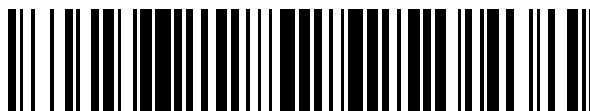


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 274**

51 Int. Cl.:

A61K 36/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2009 E 14176106 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2805725**

54 Título: **Extracto vegetal y su uso terapéutico**

30 Prioridad:

16.05.2008 GB 0808974

19.12.2008 CH 19982008

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

11.09.2020

73 Titular/es:

VIRIDIS PHARMACEUTICAL LIMITED (100.0%)

263 Main Street, P.O. Box 2196

Road Town Tortola, VG

72 Inventor/es:

KREUTER, MATTHIAS-HEINRICH

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ LÓPEZ-MENCHERO , Álvaro Luis

ES 2 782 274 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

Extracto vegetal y su uso terapéutico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un extracto vegetal y a su uso terapéutico.

10 **Antecedentes de la invención**

El documento WO 03/101479 A1 describe las valiosas propiedades terapéuticas de una composición que comprende varios componentes, típicamente administrados juntos por inyección intramuscular. La composición que se utilizó en los ejemplos comprende un extracto de manzanilla, aunque no se le atribuye actividad terapéutica directa; si no que, se describe como un antiirritante cuya presencia puede aliviar los efectos desagradables de la inyección per se.

15 El documento WO 2007/057651 A1 desvela un proceso para la eliminación de contaminantes solubles en agua que tienen grupos lipídicos, especialmente endotoxinas de composiciones acuosas de manzanilla.

20 En el documento WO 01/13929 A1 se describe un extracto biológicamente activo sustancialmente puro aislado de *Achillea millefolium*. Este extracto, preferentemente un extracto metanólico, tiene actividad antineoplásica y se usa como agente anticancerígeno.

25 P. Cernaj et al. en *Biologia Plantarum*, Mayo de 1983, vol. 25, n.º 3, 1983, páginas 221-224 divulgan un análisis de cromatografía de gas-líquido de diferentes partes de la inflorescencia de *Achillea millefolium*. La extracción se realizó con n-hexano. Se demostró la presencia de terpenoides y se encontraron diferencias en la composición entre extractos de diferentes partes de la inflorescencia.

30 En el documento WO 2008/146009 A1 se describen los efectos del aceite esencial de manzanilla o el aceite de semilla de comino negro o una mezcla de ambos aceites sobre la actividad de la 5-lipoxigenasa en la línea celular de granulocitos humanos HL 60 y sobre la síntesis de ADN en la línea celular de glioblastoma humano U87MG. En esta referencia también se describen los efectos de dichos aceites en la liberación de IL-6 en la línea celular de macrófagos humanos THP1 y en la síntesis de ADN en la célula de cáncer de próstata humana DU 145.

35 R. D. Loggia et al. en *Pharmacological Research Communications*, vol. 14, n.º 2, 1982, páginas 153-162 informan de los efectos depresivos de un extracto acuoso de *Chamomilla recutita* (L.) Rausch, flores tubulares, en el sistema nervioso central en ratones.

40 En el documento US 6 300 370 B1 se describe un proceso para fabricar aceite esencial de manzanilla. En este proceso, un residuo de extracción de manzanilla se somete a una destilación al vapor o a una destilación acuosa. Dicho residuo de extracción de manzanilla se obtiene mediante el tratamiento de flores y tallos de manzanilla con un disolvente acuoso u orgánico o una mezcla de los mismos, con o sin una destilación de vapor anterior del material de partida.

45 P. Vilagines, P. Delaveau y R. Vilagines "Inhibition de la replication du poliovirus par un extrait de *Matricaria chamomilla* (L.)", *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Serie III*, Tomo 301, N.º 6, 1985, páginas 289 a 294 describen el efecto de un extracto hidroalcohólico de *Matricaria chamomilla* L. sobre el crecimiento del virus de la poliomielitis de tipo 1. Cuando este extracto de manzanilla se agrega durante la etapa temprana del desarrollo del virus de la poliomielitis, luego dicho extracto inhibe la síntesis de ARN celular y vírico. Esta inhibición es parcialmente reversible.

50 **Objetos de la invención**

Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición para el tratamiento de una afección vírica y/o proliferativa anómala.

55 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar una composición para la sincronización y la detención de la fase S de células de mamífero proliferativas anómalas, especialmente de células cancerosas, en el cuerpo humano o animal.

Esta sincronización comprenderá la inducción de la ornitina descarboxilasa y/o la inhibición de la topoisomerasa II.

60 También es un objeto de la presente invención proporcionar una composición para el tratamiento de una afección proliferativa anómala en la que el tratamiento comprende la administración simultánea o secuencial de la presente composición y de al menos un agente antitumoral.

Estos objetos se obtienen con la presente invención.

65

Sumario de la invención

La invención se caracteriza por las características definidas en las reivindicaciones independientes.

5 Se definen realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes.

La presente composición también puede consistir en un extracto orgánico de al menos una planta *Chamomilla* y/o de al menos una planta de *Achillea* y de al menos un agente antitumoral, y ocasionalmente de al menos un agente auxiliar farmacéutico y/o dermatológico aceptable.

10 Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que un extracto de manzanilla, obtenido de las cabezas de las flores, tal como el descrito en el documento WO 2007/057651 A1, tiene valiosas propiedades terapéuticas. En particular, se ha descubierto que puede reducir la síntesis de ADN y ARN sin un efecto sustancial en la síntesis de proteínas, de la que se puede deducir la utilidad en el tratamiento del cáncer.

15 Aún más sorprendente, se ha descubierto que los extractos orgánicos de las flores tubulares de *Matricaria recutita* L. (Flores tubiformis) son adecuadas para la sincronización y la detención de la fase S de células de mamíferos proliferativas anómalas, especialmente de células cancerosas.

20 Esta sincronización tiene lugar debido a la inducción de la ornitina descarboxilasa (transferencia de fase G₀ a la fase G₁) y la inhibición de la topoisomerasa II (acumulación y detención en la fase S temprana).

También se descubrió que la inhibición de la topoisomerasa II era más de 100 veces más fuerte con un extracto orgánico que con un extracto acuoso (con respecto a la concentración para la inhibición completa de la enzima).

25 Debido al hecho de que la inhibición de la topoisomerasa II es crucial para la eficacia de la sincronización celular de los extractos orgánicos de las flores tubulares de *Matricaria recutita* L., (Flores tubiformis) de la presente invención son mucho más potentes que los extractos acuosos correspondientes.

30 Descripción de la invención

La invención se basa en datos obtenidos usando un extracto acuoso de manzanilla y en datos obtenidos usando extractos orgánicos, especialmente extractos alcohólicos, por ejemplo extractos etanólicos, de las flores tubulares de *Matricaria recutita* L., (Flores tubiformis). Los extractos acuosos sirven solo como ejemplos comparativos.

35 Las evidencias disponibles muestran que el extracto acuoso de manzanilla obtenido como se describe a continuación mantiene la biosíntesis de proteínas, mientras que la biosíntesis de ADN y ARN se reduce. Esta es una buena medida de las propiedades deseables de este extracto.

40 Los extractos acuosos y/u orgánicos pueden obtenerse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la materia. Los extractos se pueden obtener usando un medio acuoso y/u orgánico, especialmente un medio alcohólico, tal como un medio etanólico, y separado de otros componentes.

45 Un procedimiento preferido para la preparación de un extracto acuoso se describe en el documento WO 2007/057651 A1.

Preferentemente, la composición según la presente invención comprende además al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en recursos farmacéuticos, preferentemente seleccionados del grupo que consiste en agentes farmacéuticos y excipientes farmacéuticos.

50 El extracto acuoso puede someterse a un proceso de purificación. Dicho extracto comprende una mezcla de múltiples componentes de componentes solubles en agua. Se puede obtener añadiendo agua a la parte apropiada de la planta, para obtener una suspensión que generalmente se calienta a una temperatura inferior al punto de ebullición del agua, por ejemplo, 90-94 °C, y luego se enfrió a temperatura ambiente.

55 El extracto acuoso se somete luego a dos etapas de filtración. Solo con fines ilustrativos, éstas se describirán a continuación como microfiltración y ultrafiltración, respectivamente. Otras técnicas, tales como el uso de una barrera lipofílica, pueden ser adecuadas. Cada etapa de filtración puede realizarse en una, dos o más de dos etapas, si se desea.

60 La microfiltración se aplica para eliminar el material que de otra manera comprometería la eficacia de la etapa de ultrafiltración.

65 En la siguiente parte se describen posibles realizaciones de la presente invención. Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención.

El análisis de las endotoxinas bacterianas de las muestras obtenidas en los Ejemplos se realizó con el ensayo Cambrex PyroGene usando un factor de dilución de 1:10.000.

Ejemplos 1 y 2 (ejemplo comparativo)

5 Se mezclaron 45 g de flores de manzanilla tubulares amarillas (*Chamomilla recutita*) con 900 g de agua (Aqua purificata, Ph. Helv.). Esta mezcla se calentó a una temperatura entre 90 °C y 94 °C en 20 a 30 minutos. Posteriormente, la mezcla se almacenó a temperatura ambiente (15 °C a 25 °C) hasta que se alcanzó una temperatura entre 30 °C y 35 °C.

10 El resto del fármaco se eliminó por filtración en capa profunda. El filtrado bruto obtenido se aclaró por filtración a través de una membrana de 0,22 µm.

15 Al filtrado aclarado, se le añadió el 0,3 % (Ejemplo 1) o el 0,1 % (Ejemplo 2), con respecto a la masa del extracto, de aceite de ricino (Ph.Eur.). La mezcla obtenida se homogeneizó durante 5 minutos. Este extracto así preparado se filtró (en modo de flujo tangencial) con recuperación del retenido a través de una membrana de 0,22 µm.

20 El filtrado obtenido se filtró (en modo de flujo tangencial) con recuperación del retenido a través de una membrana de 0,1 µm. Por último, el filtrado obtenido se filtró (en modo de flujo tangencial) con recuperación del retenido a través de una membrana de 1000 kDa. Restos de endotoxinas bacterianas en cada filtrado final: < 100 UE/ml.

Ejemplos 3 a 5 (ejemplo comparativo)

25 Se repitió el ejemplo 1, salvo que, en lugar de aceite de ricino, al filtrado aclarado se le añadió el 0,3 % (Ejemplo 3), el 1,0 % (Ejemplo 4; VIP-E_Matr'06_1003) y el 3,0 % (Ejemplo 5), con respecto a la masa del extracto, de mygliol (Ph. Eur.).

Restos de endotoxinas bacterianas en cada filtrado final: < 100 UE/ml.

30 **Ejemplo 6** (ejemplo comparativo)

Este ejemplo usa un protocolo revisado, en el que se realizaron calentamiento y enfriamiento, no en un autoclave sino en un recipiente de doble capa de 10 litros bajo agitación (temperatura máxima del dispositivo de calentamiento de 140 °C).

