



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“ESTUDIO DE PROPIEDAD INTELECTUAL DEL EXTRACTO DE  
*Sargassum buxifolium* PARA EL TRATAMIENTO DEL  
CANCER CERVICOUTERINO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

**JONATHAN DOMÍNGUEZ FABIÁN**

DIRECTOR:

M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA

ASESOR:

DR. RAMÓN SOTO VÁZQUEZ



ABRIL DE 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE  
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES "ZARAGOZA"**

**DIRECCIÓN**

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN  
ESCOLAR  
PRESENTE.**

Comunico a usted que el alumno DOMÍNGUEZ FABIÁN JONATHAN  
con número de cuenta 303113418 de la carrera de Q. F. B.,  
se le ha fijado el día 15 del mes de Abril de 2013 a las 17:00 hrs.,  
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes  
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	DRA. PATRICIA PARRA CERVANTES
VOCAL	M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA
SECRETARIO	DR. RAMÓN SOTO VÁZQUEZ
SUPLENTE	M. en C. JOSÉ LUIS TREJO MIRANDA
SUPLENTE	M. en C. AGUSTÍN HERNÁNDEZ GAVIÑO

El título de la tesis que se presenta es : **Estudio de Propiedad Intelectual  
del extracto de *Sargassum buxifolium* para el tratamiento de cáncer cervicouterino**

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
México, D.F. a 12 de <sup>DE ESTUDIOS</sup> Marzo de 2013

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
**DIRECTOR**  
**ZARAGOZA**  
**DIRECCIÓN**



RECIBÍ:

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES  
Y DE GRADO

**DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**  
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental (UMIEZ) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; bajo la dirección de la M. en C. Rosalva Rangel Corona y la Asesoría del Dr. Ramón Soto Vázquez.

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la M. en C. Rosalva Rangel Corona responsable del Laboratorio de Oncología Celular por la dirección del proyecto.*

*Al Dr. Ramón Soto Vázquez por la experiencia que aportó en la asesoría de este proyecto.*

*A la Dra. Patricia Parra Cervantes, al M. en C José Luis Trejo Miranda y al M. en C. Agustín Hernández Gaviño por la revisión oportuna a este proyecto.*

*A mis amigos, Thalía, Paco, Cesar, Chuby, Estela, Jony, Pedro y Julio Por cada experiencia que pasamos juntos.*

*A los alumnos del L-4 por hacer mi estancia placentera.*

## DEDICATORIAS

*A mis padres María de los Ángeles Fabián Beyvar y Filiberto Domínguez López, por todo su amor y sus enseñanzas; que han guiado mis pasos por el buen camino y hecho de mí un hombre de bien. Cada desvelo de ustedes ha dado su fruto.*

*A mi hermana Sara Domínguez Fabián, por ser mi confidente y mi mejor amiga.*

*A mi hermano Emmanuel Domínguez Fabián; que a pesar de ser el menor, su madurez me hizo aprender muchas cosas y valorar tantas más.*

*Gracias a mi familia, que a lo largo de todos estos años no ha dejado de apoyarme; ha estado en mis angustias. Sin duda alguna también lo seguirá en mis glorias.*

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN:.....	3
1. MARCO TEÓRICO:.....	5
1.1. ACELERACIÓN DEL PROCESO DE CAMBIO.....	5
1.1.1. LA TIERRA COMO BASE DE LA ECONOMÍA.....	5
1.1.2. LA REVOLUCIÓN INDUSTRIAL.....	6
1.1.3. EL NUEVO SISTEMA DE CREACIÓN DE RIQUEZA.....	6
1.2. DISYUNTIVA SOBRE LA PATENTABILIDAD DE LAS INVENCIONES.....	7
1.3. PROPIEDAD INTELECTUAL.....	8
1.3.1. DERECHOS DE AUTOR.....	9
1.3.2. DERECHOS CONEXOS.....	10
1.3.3. PROPIEDAD INDUSTRIAL.....	11
1.3.3.1. PATENTES.....	11
1.3.3.2. MODELOS DE UTILIDAD.....	13
1.3.3.3. SECRETO INDUSTRIAL.....	13
1.3.3.4. DISEÑOS INDUSTRIALES.....	14
1.3.3.5. MARCAS.....	15
1.3.3.6. NOMBRES COMERCIALES.....	16
1.3.3.7. DENOMINACIONES DE ORIGEN.....	17
1.3.3.8. ESQUEMAS DE TRAZADO DE CIRCUITOS INTEGRADOS.....	17
1.4. PROPIEDAD INTELECTUAL Y LOS RECURSOS GENÉTICOS EN EL NUEVO CONTEXTO INTERNACIONAL.....	18
1.5. FORMAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL RELACIONADAS CON LA BIOTECNOLOGÍA.....	19
1.6. CÁNCER CÉRVICOUTERINO.....	20
1.6.1. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.....	21
1.6.2. BIOLOGÍA DEL VPH.....	21

