caspasa 3.

Se contempla que cualquier realización discutida en esta memoria descriptiva puede implementarse con respecto a cualquier procedimiento, kit, reactivo o composición de la invención, y viceversa. Además, las composiciones de la invención se pueden usar para conseguir los procedimientos de la invención. Se entenderá que las realizaciones particulares descritas en la presente memoria se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las características principales de la presente invención pueden emplearse en diversas realizaciones sin apartarse del alcance de la invención. Aquellas personas experimentadas en la técnica reconocerán, o podrán determinar utilizando no más que la experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en la presente memoria. Tales equivalentes se consideran dentro del alcance de la presente invención y están cubiertos por las reivindicaciones.

El uso de la palabra "un" o "uno/una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más" "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refieren solo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas y "y/o." A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el procedimiento empleado para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

5 Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y reivindicación o reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, como "comprender" y "comprende"), "tener" (y cualquier forma de tener, como "tener" y "tiene"), "incluyendo" (y cualquier forma de incluyendo, como "incluye" e "incluir") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, como "contiene" y "contener") son inclusivos o no concluyentes y no excluye elementos adicionales, no registrados o etapas del procedimiento.

10 El término "o combinaciones de estos" como se usa en la presente memoria se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C o combinaciones de estos" pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, como BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etc. La persona experimentada en la técnica entenderá que, por lo general, no existe un límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que el contexto indique lo contrario.

Referencias

15 United States Patent No. 7,196,072: High Molecular Weight Polysaccharide Fraction From Aloe Vera with Immunostimulatory Activity.

United States Patent No. 6,083,508: Method of Processing Aloe Leaves.