35 Se añadió Mygliol en lugar de aceite de ricino. El mygliol era "Mygliol 812 para uso parenteral" de Hanseler. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, en lugar de homogeneización.

40 Las microfiltraciones de acuerdo con el proceso descrito anteriormente se realizaron todas con sistemas Millipore Pellicon 2. Para una mejor practicabilidad y evitar procedimientos de limpieza que requieren mucho tiempo, las microfiltraciones en este ejemplo se realizaron con el siguiente equipo:

Filtración	Sistema de filtro	Cartucho
Filtración de 0,2 µm	Millipore Pellicon 2	Durapore 0,2 µ, C-screen
Filtración de 0,1 µm	Filtro unidireccional	Millipack 200, 0,1 µm
Filtración de 1000 kDa	Millipore Pellicon 2	Biomax 1000 kDa, V-Screen
Filtración de 0,2 µm	Filtro unidireccional	Millipack 200, 0,2 µm

45 Además, se añadió fenol, para estabilizar el extracto. La cantidad de fenol añadido fue de 6,0-8,0 mg/ml. Se añadió después de la filtración de 1000 kDa. Después de la adición, la suspensión se agitó durante aproximadamente 10 minutos, hasta que todo el fenol se disolvió.

El nivel de endotoxina fue bajo en cada caso.

50 **Ejemplo 7** (Preparación de un extracto líquido ViP-E_Matr'08_1102)

55 100 g de flores tubulares de la inflorescencia de *Matricaria recutita* L. se extrajeron bajo agitación a una temperatura entre 40 °C y 60 °C durante 2 horas con 500 g de etanol al 80 % (m/m), correspondiente a una relación fármaco/disolvente de 1/5. Posteriormente, la preparación se sometió a una filtración en capa profunda usando un filtro de celulosa (AF 6 Filtrox®). Se obtuvieron 385 g de un extracto líquido claro de color marrón oscuro con un contenido sólido del 4,43 % (m/m).

Ejemplo 8 (Preparación de un extracto líquido ViP-E_Matr'08_1106)

100 g de flores tubulares de la inflorescencia de *Matricaria recutita* L. se extrajeron bajo agitación a una temperatura entre 40 °C y 60 °C durante 2 horas con 500 g de etanol al 90 % (m/m), correspondiente a una relación fármaco/disolvente de 1/5. Posteriormente, la preparación se sometió a una filtración en capa profunda usando un filtro de celulosa (AF 6 Filtrox®). Se obtuvieron 398 g de un extracto líquido claro de color marrón oscuro con un contenido sólido del 1,89 % (m/m).

Ejemplo 9 (Preparación de un extracto líquido ViP-E_Matr'08_1105)

100 g de flores tubulares de la inflorescencia de *Matricaria recutita* L. se extrajeron bajo agitación a una temperatura entre 40 °C y 60 °C durante 2 horas con 500 g de etanol al 99,9 % (m/m), correspondiente a una relación fármaco/disolvente de 1/5. Posteriormente, la preparación se sometió a una filtración en capa profunda usando un filtro de celulosa (AF 6 Filtrox®). Se obtuvieron 412 g de un extracto líquido claro de color marrón oscuro con un contenido sólido del 1,54 % (m/m).

Los siguientes ejemplos ilustran el perfil de actividad farmacológica de los extractos de los ejemplos 4, 7, 8 y 9.

Ejemplo 10 (ejemplo comparativo; Inducción de la expresión de ornitina descarboxilasa)

Con el extracto líquido ViP-E_Matr'06_1003 preparado según el ejemplo 4 se llevaron a cabo experimentos de expresión de ornitina descarboxilasa.

Para la medición de la inducción de la expresión de ornitina descarboxilasa, este extracto se añadió a las células HepG2 en concentraciones de 150, 100 o 30 µg/ml. Las células así tratadas se cultivaron durante 6 horas, 24 horas, o 48 horas en medio de cultivo FBS al 10 %.

Luego se determinó el cambio de la cantidad de la ornitina descarboxilasa por medio del análisis por transferencia de Western. Es obvio a partir de los datos mostrados en la Figura 9 que el extracto induce la expresión de ornitina descarboxilasa de una manera dependiente de la concentración.

Ejemplo 11 (ejemplo comparativo; Inhibición de la actividad topoisomerasa I)

Con el extracto líquido ViP-E_Matr'08_1102 preparado según el ejemplo 7 se llevaron a cabo experimentos de actividad de topoisomerasa I con concentraciones de extracto de 0,3, 1, 3, 10 o 30 µg/ml. Como control positivo se llevó camptotecina.

Para la medición de la inhibición de la actividad de topoisomerasa I, este extracto se añadió a la topoisomerasa I de ADN humano purificado y al "Kit de detección de fármacos Topoisomerasa I" de TopoGEN. De este modo, se procedió de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN se separó por electroforesis en un gel de agarosa y se visualizó bajo luz UV después de teñir con bromuro de etidio. Con este enfoque, el ADN relajado (topoisómeros) generado por la topoisomerasa I podría detectarse y separarse claramente del sustrato de ADN superenrollado. Es obvio a partir de los datos mostrados en la Figura 10 que el extracto inhibe la actividad de topoisomerasa I solo muy débil pero de una manera dependiente de la concentración.

Ejemplo 12 (Inhibición de la actividad de topoisomerasa II)

Con el extracto líquido ViP-E_Matr'08_1102, preparado de acuerdo con el ejemplo 7, el extracto líquido ViP-E_Matr'08_1106, preparado según el ejemplo 8, o el extracto líquido ViP-E_Matr'08_1105, preparado de acuerdo con el ejemplo 9, se llevaron a cabo experimentos de actividad de topoisomerasa II con concentraciones de extracto de 0,3, 1 o 3 µg/ml. Como control positivo se llevó etopósido.

La inhibición de la topoisomerasa II se determinó usando ADN humano purificado de topoisomerasa IIα y el "Kit de detección de fármacos Topoisomerasa II" de TopoGEN.

De este modo, se procedió de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN se separó por electroforesis en un gel de agarosa y se visualizó bajo luz UV después de teñir con bromuro de etidio. Con este enfoque, el ADN relajado (topoisómeros) generado por la topoisomerasa II podría detectarse y separarse claramente del sustrato de ADN superenrollado.

Es obvio a partir de los datos mostrados en la Figura 11 que todos los extractos de acuerdo con la presente invención inhiben fuertemente la actividad de topoisomerasa II de una manera dependiente de la concentración. El grado de inhibición aumenta claramente con el aumento de las concentraciones de etanol % m/m como disolvente de extracción (99 % > 90 % > 80 %). El extracto preparado con etanol al 99 % m/m mostró una inhibición prácticamente completa de la actividad enzimática incluso a una concentración tan baja como 300 ng/ml.

Esta inhibición fue más de 100 veces más fuerte que la inhibición obtenida con el extracto acuoso del ejemplo 4. Se necesitaron casi 150 µg/ml para la inhibición completa (datos no mostrados).

Ejemplo 13 (ejemplo comparativo; Inducción de la detención del ciclo celular en fase S)

5 Con el extracto líquido VIP-E_Matr'06_1003 preparado según el ejemplo 4 se llevaron a cabo experimentos de análisis del ciclo celular. Como control positivo para la detención del ciclo celular en la fase S, se usó camptotecina.

10 Para la medición de la inducción de la detención del ciclo celular, este extracto se añadió a las células HepG2 en concentraciones de 10, 50, 100 o 150 µg/ml. Las células así tratadas se cultivaron durante 48 horas en medio de cultivo FBS al 10 %.

15 Luego se determinó el cambio de la cantidad de células en fase G1, S o G2 del ciclo celular mediante el análisis de citometría celular.

Es obvio a partir de los datos mostrados en la Figura 12 que el extracto induce una fuerte detención del ciclo celular en la fase S ya después de 48 horas de incubación a concentraciones tan bajas como 10 µg/ml.

Ejemplo 14 (Preparación de un extracto resinoso)

20 A partir de un extracto líquido obtenido en analogía con el ejemplo 9, el disolvente se evaporó a presión reducida (300 a 10 mbar) y a temperatura ligeramente elevada (35 °C a 45 °C). Se obtuvieron 6,4 g de un extracto resinoso marrón oscuro con un contenido de material seco de > 99 % (m/m).

25 Se descubrió que el extracto resinoso obtenido estaba libre o casi libre de aceites esenciales (< 0,01 % m/m). Se descubrió que el contenido de etanol era < 0,05 % (m/m), y se descubrió que el contenido de agua era < 0,01 % (m/m).

Ejemplo 15 (Preparación de un extracto líquido sin agua)

30 A 6,4 g de un extracto líquido obtenido en analogía con el ejemplo 9 se añadieron 6,4 g de ácido oleico (Ph.Eur.) y 19,2 g de Macrogol 400 (Ph.Eur.).

35 El etanol se evaporó a presión reducida (300 a 10 mbar) y a temperatura ligeramente elevada (35 °C a 45 °C). Se obtuvieron 31,8 g de un extracto líquido de flujo libre marrón oscuro con un contenido de componentes no volátiles de > 99 % (m/m).

Se descubrió que el extracto líquido sin agua obtenido era libre o casi libre de aceites esenciales (< 0,01 % m/m). Se descubrió que el contenido de etanol era < 0,05 % (m/m), y se descubrió que el contenido de agua era < 0,01 % (m/m).

Ejemplo 16 (Preparación de un extracto líquido sin agua)

A 10 g del extracto resinoso obtenido en analogía con el ejemplo 14 se añadieron 10 g de ácido oleico (Ph.Eur.) y 20 g de Macrogol 400 (Ph.Eur.).

45 Esta mezcla se homogeneizó.

El extracto líquido sin agua así obtenido tenía un contenido de componentes no volátiles de > 99 % (m/m).

Ejemplo 17 (ejemplo comparativo)

50 Se mezclaron 20 g de flores de manzanilla tubulares amarillas (*Anthemis nobilis* L.) con 380 g de agua (Aqua purificata, Ph. Helv.). Esta mezcla se calentó a una temperatura entre 90 °C y 94 °C en 20 a 30 minutos. Posteriormente, la mezcla se almacenó a temperatura ambiente (22 °C) hasta que se alcanzó una temperatura de entre 30 °C y 35 °C.

55 El resto del fármaco se eliminó por filtración en capa profunda. El filtrado bruto obtenido se aclaró por filtración a través de una membrana de 0,22 µm.

Al filtrado aclarado, se añadió mygliol al 0,3 % (Ph. Eur.), con respecto a la masa del extracto. La mezcla obtenida se homogeneizó durante 5 minutos. Este extracto así preparado se filtró (en modo de flujo tangencial) con recuperación del retenido a través de una membrana de 0,22 µm.

60 El filtrado obtenido se filtró (en modo de flujo tangencial) con recuperación del retenido a través de una membrana de 0,1 µm. Por último, el filtrado obtenido se filtró (en modo de flujo tangencial) con recuperación del retenido a través de una membrana de 1000 kDa.