1.6.3.	TIPOS DE VPH. ....	22
1.6.4.	TRASTORNOS ASOCIADOS AL CÁNCER.....	22
1.6.5.	TERAPIAS PARA EL CÁNCER.....	23
1.6.6.	BÚSQUEDA DE ALTERNATIVAS Y USO DE COMPUESTOS NATURALES COMO LOS PROVENIENTES DE ALGAS MARINAS. ....	24
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA: .....	25
3.	OBJETIVOS: .....	26
3.1.	GENERAL.....	26
3.2.	PARTICULARES.....	26
4.	HIPÓTESIS:.....	26
5.	MATERIAL Y MÉTODO: .....	27
5.1.	ESTUDIO DEL ESTADO DE LA TÉCNICA. ....	27
5.2.	REPRODUCIBILIDAD DE LA INVENCIÓN.....	27
5.3.	SOLICITUD DE PATENTE:.....	27
6.	RESULTADOS: .....	29
6.1.	ESTADO DE LA TÉCNICA: .....	29
6.2.	REPRODUCIBILIDAD DE LA INVENCIÓN:.....	31
6.3.	SOLICITUD DE PATENTE:.....	32
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS: .....	51
8.	CONCLUSIONES: .....	52
9.	PROPUESTAS: .....	53
10.	ANEXOS: .....	54
10.1.	ANEXO 1: .....	54
10.2.	ANEXO 2: .....	58
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: .....	103

## INTRODUCCIÓN:

Hoy en día el producto del intelecto humano y los conocimientos han emergido como ejes determinantes de la nueva economía mundial. En este sentido, es de vital importancia ofrecer protección a las creaciones del intelecto humano mediante las diversas figuras jurídicas que ofrece la Propiedad Intelectual; dentro de las cuales podemos encontrar a los Derechos de Autor, los Derechos Conexos y los Derechos de Propiedad Industrial.

Dentro de los Derechos de Propiedad Industrial, tenemos que las patentes son el instrumento de protección por excelencia de las invenciones. Y sobre las cuales, el Estado confiere un derecho de exclusividad a los inventores de poder explotar su invención para obtener recursos monetarios, recuperando así los costos de investigación y desarrollo de un producto. Esto sin duda alguna es un incentivo hacia la investigación; y gracias a ello el desarrollo científico y tecnológico puede seguir su curso.

Según datos del INEGI, en México; durante el periodo comprendido entre 2000 y 2010 se registraron en promedio 14,278 solicitudes de patente anualmente. De las patentes concedidas, el 98% corresponde a inventores extranjeros; mientras que el 2% restante corresponde a las patentes de inventores nacionales. Estos datos alarmantes, sin ninguna duda; son sinónimo de la poca cultura que se tiene en México sobre la protección a las creaciones del intelecto humano mediante el sistema de patentes. Y por otra parte, del tipo de investigación que se desarrolla en nuestro país.

En México, nuestra “máxima casa de estudios”, la UNAM, fuente de investigadores, profesionistas y recursos humanos de calidad; contribuye solamente con el 8% de las patentes nacionales anualmente concedidas. Por lo que, es necesario tomar acción inmediata, a fin de promover un desarrollo de la cultura de la Propiedad Intelectual, no solo en las universidades e institutos de investigación, sino también en la población mexicana en general.

Para que una invención sea patentable, en general, debe de cumplir tres requisitos: novedad, actividad inventiva y aplicación industrial. La evaluación de estas tres condiciones requiere un análisis exhaustivo por parte de los examinadores de las oficinas de patente de cada país para así poder dar un dictamen acertado a cada solicitud de patente.

En particular, el trabajo realizado dentro del Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, brinda protección a sus trabajos de investigación mediante el sistema de patentes. Siendo la principal línea de investigación el cáncer cervicouterino, y sobre la cual se han probado distintas alternativas de tratamiento, a fin de mejorar la calidad de vida de la población.