20 United States Patent Application No. 2006/0084629: Immune System Activating Formula Composed of Selected Long Chain Polysaccharides From Natural Sources. Pugh N., Ross S.A., ElSohly M.A., and Pasco, D.S. (2001). Characterization of Aloeride, a new high-molecular weight polysaccharide from Aloe vera with potent immunomodulatory activity. J Agr. Food Chem., 49, 1030-1034.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un polvo fino de un extracto de polimanano como producto final que comprende las etapas de:
- 5 pesar una cantidad especificada de un polvo de áloe liofilizado como producto de partida, en el que la cantidad se corrige por un contenido de humedad;
- disolver el polvo de áloe liofilizado en agua desionizada para formar una solución;
- agregar un primer volumen de un disolvente alcohólico a la solución para formar una primera mezcla; en el que la proporción de disolvente alcohólico al agua desionizada es al menos 2,5:1;
- permitir que la primera mezcla se asiente durante al menos 8 horas;
- 10 retirar un volumen de una solución sobrenadante a partir de la primera mezcla y agregar un segundo volumen del disolvente alcohólico al volumen de la solución sobrenadante para formar una segunda mezcla;
- centrifugar la segunda mezcla;
- observar la presencia de un precipitado en la segunda mezcla;
- 15 añadir un tercer volumen del disolvente alcohólico a la primera mezcla si se observa algún precipitado en la segunda mezcla;
- decantar el sobrenadante de la primera mezcla mediante sifón, en el que la decantación se realiza solo si no se observa precipitado en la segunda mezcla;
- 20 filtrar el precipitado a partir de la primera mezcla usando un papel de filtro y un embudo de succión al vacío;
- recuperar el polvo del extracto de polimanano del embudo de succión mediante raspado;
- colocar el polvo del extracto de polimanano en un matraz de liofilización con tapa en un congelador durante al menos 8 horas;
- liofilizar el polvo congelado del extracto de polimanano en un liofilizador; y
- 25 moler el polvo liofilizado del extracto de polimanano en un molino hasta obtener la textura deseada.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el producto de partida de polvo de áloe liofilizado se deriva de una especie de Aloe seleccionada del grupo que consiste en *Aloe vera*, *Aloe arborescens*, *Aloe aristata*, *Aloe dichotoma*, *Aloe nyriensis*, *Aloe variegata*, *Aloe barbadensis* y *Aloe Wildii*.
- 30 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el disolvente alcohólico se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, alcohol isopropílico y propanol.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el producto de partida de polvo de áloe liofilizado comprende polisacáridos de áloe que tienen un peso molecular que varía de 2.000.000 a 10.000.000 daltons.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el producto de partida de polvo de áloe liofilizado tiene al menos 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 95 % de polisacáridos de áloe.
- 35 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el producto de partida de polvo de áloe liofilizado comprende opcionalmente: al menos el 14 % de polisacáridos de áloe que tienen un peso molecular de 66.000 daltons; al menos el 9 % de polisacáridos de áloe que tienen un peso molecular de 480.000 daltons; al menos 3,5 % de polisacáridos de áloe que tienen un peso molecular de 1.000.000 de daltons; al menos 2,4 % de polisacáridos de áloe que tienen un peso molecular de 2.000.000 de daltons.
- 40 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad de polisacáridos de áloe que tiene un peso molecular de al menos uno de 2.000.000 de daltons en el producto de partida de polvo de áloe liofilizado varía de 1,32 %-6,36 %; un peso molecular de 1.000.000 de daltons en el polvo de áloe liofilizado varía de 2,55 %-3,89 %; un peso molecular de 480.000 daltons en el polvo de áloe liofilizado varía de 63,85 %-73,36 %; o en el que el polvo fino del extracto de polimanano se usa en la preparación de una composición farmacéutica.
- 45 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el producto de partida de polvo de áloe liofilizado puede contener una o más especies residuales de pequeño peso molecular, seleccionadas del grupo que consiste en azúcares simples, seleccionadas del grupo que consiste en glucosa, manosa, arabinosa y galactosa, ácidos orgánicos, ácido láctico, ácidos málicos, ácidos cítricos, ácido aspártico.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la una o más especies residuales de pequeño peso molecular están presentes en cantidades que varían del 14 %-24 %.
- 5 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el producto final de extracto de polimanano se usa para la preparación de una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una o más malignidades seleccionadas del grupo que consiste en leucemias y linfomas, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de colon, y para el tratamiento de uno o más trastornos inmunitarios, o que causa un aumento del 75-80 % en una o más células asesinas naturales (NK).
- 10 11. Un medicamento para su uso en el tratamiento de uno o más cánceres que se seleccionan del grupo que consiste en leucemias y linfomas, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de colon, que comprende las etapas de:
- identificar a un individuo que necesita tratamiento contra el uno o más cánceres; e
- 15 inyectar un extracto de polimanano de Aloe vera estéril inyectable obtenible por el procedimiento de la reivindicación 1 como producto final en una formulación dos o tres veces en una semana en una dosificación suficiente para tratar el uno o más cánceres, en el que la formulación de extracto de polimanano de Aloe vera inyectable estéril comprende una cantidad específica de extracto muy fino de polimanano de Aloe vera disuelto en agua desionizada; y uno o más conservantes farmacéuticos.
- 20 12. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 que comprende además las etapas de:
- extraer muestras de sangre del individuo a uno o más intervalos especificados; y
- medir un nivel de una proteína caspasa 3 en la sangre y comparar el nivel obtenido con el nivel previo a la inyección, en el que un nivel incrementado en caspasa 3 está directamente relacionado con un nivel aumentado de apoptosis de la una o más células cancerosas.
- 25 13. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la dosificación de la formulación de extracto de polimanano inyectable estéril depende de un peso, una edad, un origen étnico y un género del individuo.
- 30 14. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el extracto de polimanano comprende polisacáridos de áloe que tienen un peso molecular que varía de 2.000.000 a 10.000.000 de daltons.
15. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el extracto de polimanano tiene al menos 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 95 % de polisacáridos de áloe.
16. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el extracto de polimanano provoca un aumento del 75-80 % en una o más células asesinas naturales (NK).