65 Se obtuvieron 309 g de un extracto acuoso claro con un contenido en material seco del 1,1 % en m/m.

Ejemplo 18 (ejemplo comparativo)

El mismo procedimiento que en el Ejemplo 17 pero se usaron 20 g de las cabezas de flores enteras de *Anthemis nobilis* L.

5

Se obtuvieron 295 g de un extracto acuoso claro con un contenido en material seco del 1,6 % en m/m.

Ejemplo 19 (ejemplo comparativo)

10 Se mezclaron 40 g de flores tubulares amarillas (*Achillea millefolium* L.) con 760 g de agua (Aqua purificata, Ph. Helv.). Esta mezcla se calentó a una temperatura entre 90 °C y 94 °C en 20 a 30 minutos. Posteriormente, la mezcla se almacenó a temperatura ambiente (22 °C) hasta que se alcanzó una temperatura de entre 30 °C y 35 °C.

15 El resto del fármaco se eliminó por filtración en capa profunda. El filtrado bruto obtenido se aclaró por filtración a través de una membrana de 0,22 µm.

20 Al filtrado aclarado, se añadió mygliol al 0,3 % (Ph. Eur.), con respecto a la masa del extracto. La mezcla obtenida se homogeneizó durante 5 minutos. Este extracto así preparado se filtró (en modo de flujo tangencial) con recuperación del retenido a través de una membrana de 0,22 µm.

El filtrado obtenido se filtró (en modo de flujo tangencial) con recuperación del retenido a través de una membrana de 0,1 µm. Por último, el filtrado obtenido se filtró (en modo de flujo tangencial) con recuperación del retenido a través de una membrana de 1000 kDa.

25 Se obtuvieron 667 g de un extracto acuoso claro con un contenido en material seco del 1,3 % en m/m.

Ejemplo 20 (ejemplo comparativo)

30 El mismo procedimiento que en el Ejemplo 19 pero se usaron 40 g de las cabezas de flores enteras de *Achillea millefolium* L.).

Se obtuvieron 634 g de un extracto acuoso claro con un contenido en material seco del 1,4 % en m/m.

Ejemplo 21

35

20 g de flores tubulares de la inflorescencia de *Anthemis nobilis* L. se extrajeron bajo agitación a una temperatura entre 40 °C y 60 °C durante 2 horas con 100 g de etanol al 99,9 % (m/m), correspondiente a una relación fármaco/disolvente de 1/5. Posteriormente, la preparación se sometió a una filtración en capa profunda usando un filtro de celulosa (AF 6 Filtrox®). Se obtuvieron 71 g de un extracto líquido claro de color marrón oscuro con un contenido sólido del 1,62 % (m/m).

40

Ejemplo 22

45 40 g de flores tubulares de la inflorescencia de *Achillea millefolium* L. se extrajeron bajo agitación a una temperatura entre 40 °C y 60 °C durante 2 horas con 200 g de etanol al 99,9 % (m/m), correspondiente a una relación fármaco/disolvente de 1/5. Posteriormente, la preparación se sometió a una filtración en capa profunda usando un filtro de celulosa (AF 6 Filtrox®). Se obtuvieron 153 g de un extracto líquido claro de color marrón oscuro con un contenido sólido del 1,62 % (m/m).

50 **Ejemplo 23** (Síntesis de ADN (Ensayo de incorporación de BrdU))

El extracto líquido según el Ejemplo 21 se examinó por su capacidad para inhibir la síntesis de ADN en células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) *in vitro*.

55 Para determinar la proliferación celular, el ADN recién sintetizado se cuantificó utilizando el kit de marcado y detección de 5-bromo-2'-desoxi-uridina (BrdU) III (Roche Applied Science; Mannheim, Alemania). BrdU es un análogo de timidina que se incorporaría al nuevo ADN celular. [Véase: Gratzner, H. G. (1982) Science 218, 474-475].

60 En resumen, las células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) se recogieron por tripsinización y se sembraron a 10.000 células/pocillo en microplacas de 96 pocillos. Después de 24 horas de preincubación a 37 °C y CO₂ al 5 %, las células se trataron con el extracto líquido de acuerdo con el Ejemplo 21 a las siguientes concentraciones durante 30 horas: 0, 1, 3, 10 y 100 µg/ml.

65 Luego se añadieron 10 µl de BrdU (100 µM) a las células y se incubaron adicionalmente durante 18 horas. Después de la incubación, las células se lavaron 3 veces con medios de cultivo para eliminar el exceso de BrdU antes de fijarlas con etanol. Antes de la incubación con el anticuerpo anti-BrdU, marcado con peroxidasa (POD), el ADN se digirió

parcialmente con nucleasas para permitir que el anticuerpo acceda a la BrdU incorporada. Después de lavar el exceso de anticuerpo, se añadió el sustrato POD ABTS. POD cataliza la escisión de ABTS, produciendo un producto de reacción coloreado. La absorbancia del producto de reacción se midió a 405 nm (longitud de onda de referencia a 490 nm) con un lector de microplacas multifuncional Safire (Tecan, Mannedorf, Suiza). La absorbancia medida por pocillo se correlaciona directamente con el nivel de BrdU incorporado en el ADN celular.

Los puntos de muestra se midieron por triplicado; los errores se expresaron como desviación estándar (datos no mostrados).

Los datos de las muestras se expresaron como un porcentaje de los valores de control del disolvente, y los valores de Cl_{50} se calcularon usando GraphPad Software Inc (Prism, versión 5, San Diego, CA. EE.UU.).

Resultados

Los resultados mostraron que el extracto líquido de acuerdo con el Ejemplo 21 tenía un valor de Cl_{50} de aproximadamente 7 $\mu\text{g/ml}$ (6,228 a 7,881 $\mu\text{g/ml}$). Por lo tanto, dicho extracto líquido inhibió el crecimiento de células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) de una manera dependiente de la dosis.

Las composiciones de acuerdo con la invención pueden formularse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Se deben usar componentes farmacéuticamente aceptables.

La administración es preferentemente por inyección intravenosa o, más preferentemente, por inyección intramuscular.

La composición farmacéutica que contiene el principio activo puede estar en forma adecuada para su uso oral.

El uso terapéutico implica el tratamiento (y posiblemente también la prevención) del cáncer, por ejemplo cáncer de pulmón, cáncer de hígado y cáncer de páncreas. Otros usos incluyen afecciones tópicas como la psoriasis, esclerodermia y pénfigo, bronquitis infecciosa, cánceres que incluyen sarcomas (como el sarcoma de Kaposi), leucemia, cáncer de piel y carcinomas cuyo tratamiento se ilustra específicamente a continuación, así como el SIDA. De forma más general, la composición puede usarse para terapia de afecciones proliferativas y víricas, especialmente aquellas asociadas con los virus de ADN o ARN. La acción sobre los virus de ARN puede ser directa, mientras que la acción sobre los virus de ADN y el cáncer al menos puede ser progresiva. El medicamento también puede ser útil en la terapia de otros trastornos genéticos, como las enfermedades de las neuronas motoras y la esclerosis múltiple.

El medicamento también se puede usar para tratar otras afecciones víricas. Por ejemplo, el virus puede ser un coronavirus, como en el caso del SARS (síndrome respiratorio agudo severo). Adicionalmente, el medicamento puede tener utilidad en medicina veterinaria, por ejemplo, en enfermedades de las aves como la enfermedad de Newcastle y la viruela aviar.

El siguiente estudio ilustra aspectos adicionales obtenidos con el extracto según el ejemplo 4 (un ejemplo comparativo).

En la siguiente parte se da una breve descripción de las Figuras:

La Figura 1 se refiere al Sistema 4 y muestra el efecto del extracto según el ejemplo 4 sobre la síntesis de ADN (A), en la síntesis de ARN (B) y en la síntesis de proteínas (C) en células HepG2. Las concentraciones de extracto utilizadas son 150, 500 y 1660 $\mu\text{g/ml}$.

La Figura 2 está en analogía con la Figura 1, pero las concentraciones de extracto utilizadas son 10, 50, 100 y 150 $\mu\text{g/ml}$.

La Figura 3 se refiere al Sistema 4 y muestra el efecto del extracto según el ejemplo 4 sobre la síntesis de ARN (A) y la biosíntesis de proteínas (B), calculado considerando los resultados mostrados en la Figura 2 (A).

La Figura 4 se refiere al Sistema 4 y muestra el efecto del extracto según el ejemplo 4 sobre la síntesis de ADN (A), en la síntesis de ARN (B) y en la síntesis de proteínas (C) en células HT1376. Las concentraciones de extracto utilizadas son 150, 500 y 1660 $\mu\text{g/ml}$.

La Figura 5 se refiere al Sistema 4 y muestra el efecto del extracto según el ejemplo 4 sobre la síntesis de ADN (A), en la síntesis de ARN (B) y en la síntesis de proteínas (C) en células C33-A. Las concentraciones de extracto utilizadas son 150, 500 y 1660 $\mu\text{g/ml}$.

La Figura 6 se refiere al Sistema 5 y muestra el efecto del extracto según el ejemplo 4 sobre la inducción de la apoptosis en células HepG2 después de 24 horas. Las concentraciones de extracto utilizadas son 10, 50, 100, 150 y 300 $\mu\text{g/ml}$.

La Figura 7 se refiere al Sistema 5 y muestra el efecto del extracto según el ejemplo 4 sobre la citotoxicidad (integridad de la membrana) en células HepG2 después de 24 horas. Las concentraciones de extracto utilizadas son 10, 50, 100, 150 y 300 $\mu\text{g/ml}$.

La Figura 8 se refiere al Sistema 5 y muestra el efecto del extracto según el ejemplo 4 sobre la inducción de la apoptosis en células HepG2 después de 48 horas. Las concentraciones de extracto utilizadas son 10, 50, 100, 150 y 300 $\mu\text{g/ml}$.

La Figura 9 se refiere al ejemplo 10 y muestra el efecto del extracto según el ejemplo 4 sobre la inducción de la

expresión de ornitina descarboxilasa en células HepG2 después de 6, 24 y 48 horas. Las concentraciones de extracto utilizadas son 30, 100 y 150 µg/ml.

La Figura 10 se refiere al ejemplo 11 y muestra el efecto del extracto según el ejemplo 7 sobre la inhibición de la topoisomerasa I en un ensayo sin células. Las concentraciones de extracto utilizadas son 0,3, 1, 3, 10 y 30 µg/ml. Como control positivo se utilizó camptotecina.

La Figura 11 se refiere al ejemplo 12 y muestra el efecto de los extractos de acuerdo con los ejemplos 7, 8 y 9 sobre la inhibición de la topoisomerasa II en un ensayo sin células. Las concentraciones de extracto utilizadas son 0,3, 1 y 3 µg/ml. Como control positivo se utilizó etopósido.