## FES Zaragoza, UNAM

---

El presente trabajo tuvo como fin redactar la solicitud de patente del extracto de *Sargassum buxifolium* y su uso en el tratamiento del cáncer cervicouterino; delimitando el estado de la técnica para superar el examen de fondo a realizar en la Dirección Divisional de Patentes del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

## 1. MARCO TEÓRICO:

Mientras el mundo se adentra a la llamada economía supersimbólica donde el sistema de creación de riqueza se asienta en el valor del conocimiento y la innovación, en nuestro país ciertos inventores están legalmente desprotegidos, situación que atenta contra el crecimiento y la inversión en un área fundamental para el desarrollo y bienestar de la población.<sup>[1]</sup>

El trámite de patente en México es aún desconocido para los inventores mexicanos. Las bajas cifras de solicitudes de patente presentadas en el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) revelan que los mexicanos prácticamente no protegemos nuestras invenciones.<sup>[2]</sup> La subsistencia de dicha desprotección legal e importantes acontecimientos que inciden en la materia nos lleva a abordar el tema.

Entre los aspectos relacionados se encuentran los siguientes:

- A) Aceleración del proceso de transformación de la economía mundial.
- B) Disyuntiva sobre la patentabilidad de las invenciones.<sup>[1]</sup>

### 1.1. ACELERACIÓN DEL PROCESO DE CAMBIO.

La realidad contemporánea nos confronta con un mundo no solo cambiante, sino que además, nos propone frente a un proceso de profunda aceleración del cambio en sí mismo.

- Desde los inicios de la historia, se han tenido distintos paradigmas que han cambiado el rumbo de la productividad y la vida del hombre. Entre los cuales podemos mencionar los siguientes:<sup>[1]</sup>

#### 1.1.1. LA TIERRA COMO BASE DE LA ECONOMÍA.

Originalmente el concepto de riqueza estuvo íntimamente ligado a la posesión de la tierra.

Distintas guerras e invasiones giraron en torno a dicha cuestión.

Durante miles de años la población del mundo podría haberse dividido en dos categorías: “primitivos” y “civilizados”.

Las llamadas sociedades primitivas se dedicaban a la caza o la pesca para poder subsistir. Contrariamente el mundo civilizado estaba constituido por aquella parte de la población que cultivaba el suelo.

Dondequiera que surgió la agricultura se desarrolló la civilización.

Por debajo de las diferencias existían similitudes básicas y fundamentales; en todas ellas la tierra era la base de la economía, la vida, la cultura y la estructura familiar.<sup>[1]</sup>

## 1.1.2. LA REVOLUCIÓN INDUSTRIAL.

La Revolución Industrial estalló en el mundo creando una poderosa y febrilmente enérgica civilización. Las chimeneas de las fábricas empezaron a ser parte del paisaje urbano. Las máquinas y los materiales para la producción industrial y su posesión, en lugar de la tierra, se transformaron en un factor determinante para medir la riqueza.

Por otra parte, también se puso el tractor en la granja, se creó el diario y el cine, la máquina de escribir; y con el tiempo nuevos medicamentos fueron puestos a disposición del público, lo que resultó en una mejor calidad de vida.

La Revolución Industrial fomentó de tal modo la productividad, que la riqueza nacional y el poder adquisitivo de las personas sobrepasaron el incremento demográfico. Durante todo el siglo XV la población británica se multiplicó por cuatro, en tanto que el producto nacional creció cincuenta y dos veces.

Sin embargo en la Revolución Industrial no se asignaba mayor valor a la producción del conocimiento o el intercambio de información. Los activos más importantes de una empresa eran los materiales tangibles; la investigación en cambio, salvo excepciones, desempeñaba un papel secundario. <sup>[1]</sup>

## 1.1.3. EL NUEVO SISTEMA DE CREACIÓN DE RIQUEZA.

El trabajo intelectual y los conocimientos emergen como ejes determinantes de la nueva economía mundial. Dado que el conocimiento reduce la necesidad de materias primas, trabajo, tiempo, espacio y capital. Este se convirtió en el recurso central de la economía avanzada.

Históricamente los países se enriquecían si poseían más recursos naturales, habían nacido ricos y gozaban de las ventajas de tener más capital (fábricas y equipos) por persona, empleaban tecnologías superiores o tenían más habilidades que sus competidores.