FIG. 1

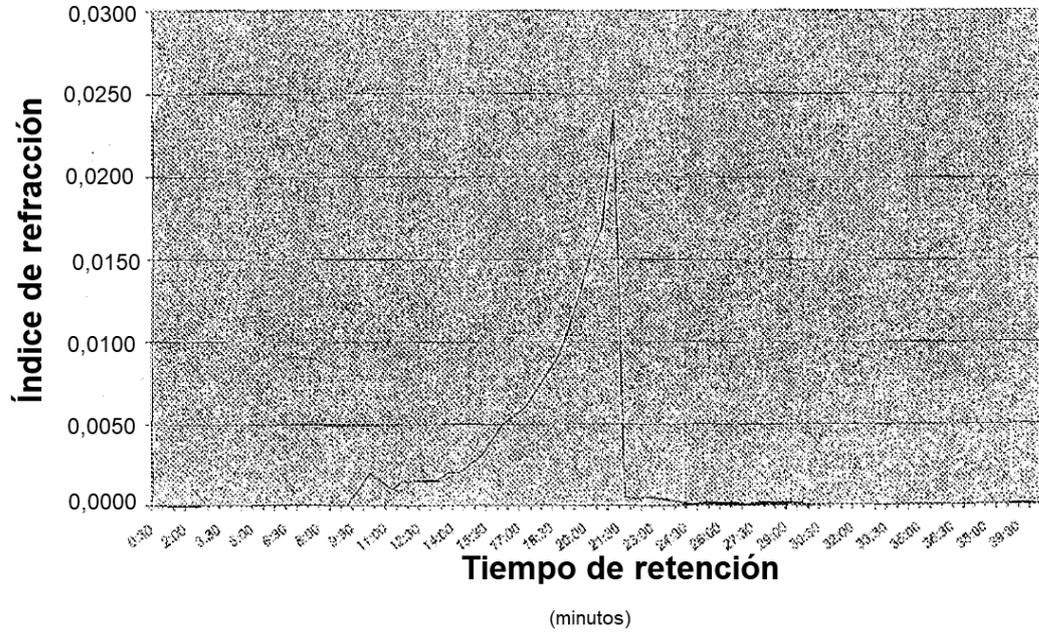


FIG. 2

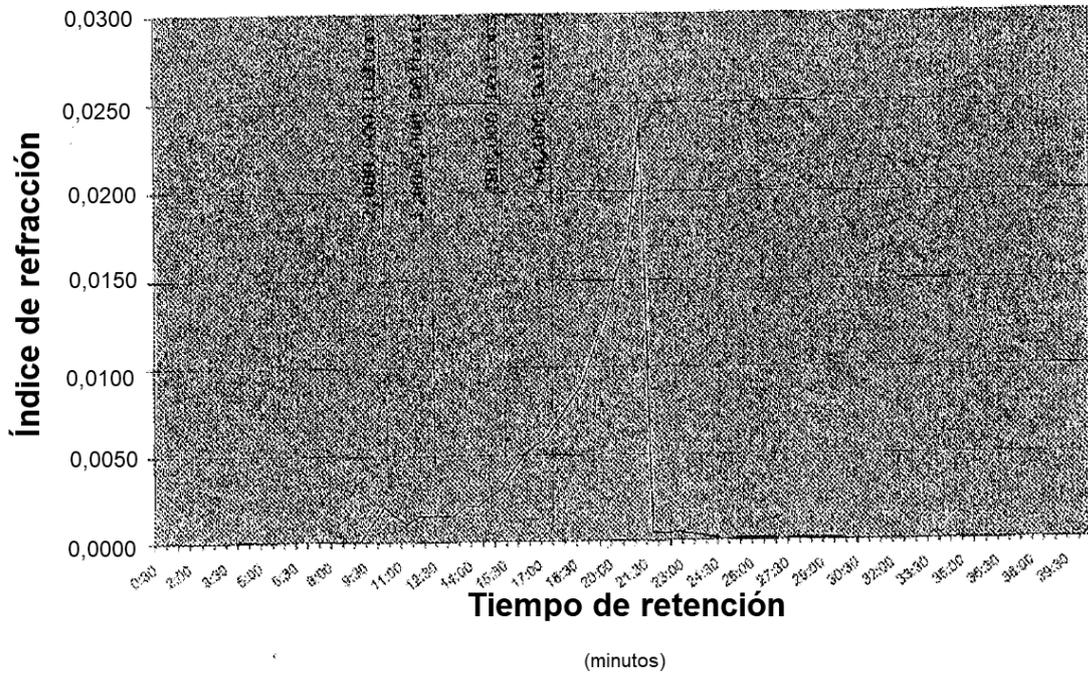


FIG. 4A