La Figura 12 se refiere al ejemplo 13 y muestra el efecto del extracto según el ejemplo 4 sobre la inducción de la detención del ciclo celular en fase S en células HepG2. Las concentraciones de extracto utilizadas son 10, 50, 100 y 150 µg/ml. Como control positivo se utilizó camptotecina.

La Figura 13 se refiere al ejemplo 12 y muestra el efecto del extracto según el ejemplo 7 sobre la inhibición de la topoisomerasa II en un ensayo sin células. Las concentraciones de extracto utilizadas son 0,3, 1, 3, 10 y 30 µg/ml. Como control positivo se utilizó etopósido. Por razones de comparación, se utilizaron 0,3, 3 y 30 µg/ml de α-bisabofol o 0,3, 3 y 30 µg/ml del aceite esencial de *Matricaria recutita* L.

1) Objetivo del estudio

Sistema 4: biosíntesis de ARN, ADN y de proteínas

La influencia del extracto según el ejemplo 4 en la biosíntesis de ARN, ADN y proteínas utilizando tres líneas celulares diferentes (HepG2: células de carcinoma de hígado; C33-A: células de carcinoma de cuello uterino y HT1376: células de carcinoma de vejiga) se examinó *in vitro*.

Sistema 5: Apoptosis e integridad de membrana

Además, la influencia del extracto según el ejemplo 4 en la inducción de apoptosis se probó en células HepG2. Al mismo tiempo, se examinó la citotoxicidad (integridad de la membrana) del extracto según el ejemplo 4 en células HepG2.

2) Material y métodos

2. 1) Muestras y preparación de muestras

Extracto	Descripción	Origen	Lote	Tipo de extracto
VIP-E_Matr'06_1003	flores tubulares de <i>Matricaria recutita</i>	Pentapharm	578-01/End; 20.7.2006	Acuoso
Se preparó VIP-E_Matr'06_1003 de acuerdo con el ejemplo 4.				

2.2) Condiciones de ensayo

Ensayo	Líneas celulares	Tiempo de incubación	Muestra	Concentración de muestra
Síntesis de ARN	HepG2C33-A HT1376	24 horas	VIP- E_Matr'06_1003	150 / 500 / 1660 µg/ml 10 / 50 / 100/ 150 µg/ml
Síntesis de ADN	HepG2C33-A HT1376	24 horas	VIP- E_Matr'06_1003	150/500/ 1660 µg/ml
Biosíntesis de proteínas	HepG2C33-A HT1376	24 horas	VIP- E_Matr'06_1003	150/500/ 1660 µg/ml
Apoptosis	HepG2	24 horas	VIP- E_Matr'06_1003	10 / 50 / 100 / 150 / 300 µg/ml
Apoptosis	HepG2	48h	VIP-E_Matr'06_1003	10 / 50 / 100 / 150 / 300 µg/ml
Citotoxicidad (integridad de la membrana)	HepG2	24 horas	VIP- E_Matr'06_1003	10, 50, 100, 150, 300 µg/ml

2.3) Ensayos

2.3.3) Síntesis de ARN/ADN

5 Para la síntesis de ARN y ADN, las células de ensayo (HepG2: carcinoma hepatocelular, humano, C33-A: carcinoma de cuello uterino, humano y HT1376: carcinoma de vejiga, humano) se recolectaron por tripsinización y se sembraron a 10.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Después del tratamiento de las células con las muestras a las concentraciones requeridas, la placa se incubó durante 2 horas a 37 °C y con CO₂ al 5 %. Las células fueron pulsadas con 5-³H-uridina (1 µCi/ml) (Perkin Elmer) para la síntesis de ARN y con 6-³H-timidina (1 µCi/ml) (Perkin Elmer) para la síntesis de ADN durante un período de incubación adicional de 24 horas. Las células se lavaron con PBS y se fijaron dos veces con metanol durante 5 minutos. La proteína fue precipitada por TCA 0,3 N. Después de una etapa de lavado, se añadieron 150 µl de NaOH 0,3 N durante 15 minutos para lisar las células. Los controles negativos t(0) se llevaron a cabo con las muestras sin células.

15 Para detectar la 5-³H-uridina incorporada para la síntesis de ARN y la 6-³H-timidina para la síntesis de ADN, las muestras se transfirieron en tubos de centelleo con una mezcla de centelleo. La cuantificación se realizó en un contador de centelleo líquido Tri-Carb 1900 TR (Packard, EE. UU.).

20 El efecto de varias concentraciones de muestras se midió determinando la cantidad de radiomarcador (dpm) en las condiciones del ensayo. Los valores relacionados con la dosis se expresaron como un porcentaje de los valores de control positivo. Los puntos de muestra se midieron como duplicados, los errores se expresan como diferencia de la media.

25 La proporción de incorporación (%) de 5-³H-uridina celular específica se calculó teniendo en cuenta los resultados del ensayo de síntesis de ADN. Los valores de síntesis respectivos (%) se dividieron entre el coeficiente de síntesis de ADN.

2.3.4) Biosíntesis de proteínas

30 Para la biosíntesis de proteínas, las células del ensayo (HepG2: carcinoma hepatocelular, humano; C33-A: carcinoma de cuello uterino, humano y HT1376: carcinoma de vejiga, humano) se recolectaron por tripsinización y se sembraron a 10.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Después del tratamiento de las células con las muestras a las concentraciones requeridas, la placa se incubó durante 2 horas a 37 °C y con CO₂ al 5 %. Las células fueron pulsadas con L-[3,4,5-³H (N)]-Leucina, (1 µCi/ml) (Perkin Elmer) durante un período de incubación adicional de 24 horas. Las células se lavaron dos veces con PBS, se lisaron con tampón RIPA y se incubaron en hielo durante 15 min. El lisado se transfirió a un tubo. Se añadieron 250 µl de TCA helado (20 %) y las muestras se incubaron en hielo durante 15 minutos más. Después de la centrifugación durante 20 minutos a 10.000xg y 4 °C, se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 250 µl de TCA (5 %) y se centrifugó nuevamente. Los lisados recibidos de cada muestra se resuspendieron en 250 µl de NaOH (0,2 N) y se calentaron durante 2 minutos a 50 °C. Los controles negativos t(0) se llevaron a cabo con las muestras sin células.

Para detectar la L-[3,4,5-³H(N)]-Leucina incorporada, las muestras se transfirieron en tubos de centelleo con mezcla de centelleo. La cuantificación se realizó en un contador de centelleo líquido Tri-Carb 1900 TR (Packard, EE. UU.).

45 El efecto de varias concentraciones de la muestra se midió determinando la cantidad de radiomarcador (dpm) en las condiciones del ensayo. Los valores relacionados con la dosis se expresaron como un porcentaje de los valores de control positivo. Los puntos de muestra se midieron por cuadruplicado, los errores se expresan como desviaciones típicas.

50 La proporción de incorporación (%) de L-[3,4,5-³H(N)]-Leucina celular específica se calculó teniendo en cuenta los resultados del ensayo de síntesis de ADN. Los valores de síntesis respectivos (%) se dividieron entre el coeficiente de proliferación.

2.3.5) Ensayo de apoptosis

55 Las células HepG2 (carcinoma hepatocelular, humano) se recolectaron por tripsinización y se sembraron a 10.000 células/pocillo en 100 µl en una placa de 96 pocillos. Después de 24 h, se añadieron 20 µl de muestras y 80 µl de medio fresco (volumen total de 200 µl). La placa se incubó adicionalmente durante 24 horas y en un experimento adicional durante 48 horas. Después de la centrifugación de la placa durante 10 minutos a 200xg, el sobrenadante se desechó y el sedimento se lisó durante 30 minutos a temperatura ambiente en 200 µl de tampón de lisis. El lisado finalmente se centrifugó durante 10 minutos a 200xg. Los controles de disolvente (= controles negativos) se realizaron con disolvente en lugar de muestra. La siembra y la incubación se realizaron en una incubadora a 37 °C y CO₂ al 5 %.

65 Se determinaron los fragmentos de ADN asociados a histonas citoplasmáticas (mono y oligonucleosomas) en el sobrenadante de lisado *in vitro* con un kit ELISA^{plus} de detección de muerte celular (Roche, N.º de Cat: 11 774 425 001) según la recomendación del proveedor.

La absorbancia se midió con un dispositivo lector de microplacas (TECAN Infinite M200) a una longitud de onda de $\lambda = 405$ nm y una longitud de onda de referencia de $\lambda = 490$ nm. El factor de enriquecimiento específico de mono y oligonucleosomas liberados en el citoplasma se calculó de la siguiente manera:

5 **Factor de enriquecimiento = muestra de absorbancia / absorbancia del correspondiente control negativo**

Los puntos de muestra se midieron como duplicados, los errores se expresan como diferencia de la media.

10 2.3.6) Ensayo de citotoxicidad de LDH (inducción de necrosis)

15 Ensayo de citotoxicidad de LDH (integridad de la membrana/inducción de necrosis): la citotoxicidad se probó en células HepG2 (carcinoma hepatocelular, humano). Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a 10.000 células por pocillo durante la noche. Se añadieron 20 μ l de las muestras respectivas y controles de disolvente a las concentraciones indicadas y 80 μ l de medio fresco (volumen total de 200 μ l). La siembra y la incubación se realizaron en una incubadora a 37 °C y CO₂ al 5 %. Después de un período de incubación de 24 horas, la integridad de la membrana se midió con un kit de ensayo de citotoxicidad de LDH (BioVision, n.º K311-400, CA, EE.UU.).

20 La integridad de la membrana de las células se determinó midiendo la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) citosólica liberada en el medio bajo la influencia de las muestras. La actividad de la enzima se midió determinando el formazán producido a partir de la sal de tetrazolio INT como sustrato. La cantidad de formazán se midió directamente determinando la densidad óptica (DO) con un lector de placas (TECAN Infinite M200) a una longitud de onda de $\lambda = 490$ nm.

25 Para cada concentración de ensayo, los valores de DO del fondo (mezcla de ensayo con muestras pero sin células) se restaron de las mediciones de DO con células. Los valores de DO₄₉₀ se transformaron en valores porcentuales con lecturas de citotoxicidad del 100 % correspondientes a las mediciones de las células lisadas (tritón X-100) con disolvente, y lecturas de citotoxicidad del 0 % correspondientes a las células incubadas solo con disolvente. Las mediciones ópticas se realizaron por duplicado. Los errores se expresaron como diferencia de la media.

30 4) Sumario

Con respecto a la biosíntesis de ADN, ARN y de proteínas del extracto según el ejemplo 4 mostraron los siguientes efectos: la síntesis de ADN es dependiente de la dosis suprimida, mientras que hasta dosis considerablemente altas la síntesis de ARN todavía está intacta y la biosíntesis de proteínas solo se ve afectada marginalmente o, si se adapta a la cantidad de células proliferativas, incluso aumenta (Figura 3). Este efecto es evidente para las tres líneas celulares en intervalos de dosificación no citotóxicos y puede interpretarse como un signo de una detención celular y una posible diferenciación. Todas las células de carcinoma probadas, hepatocarcinoma HepG2, carcinoma de vejiga HT1376 y carcinoma de cuello uterino C33A, mostraron este fenómeno.