Hoy en día eso ha cambiado, tal es el ejemplo de México y Japón; mientras el primero es rico en recursos naturales, el segundo tiene un mejor avance tecnológico. En este sentido la tecnología pone las cosas al revés.

Los nuevos medios de producción no tienen que ver con las herramientas del artesano ni con la pesada e imponente maquinaria de la era industrial. Por el contrario, dichos medios se localizan en el cerebro y se constituyen en la fuente de riqueza más importante para el futuro. <sup>[1]</sup>

De ahí que los elementos del nuevo sistema son:

- Conocimiento: como ya se ha mencionado anteriormente es el principal recurso de la economía supersimbólica, entre otros motivos porque puede ser utilizado por muchos al mismo tiempo, y además genera más conocimiento.

- Celeridad: si un país no es capaz de acelerar la producción y su entrega, no podrá competir en el nivel mundial. Los lentos serán eliminados del mercado, el factor tiempo ha pasado a ser fundamental. Por ello las telecomunicaciones son un factor crítico.
- Innovación: hoy en la nueva economía, la innovación se convierte en un imperativo. Debe resaltarse que dentro del nuevo sistema de generación de riqueza, el héroe no es el trabajador manual ni el experto financiero; sino el innovador, quien combina el conocimiento, la imaginación y la acción. <sup>[1]</sup>

## 1.2. DISYUNTIVA SOBRE LA PATENTABILIDAD DE LAS INVENCIÓNES.

Las patentes al igual que los modelos de utilidad, son figuras jurídicas comprendidas dentro de los Derechos de Propiedad Intelectual y sobre las cuales, se han presentado numerosos argumentos sobre los pros y contras que trae a la sociedad el proteger a las invenciones mediante el sistema de patentes.

Es cierto que las grandes potencias que conocemos hoy en día, tales como: Japón, China y Estados Unidos, estuvieron en vías de desarrollo tal como lo es hoy México. En un principio importaron tecnología, y mediante ingeniería inversa lograron desarrollar la suya propia, para después proteger sus invenciones mediante el sistema de patentes. <sup>[1]</sup>

Esta es la evidencia fehaciente de que el sistema de patentes promueve el desarrollo científico y tecnológico de los países de origen; pero esto solo puede ser posible con una adecuada ley de protección a las invenciones.

Sin embargo hay numerosos casos en los cuales la industria trata de ampliar la protección de sus invenciones mediante diversas actividades, tanto en la duración de la exclusividad, como en la ampliación del campo de aplicación; mismas que podrían poner en riesgo el bienestar de la sociedad.

*...“Dicen que la ciencia se ha ocupado de descifrar el código informático de la vida y que ahora las multinacionales quieren cultivarlo en sus laboratorios para que no ande suelta por ahí, loca derrochando colores y alegrías cada primavera. Pero la vida es música. Tiene notas, ritmos, cadencias y melodías propias. Y es una magia poderosa y juguetona que mueve el corazón, los pies y el alma. Y la vida, así como la música, se hizo para desparramarse, regalando igual a los pobres y a los poderosos. Por eso ahora que el capital quiere adueñarse de las notas con las que se componen las canciones diversas de la vida es preciso pararle los pies entre todos.”... <sup>[3]</sup>*

Actualmente el capital transnacional quiere introducir en el mercado las propias bases de la vida y su capacidad reproductiva reduciendo la diversidad de la naturaleza a recursos genéticos sobre los cuales reclama derechos de explotación exclusiva con la idea de promover el desarrollo científico y tecnológico.

La Unión Europea aprobó en julio de 1988 una nueva directiva sobre Invencciones Biotecnológicas que amplía el campo de las patentes a las plantas, a los animales y a la materia biológica humana.

Como suele ocurrir en estos casos, la capacidad biotecnológica no anda bien repartida por el mundo. La investigación en ingeniería genética que es muy cara y especializada está dominada en la actualidad por un número cada vez menor de empresas transnacionales con sede en los países más ricos del mundo, encabezados por EU y Japón. Que en los últimos años han ido absorbiendo progresivamente laboratorios independientes y casas de semillas, y hoy un puñado de consorcios agroquímico-farmacéuticos controla la práctica total de la investigación en este campo. Por otra parte, en aquellos países todavía pueden permitirse el lujo de financiar programas de investigación pública, una mayoría de las instituciones independientes han sido literalmente tomadas por la industria, que cofinancia proyectos de investigación que comparte laboratorios con universidades y centros oficiales de investigación, y que determina el destino de las inversiones públicas y la orientación de la investigación aprovechando los resultados en beneficio propio. <sup>[3 y 4]</sup>