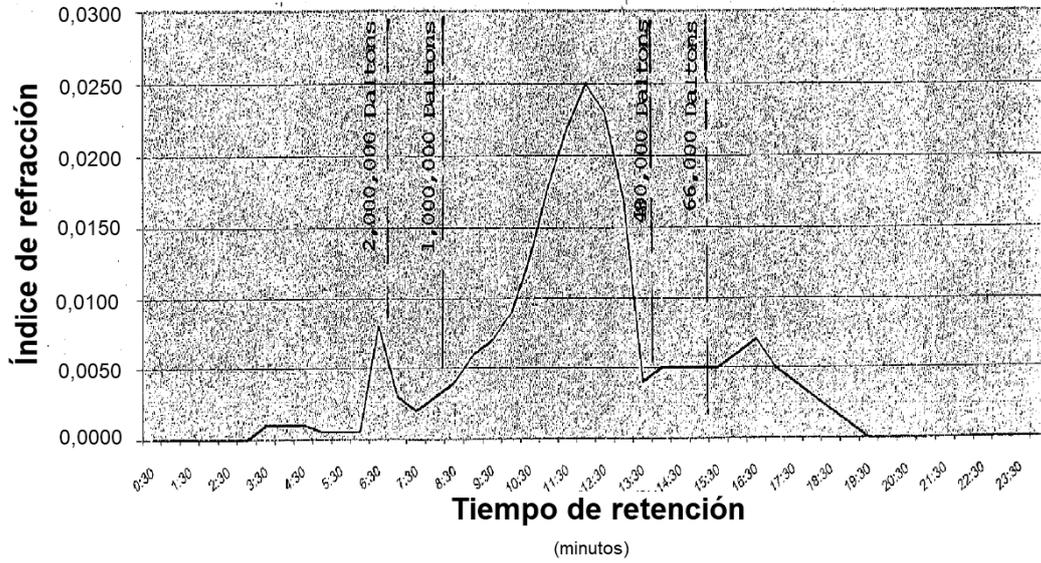


FIG. 4B

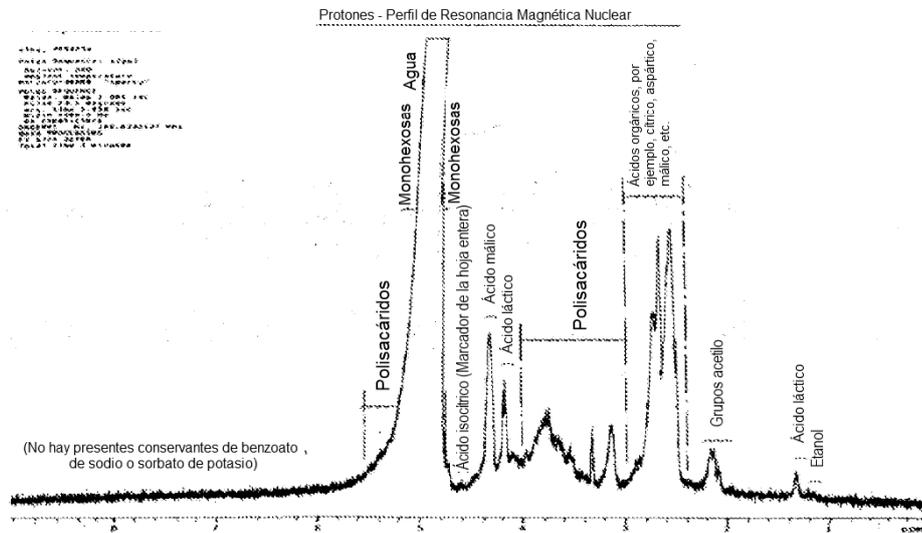


FIG. 5A

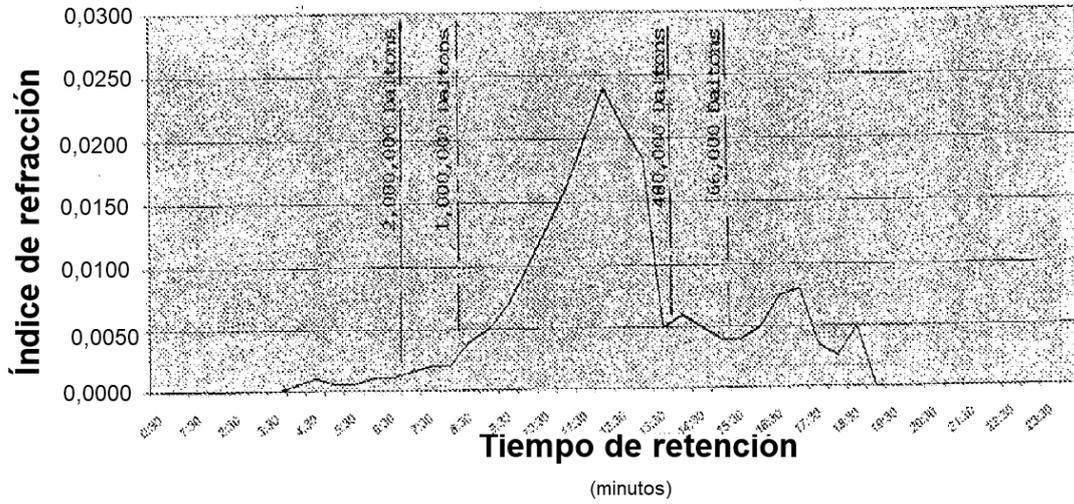