40 En los experimentos iniciados posteriormente con células HepG2 para la discriminación entre apoptosis y necrosis (indicado por la fuga de LDH y la pérdida de integridad de la membrana celular), después de 24 horas, los presentes inventores no detectaron inducción de apoptosis incluso en la dosis más alta probada. El extracto según el ejemplo 4 no mostró ningún efecto, ni apoptosis ni citotoxicidad.

45 Por lo tanto, se decidió realizar un experimento adicional con una incubación de las células durante 48 horas. De forma interesante, después de 48 horas se descubrió que tampoco había inducción de apoptosis.

50 Es evidente a partir de la Figura 13 que el extracto según el ejemplo 7 muestra una inhibición total de la actividad de topoisomerasa II que comienza a una concentración de 3 μ g/ml. Por debajo de la concentración de 3 μ g/ml no se detecta inhibición.

55 El α -bisabolol, uno de los componentes principales del aceite esencial de una planta *Chamomilla*, no influyó en la actividad de topoisomerasa II en todas las concentraciones probadas.

El aceite esencial de *Matricaria recutita* L. apenas inhibió la actividad de topoisomerasa II. Solo se observó una inhibición incompleta a una concentración relativamente alta de 30 μ g/ml.

60 Para los fines de la presente invención, los términos "que contiene" o "que comprende" significarán que también pueden estar presentes compuestos o componentes adicionales, mientras que el término "consistir" significará que no hay presentes compuestos o componentes adicionales a los mencionados explícitamente.

Se desvelan, entre otros:

- 65
1. Una composición que comprende un extracto orgánico de acuerdo con la reivindicación 1.
 2. La composición de acuerdo con 1, caracterizada por que dicha composición comprende ocasionalmente al

menos un agente auxiliar farmacéuticamente y/o dermatológicamente aceptable.

3. La composición de acuerdo con una de 1 a 2, caracterizada por que el tratamiento de la afección proliferativa anómala comprende la sincronización y la detención de la fase S de células de mamífero proliferativas anómalas, especialmente de células cancerosas.

4. La composición de acuerdo con 3, caracterizada por que dicha sincronización comprende la inducción de ornitina descarboxilasa y/o la inhibición de topoisomerasas, especialmente topoisomerasa II.

5. La composición de acuerdo con una de 1 a 4, caracterizada por que dichos extractos orgánicos se pueden obtener mediante una extracción con un alcohol, especialmente un alcohol con 2 a 6 átomos de carbono, por lo que se prefiere especialmente el etanol, o con una cetona, especialmente una cetona con 3 a 5 átomos de carbono, por lo que se prefiere especialmente la acetona.

6. La composición de acuerdo con una de 1 a 5, caracterizada por que los extractos se pueden obtener de las cabezas de flores de la planta Chamomilla, especialmente Flores tubiformis que están libres de apigenina y glucósidos de apigenina, y/o de las hierbas y/o de las cabezas de las flores de la planta Achillea, especialmente Flores tubiformis.

7. La composición de acuerdo con una de 1 a 6, caracterizada por que la planta de Chamomilla se selecciona del grupo que consiste en

- especies de Matricaria, especialmente
- Matricaria recutita L
- Matricaria discoidea DC.
- especies de Anthemis, especialmente
- Anthemis nobilis L
- Anthemis arvensis L
- Anthemis cotula L
- Anthemis tinctoria L
- Ormenis multicaulis Br.-Bl. y Maire
- Eriocephalus punctulatus DC.,

por lo que Matricaria recutita L. es especialmente preferida.

8. La composición de acuerdo con una de 1 a 7, caracterizada por que las partes de la planta a extraer se someten previamente a una destilación al vapor para eliminar los aceites esenciales.

9. La composición de acuerdo con una de 1 a 8, caracterizado por que el extracto orgánico líquido primario se somete a una filtración de peso molecular para recoger componentes que tienen un peso molecular de menos de 10.000 Dalton y eliminar componentes que tienen un peso molecular de más de 10.000 Dalton, por lo que la fracción de extracto líquido obtenida se procesa ocasionalmente en polvo seco.

10. La composición de acuerdo con una de 1 a 8, caracterizada por que el extracto orgánico líquido primario se somete a una filtración de peso molecular para recoger componentes que tienen un peso molecular de más de 10000 Dalton y eliminar componentes que tienen un peso molecular de menos de 10000 Dalton, por lo que la fracción de extracto líquido obtenida se procesa ocasionalmente en polvo seco.

11. La composición de acuerdo con una de 1 a 10, caracterizada por que contiene al menos un agente auxiliar farmacéutico y/o dermatológico aceptable.

12. La composición de acuerdo con una de 1 a 11, caracterizada por que dicho tratamiento comprende la administración simultánea o secuencial de la presente composición y de al menos un agente antitumoral

13. La composición de acuerdo con 12, caracterizada por que dicho tratamiento comprende

- la administración de la presente composición durante al menos 2 días, preferentemente durante al menos 5 días para sincronizar dichas células proliferativas anómalas de mamífero, especialmente dichas células cancerosas, y para detenerlas en la fase S, y luego
- esta administración se detiene al menos 6 horas, preferentemente al menos 24 horas, antes del inicio de la administración de al menos un agente antitumoral, de modo que
- durante la administración de dicho agente antitumoral, esta composición no se administra, y por lo tanto
- durante la siguiente fase de lavado de dicho agente antitumoral, la presente composición tampoco se administra.

14. La composición de acuerdo con 13, caracterizada por que dicho ciclo de tratamiento se repite al menos dos veces, preferentemente al menos 3 veces.

15. La composición de acuerdo con una de 12 a 14, caracterizada por que dicha composición consiste en un extracto orgánico de al menos una planta de Chamomilla y/o de al menos una planta de Achillea y de al menos un agente antitumoral, y ocasionalmente de al menos un agente auxiliar farmacéuticamente y/o dermatológicamente aceptable.

16. La composición de acuerdo con una de 12 a 15, caracterizada por que dicho agente antitumoral es de origen natural, semisintético o sintético.

17. La composición de acuerdo con una de 12 a 16, caracterizada por que dicho agente antitumoral se selecciona del grupo que consiste en

- antimetabolitos,

- agentes alquilantes de ADN,
- inhibidores de la mitosis, y
- agentes intercaladores de ADN.

5 18. La composición de acuerdo con una de 1 a 17, caracterizada por que el extracto primario contiene al menos un contaminante soluble en agua que tiene grupos lipídicos que se eliminan mediante las siguientes etapas:

- 10 (i) poner en contacto la composición con un componente lipofílico que forma un complejo con el contaminante;
 (ii) una primera etapa de eliminación de eliminar material que tiene un tamaño de partícula mayor que el complejo formado en la etapa (i); y
 (iii) una segunda etapa de eliminación de eliminar el complejo formado en la etapa (i).

15 19. La composición de acuerdo con 18, caracterizada por que el contaminante es una endotoxina, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en fragmentos de la pared celular o fragmentos de moléculas que constituyen la pared celular de bacterias Gram negativas, por ejemplo seleccionados del grupo que consiste en lipopolisacáridos y carbohidratos que tienen grupos proteicos, en particular glicoproteínas que tienen al menos una cadena lipídica.

20 20. La composición según una de 18 a 19, caracterizada por que la endotoxina tiene un peso molecular superior a 10000 Dalton, preferentemente en exceso de 5000 Dalton, aún más preferentemente en exceso de 1000 Dalton y lo más preferentemente en exceso de 500 Dalton.

21. La composición según una de 18 a 20, caracterizada por que el componente lipofílico es un aceite, preferiblemente un aceite graso.

25 22. La composición según una de 18 a 21, caracterizada por que la etapa (iii) comprende ultrafiltración, preferentemente usando un filtro que tiene un tamaño de poro en el intervalo de 0,001 a 0,02 micrómetros, más preferentemente de 0,001 a 0,01 micrómetros.

23. La composición de acuerdo con una de 1 a 22, caracterizada por que el extracto está libre o esencialmente libre de endotoxinas, por el cual el extracto contiene endotoxinas en una cantidad de no más de 100 UE/ml - unidades de endotoxina por ml según la Farmacopea Europea, preferentemente no más de 50 UE/ml, por ejemplo no más de 25 UE/ml.

30 24. La composición de acuerdo con una de 1 a 23, caracterizada por que el tratamiento se realiza por inyección de la composición o por administración oral, rectal o tópica.

35 25. Uso de una composición que comprende un extracto orgánico de al menos una planta de Chamomilla y/o de al menos una planta de Achillea de acuerdo con una de 1 a 24 para el tratamiento de una afección vírica y/o proliferativa anómala, con la condición de que para el tratamiento de dicha afección proliferativa anómala se excluya el extracto mono/único de Achillea millefolium (L.), y con la condición adicional de que para el tratamiento de dicha afección vírica se excluya el extracto mono/único de Matricaria chamomilla (L.).

26. Uso de acuerdo con 25, caracterizado por que la composición es una composición tal como se define en una de 2 a 24.

40 27. Uso de una composición que comprende un extracto orgánico de al menos una planta de Chamomilla y/o de al menos una planta de Achillea de acuerdo con una de 1 a 24 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección vírica y/o proliferativa anómala, con la condición de que para el tratamiento de dicha afección proliferativa anómala se excluya el extracto mono/único de Achillea millefolium (L.), y con la condición adicional de que para el tratamiento de dicha afección vírica se excluya el extracto mono/único de Matricaria chamomilla (L.).

45 28. Un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal que padece una afección proliferativa anómala y/o vírica, caracterizada por que al paciente se le aplica o administra una composición que contiene un extracto orgánico de al menos una planta de Chamomilla y/o de al menos una planta de Achillea según una de 1 a 24, con la condición de que para el tratamiento de dicha afección proliferativa anómala se excluya el extracto mono/único de Achillea millefolium (L.), y con la condición adicional de que para el tratamiento de dicha afección vírica se excluya el extracto mono/único de Matricaria chamomilla (L.).

5) Bibliografía

55 1 Toshie H., Noriko N.M., Yoshiyuki A., Mittsuhiro N., Toshiro Y., Naohito O. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Regulates Cytokine Induction by 1,3-β-D-Glucan SCG in DBA/2 Mice *in vitro*. J. of IFN and Cytokine Research 24:478-489 (2004).

60 2 Golenbock D.T., Hampton R.Y., Qureshi N., Takayama K., Raetz C. R. H. (1991) Lipid A-like molecules that antagonize the effect of endotoxins on human monocytes. J. Biol. Chem. 266 (29): 19490-498.

3 Garrelds I.M., van Hal P. Th. W., Haakmat R. C., Hoogsteden H. C., Saxena P. R., Zijlstra F. J.: Time dependent production of cytokines and eicosanoides by human monocytic leukaemia U937 cells; effects of glucocorticosteroids. Mediators of Inflammation: 8, 229-235 (1999).

65 4 Lindl T. (2000) Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 4.überarb. und erw. Auflage - Heidelberg; Berlin: Spectrum, Akad. Verlag (ISBN 3-8274-0803-2).

5 Decker T. & Lohmann-Matthes M.L. (1988) A quick and simple method for the quantification of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor activity. *J. Immunol Methods* 15 (1): 61-69.

5

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un extracto orgánico de al menos una planta de Chamomilla y/o de al menos una planta de Achillea en la que los extractos se pueden obtener de Flores tubiformis de la planta de Chamomilla que están separados de la inflorescencia y están libres de apigenina y glucósidos de apigenina, y/o de Flores tubiformis de la planta Achillea separada de la inflorescencia, caracterizada por que la planta de Chamomilla se selecciona del grupo que consiste en
- especies de Matricaria, especialmente
 - Matricaria recutita L
 - Matricaria discoidea DC.
 - especies de Anthemis, especialmente
 - Anthemis nobilis L
 - Anthemis arvensis L
 - Anthemis cotula L
 - Anthemis tinctoria L
 - Ormenis multicaulis Br.-Bl. y Maire
 - Erioccephalus punctulatus DC.,
- y **caracterizada por que** dichos extractos se pueden obtener por extracción con un alcohol o una cetona, con la condición de que para el tratamiento de una afección proliferativa anómala se excluya el extracto mono/único de Achillea millefolium (L.), y con la condición adicional de que para el tratamiento de una afección vírica se excluya el extracto mono/único de Matricaria chamomilla (L.).
2. La composición según la reivindicación 1, **caracterizada por que** dichos extractos orgánicos se pueden obtener mediante una extracción con un alcohol con 2 a 6 átomos de carbono, por lo que el etanol es especialmente preferido, o con una cetona con 3 a 5 átomos de carbono, por lo que se prefiere especialmente la acetona.
3. La composición según la reivindicación 2, **caracterizada por que** dichos extractos orgánicos se pueden obtener mediante una extracción con etanol como disolvente de extracción, en donde la concentración de etanol es al menos el 80 % (m/m), preferentemente al menos el 90 % (m/m) y lo más preferentemente al menos el 99 % (m/m).
4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por que** la planta de Chamomilla es Matricaria recutita L.
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** las partes de la planta a extraer se someten previamente a una destilación al vapor para eliminar los aceites esenciales.
6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada por que** es adecuada para la administración oral o en una forma adecuada para uso oral.
7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada por que** es adecuada para la administración rectal.
8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada por que** es adecuada para la administración tópica.
9. Uso de un extracto orgánico de al menos una planta de Chamomilla y/o de al menos una planta de Achillea para la preparación de una composición que comprende dichos extractos en donde los extractos se pueden obtener de Flores tubiformis de la planta de Chamomilla que están separados de la inflorescencia y son libres de apigenina y glucósidos de apigenina, y/o de Flores tubiformis de la planta Achillea separadas de la inflorescencia, caracterizada por que la planta de Chamomilla se selecciona del grupo que consiste en
- especies de Matricaria, especialmente
 - Matricaria recutita L
 - Matricaria discoidea DC.
 - especies de Anthemis, especialmente
 - Anthemis nobilis L
 - Anthemis arvensis L
 - Anthemis cotula L
 - Anthemis tinctoria L
 - Ormenis multicaulis Br.-Bl. y Maire
 - Erioccephalus punctulatus DC.,
- y **caracterizada por que** dichos extractos se pueden obtener por extracción con un alcohol o una cetona, con la condición de que para el tratamiento de una afección proliferativa anómala se excluya el extracto mono/único de

Achillea millefolium (L.), y con la condición adicional de que para el tratamiento de una afección vírica se excluya el extracto mono/único de Matricaria chamomilla (L.).

5 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** dichos extractos orgánicos se pueden obtener mediante una extracción con un alcohol con 2 a 6 átomos de carbono, por lo que el etanol es especialmente preferido, o con una cetona con 3 a 5 átomos de carbono, por lo que se prefiere especialmente la acetona.

10 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado por que** dichos extractos orgánicos se pueden obtener mediante una extracción con etanol como disolvente de extracción, en donde la concentración de etanol es al menos el 80 % (m/m), preferentemente al menos el 90 % (m/m) y lo más preferentemente al menos el 99 % (m/m).

12. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizada por que** la planta de Chamomilla es Matricaria recutita L.

15 13. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, **caracterizada por que** las partes de la planta a extraer se someten previamente a una destilación al vapor para eliminar los aceites esenciales.

20 14. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, **caracterizado por que** la composición es adecuada para administración oral o en una forma adecuada para su uso oral.

15. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, **caracterizado por que** la composición es adecuada para la administración rectal.

25 16. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, **caracterizado por que** la composición es adecuada para la administración tópica.

30 17. Una composición para su uso en un tratamiento terapéutico que comprende un extracto orgánico de al menos una planta de Chamomilla y/o de al menos una planta de Achillea en la que los extractos se pueden obtener de Flores tubiformis de la planta de Chamomilla que están separados de la inflorescencia y están libres de apigenina y glucósidos de apigenina, y/o de Flores tubiformis de la planta Achillea separada de la inflorescencia, **caracterizada por que** la planta de Chamomilla se selecciona del grupo que consiste en

- especies de Matricaria, especialmente
- Matricaria recutita L
- 35 - Matricaria discoidea DC.
- especies de Anthemis, especialmente
- Anthemis nobilis L
- Anthemis arvensis L
- Anthemis cotula L
- 40 - Anthemis tinctoria L
- Ormenis multicaulis Br.-Bl. y Maire
- Eriocephalus punctulatus DC.,

45 y **caracterizada por que** dichos extractos se pueden obtener por extracción con un alcohol o una cetona, con la condición de que para el tratamiento de una afección proliferativa anómala se excluya el extracto mono/único de Achillea millefolium (L.), y con la condición de que para el tratamiento de una afección vírica se excluya el extracto mono/único de Matricaria chamomilla (L.).