FIG. 5B

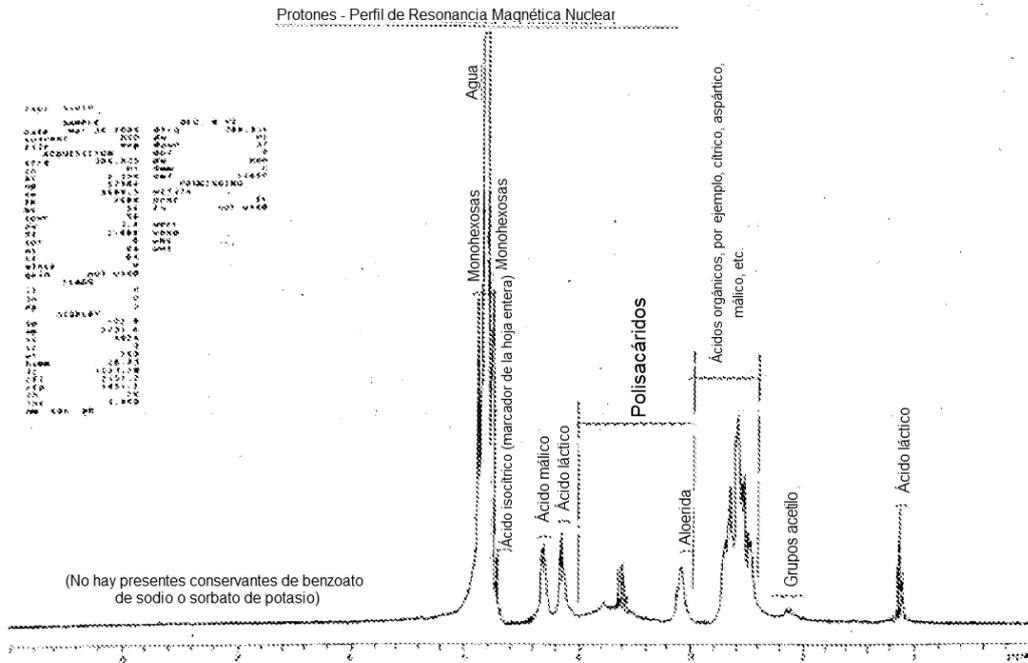


FIG. 6A

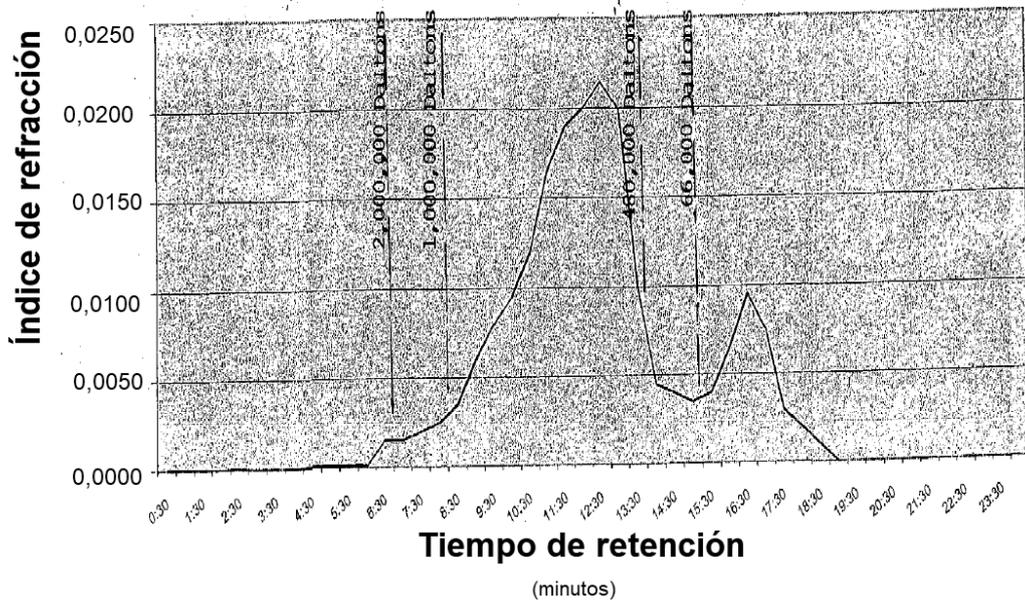