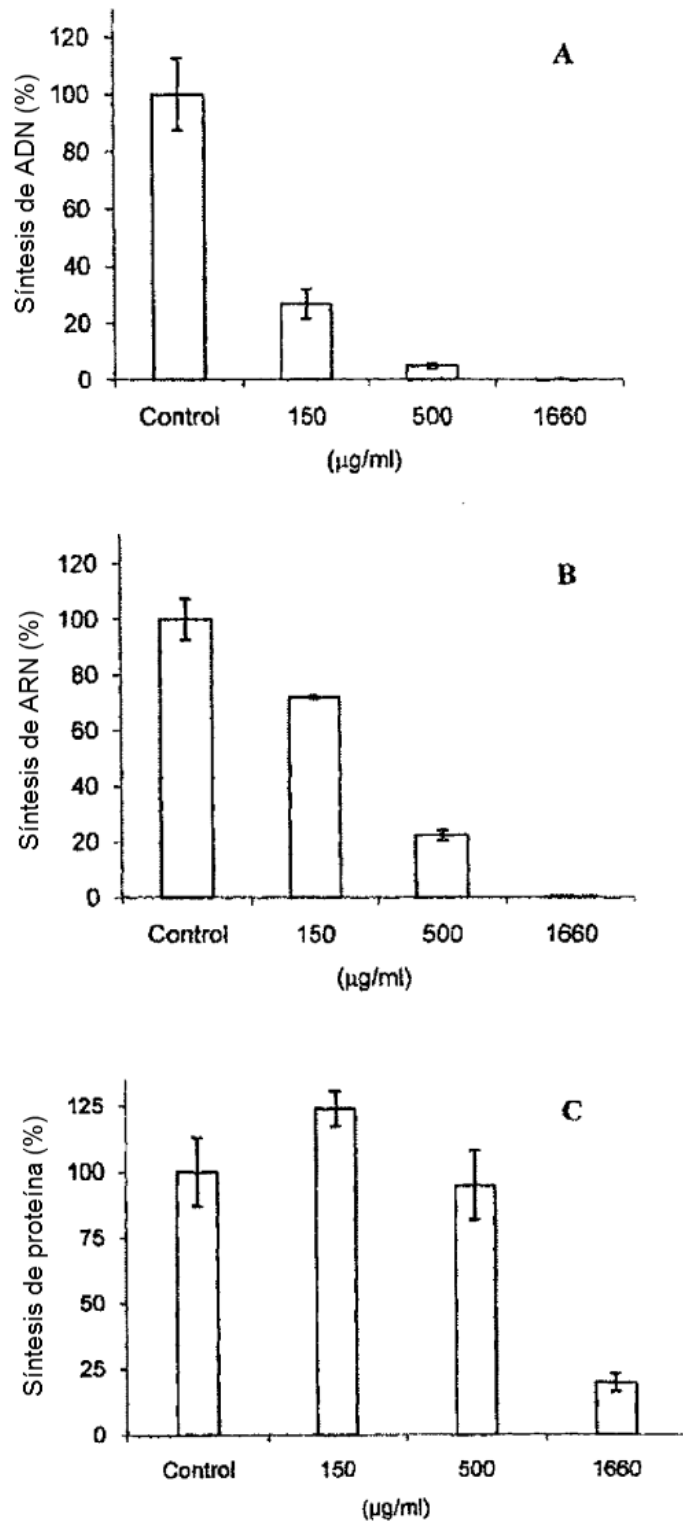


Fig. 1

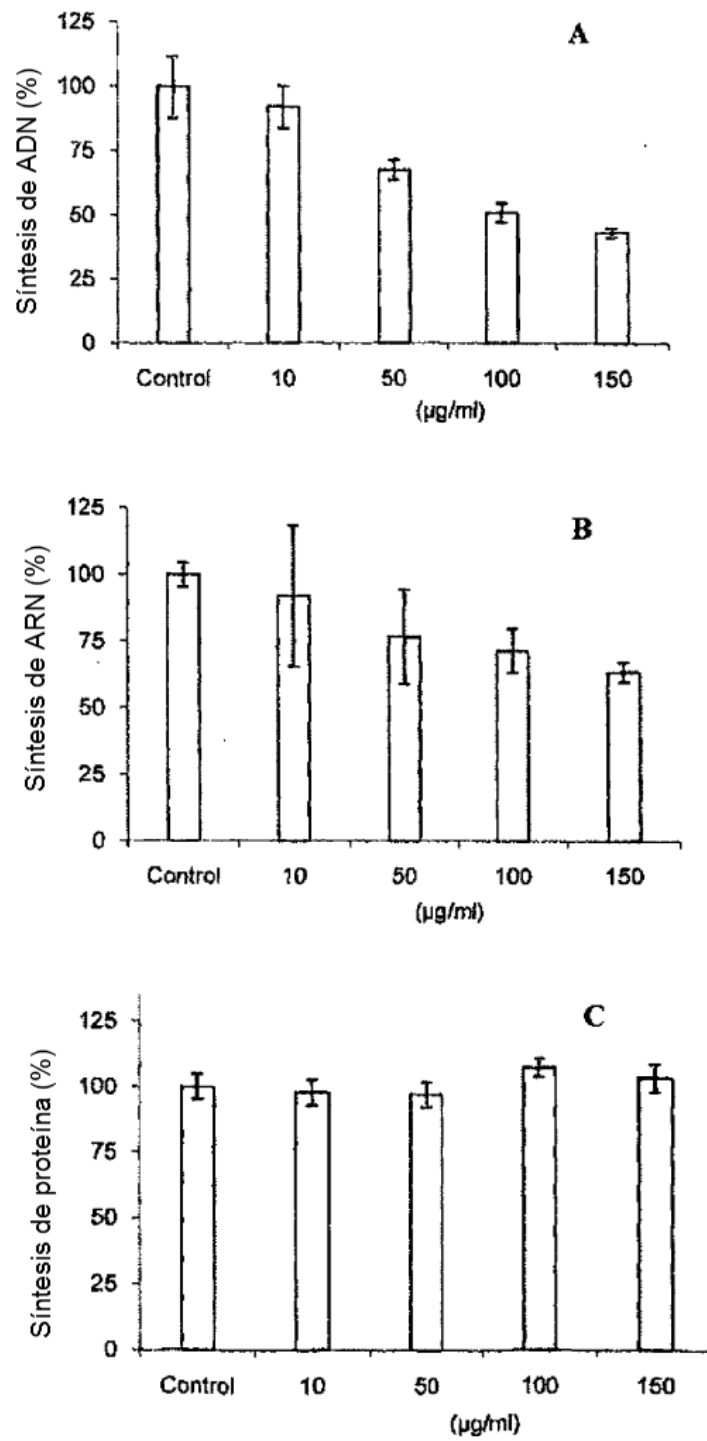


Fig. 2

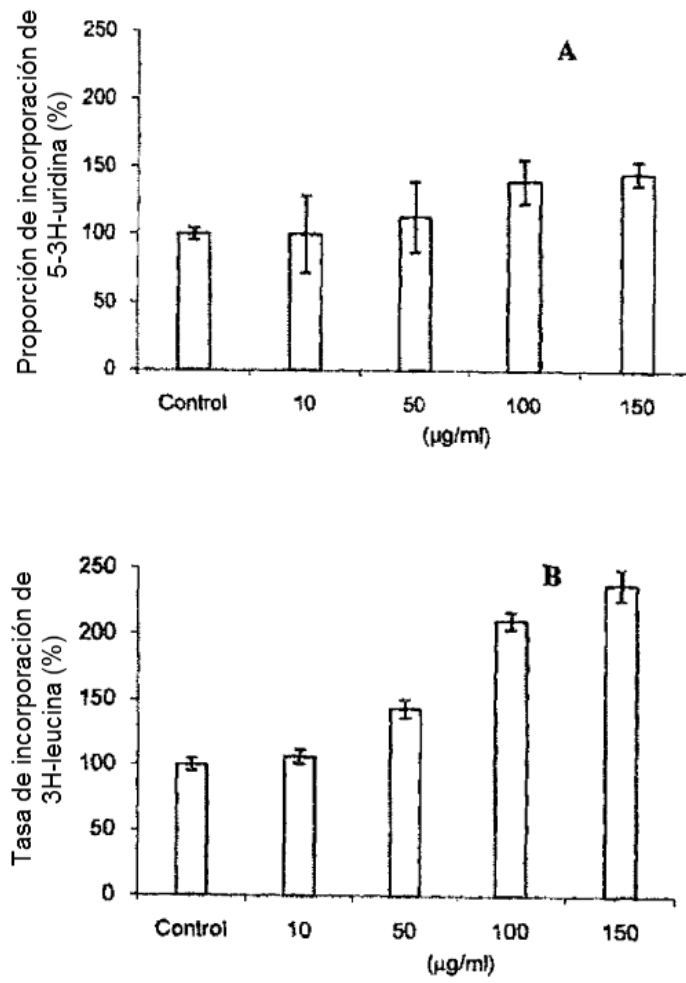


Fig. 3

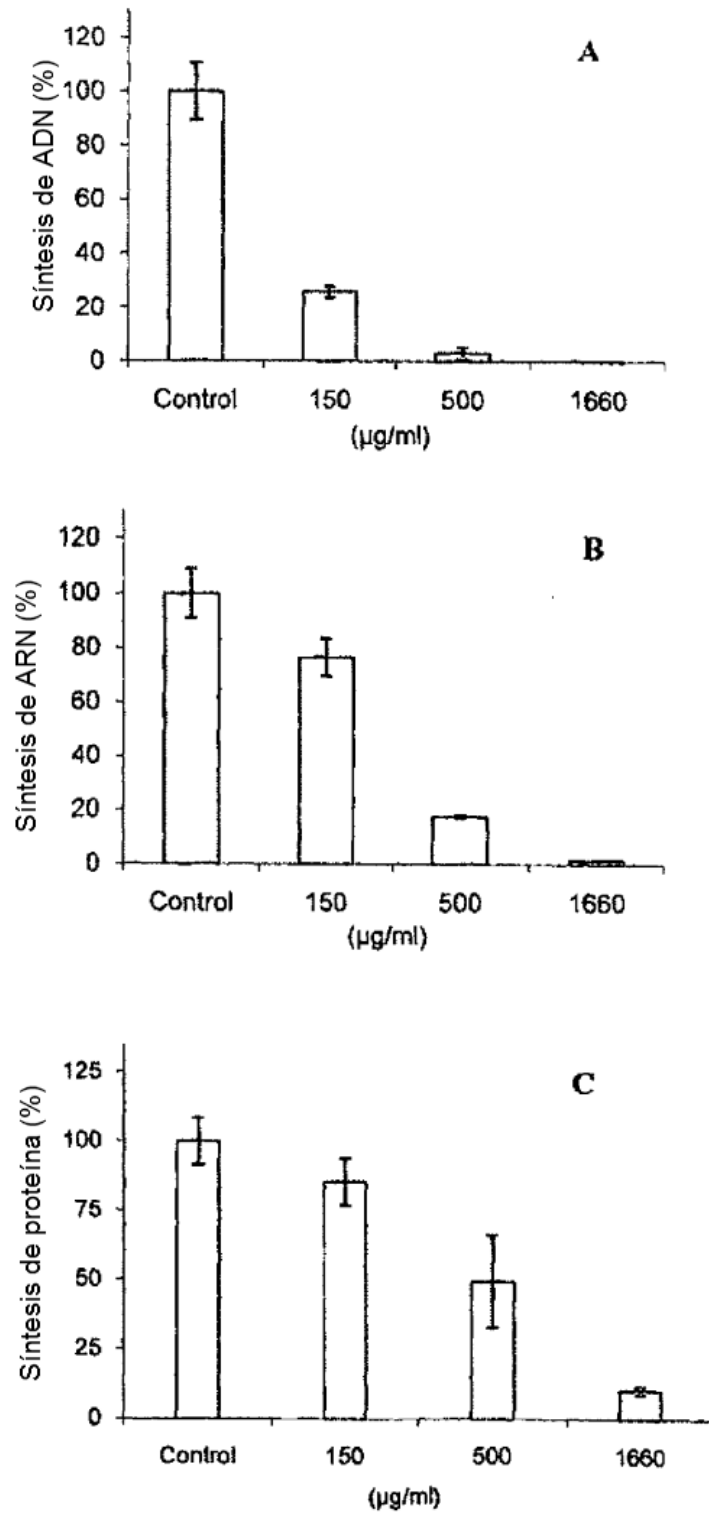


Fig. 4

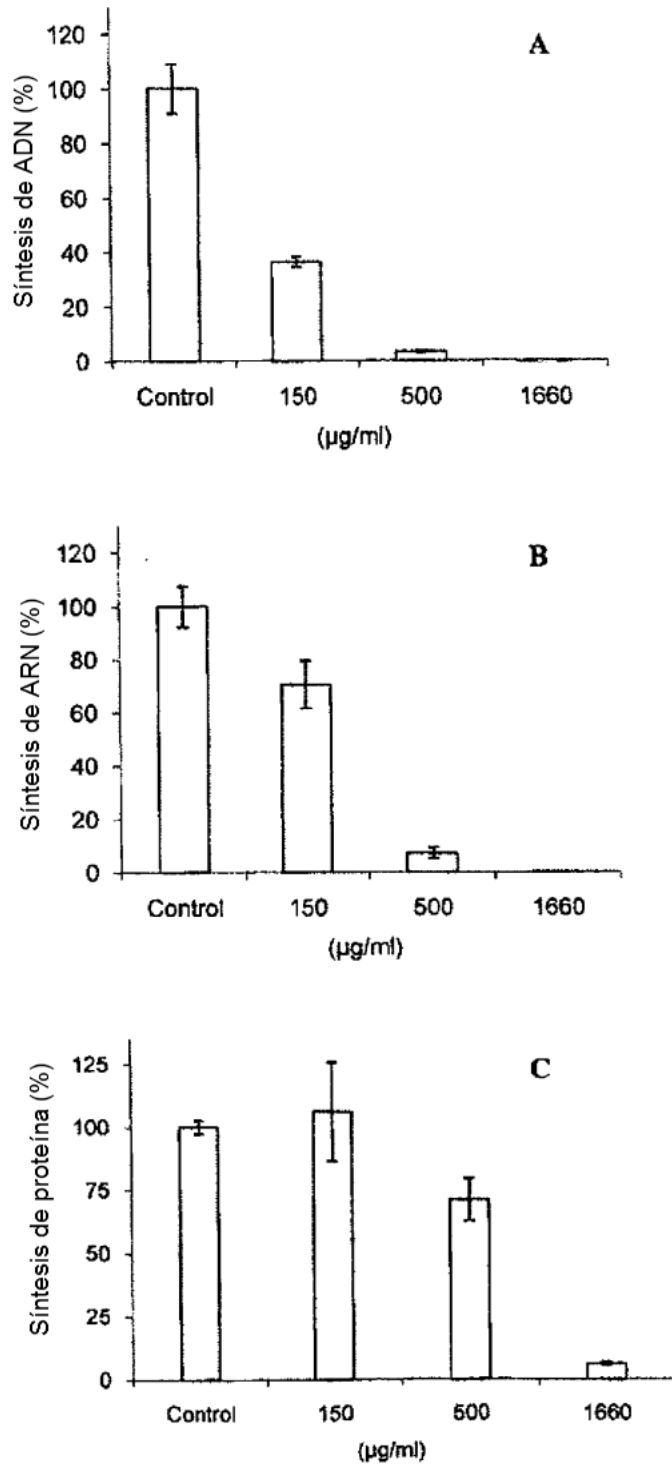


Fig. 5

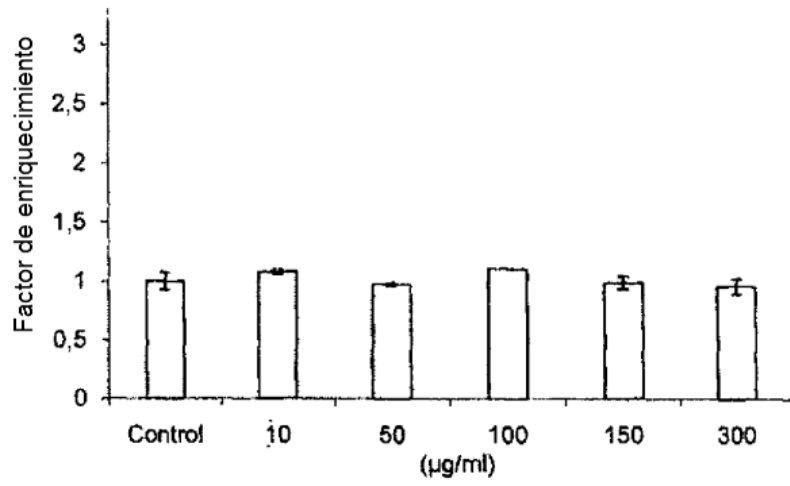


Fig. 6

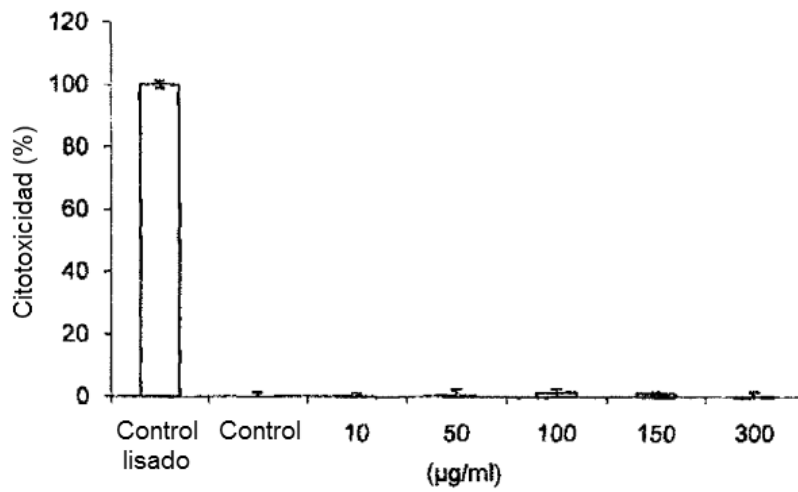