FIG. 6B

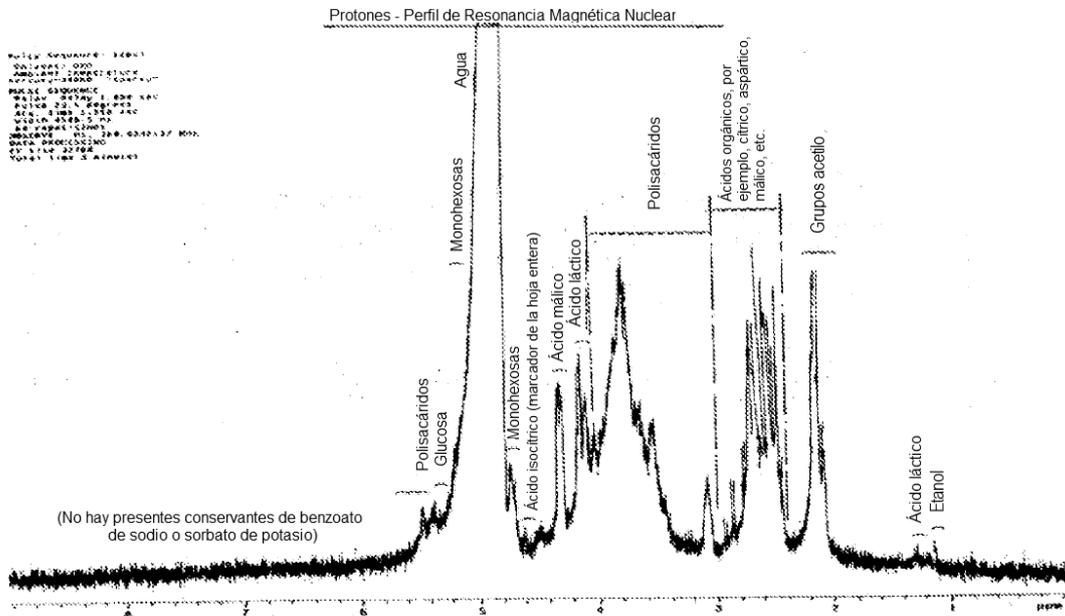


FIG. 7A

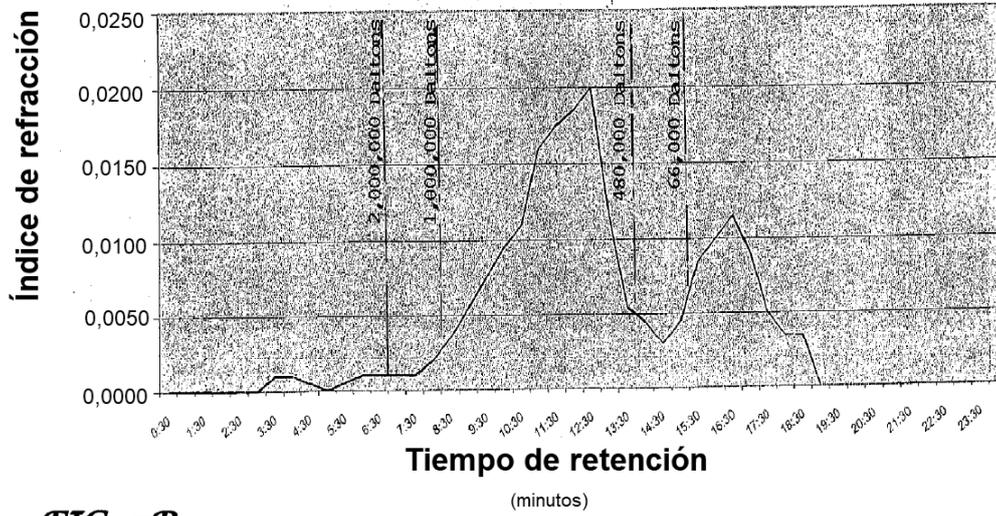


FIG. 7B