Fig. 7

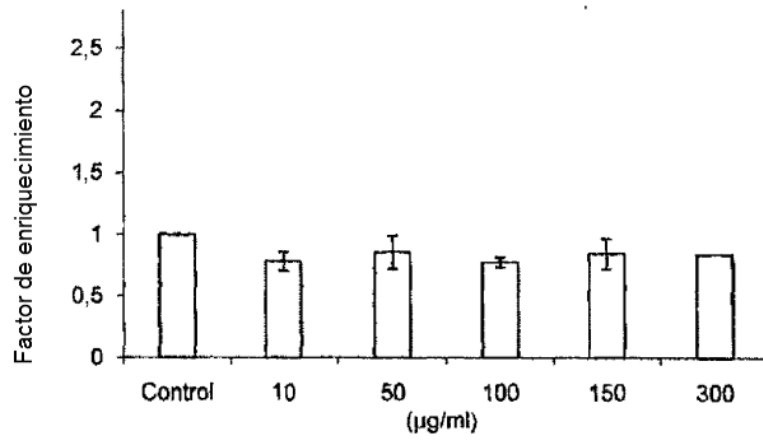


Fig. 8

Tiempo de incubación:

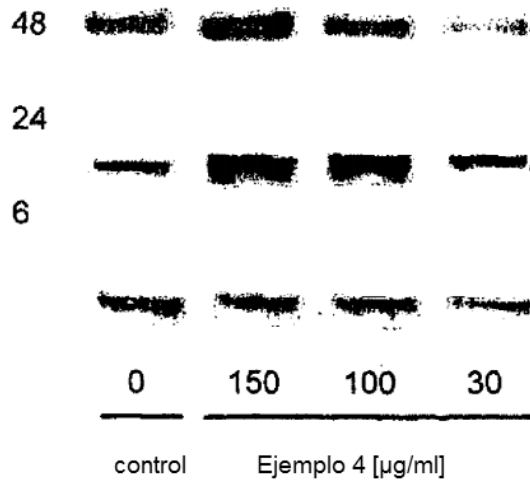


Fig. 9

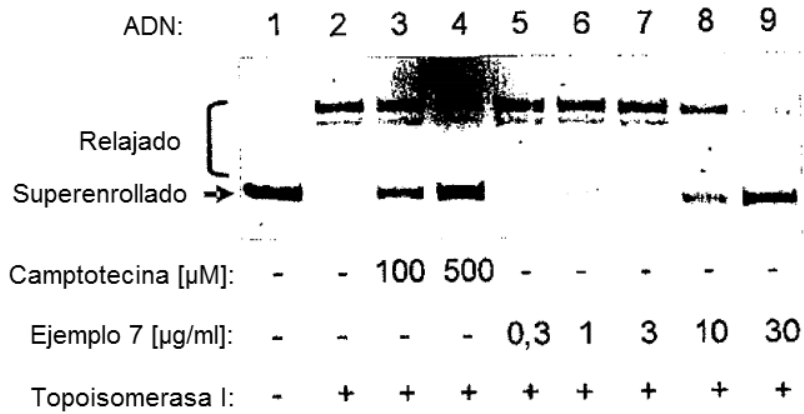


Fig. 10

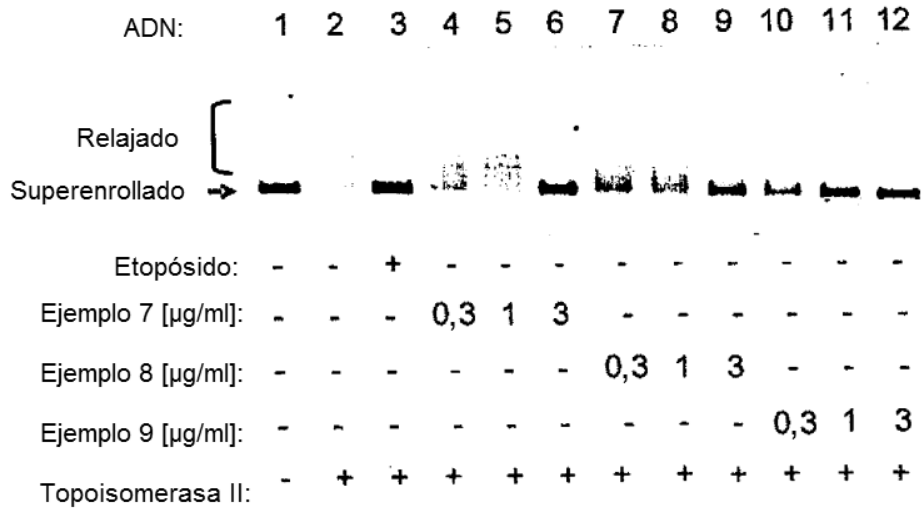


Fig. 11

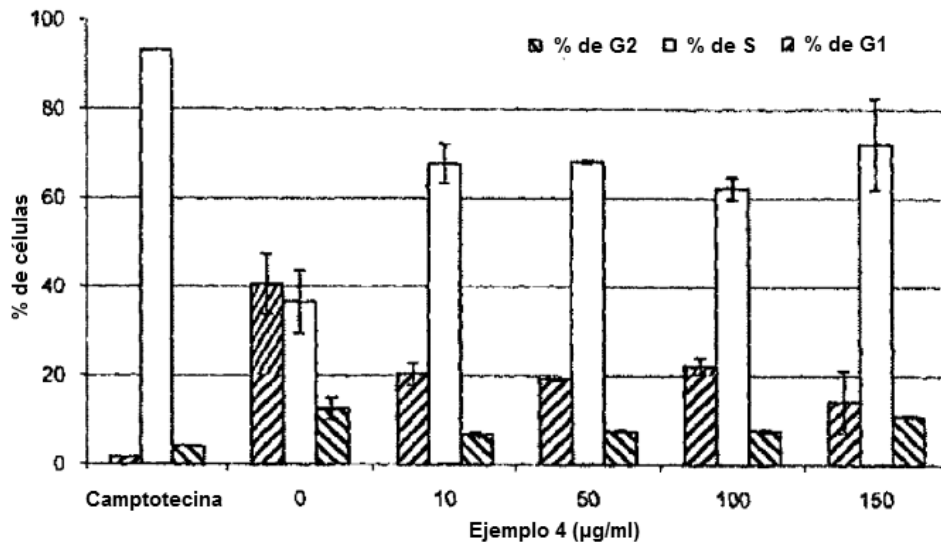


Fig. 12

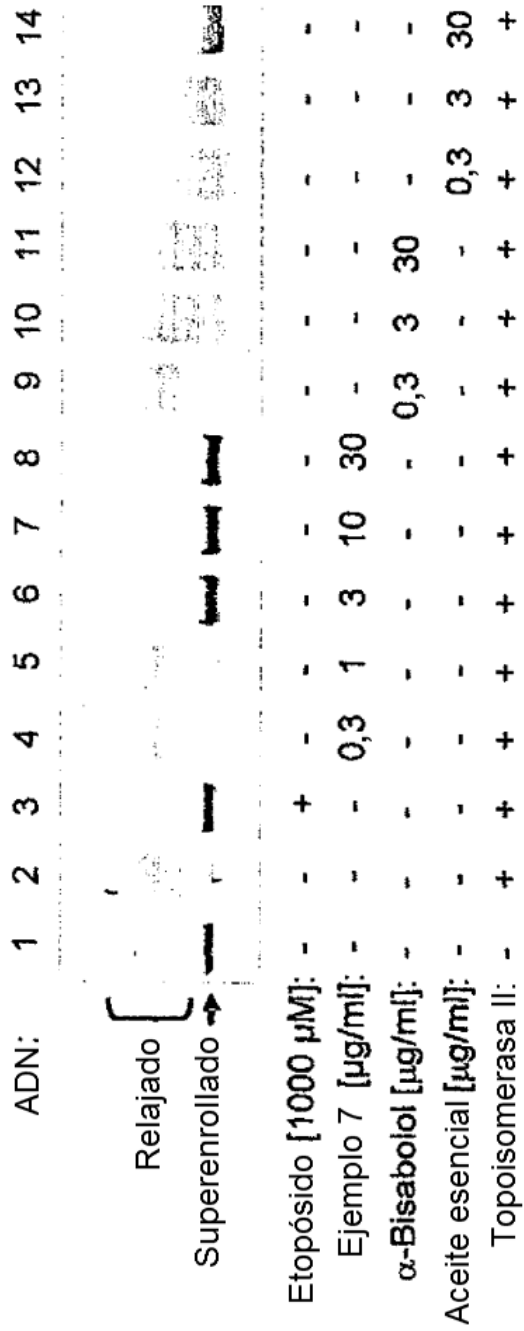


Fig. 13