### **1.3. PROPIEDAD INTELECTUAL.**

Desde los primeros escritos de Mesopotamia, pasando por el ábaco chino, la imprenta de Gutenberg, el motor de combustión interna, el transistor, la nanotecnología en el sector de los semiconductores, los fármacos tradicionales y los producidos por biotecnología. Un sinnúmero de inventos, descubrimientos e innovaciones, han hecho posible que la humanidad alcance el actual nivel de progreso tecnológico. Sin embargo, esto no hubiera sucedido sin los derechos de Propiedad Intelectual, que brindan protección a las creaciones del intelecto humano; y que además proveen la exclusividad de explotación a sus poseedores. Siendo así un incentivo a la creatividad humana.

He aquí las principales características de la mayoría de los tipos de propiedad: el titular de la propiedad tiene libertad para utilizarla como desea, siempre que ese uso no infrinja la ley, y para impedir a terceros que utilicen así ese objeto de su propiedad.

La expresión “Propiedad Intelectual” se reserva a los tipos de propiedad que son el resultado de creaciones de la mente humana. Es interesante observar que en el Convenio que establece la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI), la expresión “Propiedad Intelectual”, no tiene una definición más formal. Los Estados que elaboraron el Convenio decidieron establecer una lista de los derechos en su relación con:

“Las obras literarias, artísticas y científicas; las interpretaciones de los artistas intérpretes y las ejecuciones de los artistas ejecutantes, los fonogramas y las emisiones de radiodifusión, las invenciones en todos los campos de la actividad humana, los descubrimientos científicos; los dibujos y modelos industriales, las marcas de fábrica, de comercio y de servicio, así como los nombres y denominaciones comerciales, la protección contra la competencia desleal y “todos los demás derechos relativos a la actividad intelectual en los terrenos industrial, científico, literario y artístico”.

Por varias razones administrativas e históricas, la Propiedad Intelectual se aborda generalmente en el marco de los siguientes títulos principales:

- Las obras literarias, artísticas y científicas, por ejemplo, los libros. La protección de esta propiedad se rige mediante legislación relativa al Derecho de Autor.
- Las interpretaciones o ejecuciones, las emisiones de radiodifusión, por ejemplo, los conciertos. La protección de esta propiedad se rige mediante legislación relativa a los Derechos Conexos al Derecho de Autor.
- Las invenciones, por ejemplo, una nueva forma de motor de propulsión. La protección de las invenciones se rige mediante legislación relativa a las Patentes.
- Los dibujos y modelos industriales, por ejemplo, la forma de una botella de gaseosa. Los Dibujos industriales pueden estar protegidos por sus propias legislaciones especializadas o por la legislación en materia de Propiedad Industrial o de Derecho de Autor.
- Las marcas, las marcas de servicio y los nombres y designaciones comerciales, por ejemplo, los logos o los nombres de un producto que tiene un origen geográfico único como el Champagne. La protección se otorga normalmente mediante varias legislaciones.
- Los esquemas de trazado de circuitos integrados también se protegen mediante los Derechos de Propiedad Industrial.<sup>[5]</sup>

### **1.3.1. DERECHOS DE AUTOR.**

La educación, la ciencia y la cultura: condiciones insustituibles para el bienestar de las personas y el progreso de los pueblos. Cada día es mayor la conciencia de que el desarrollo de un país y el mejoramiento de las condiciones de vida de las personas, están fuertemente ligadas a la posesión de una educación satisfactoria, al avance de la ciencia y a la distribución equitativa de la cultura.

*...“La producción intelectual es tan importante o más que la producción material en el proceso de la construcción de un país por razón de que aquella es la base o fundamento de esta” ...*<sup>[6]</sup>

La doctrina de los derechos de autor será fundamentada en una doble necesidad:

- A. La necesidad de todos los hombres de tener acceso y disfrutar de los frutos del saber humano.

- B. La necesidad correlativa que existe en estimular la investigación y el ingenio compensando por ello a los investigadores, escritores, artistas e inventores.

El derecho de autor tiene por finalidad ofrecer protección a los autores de creaciones, tales como escritores, artistas y compositores musicales. Esas creaciones se conocen por lo general con el nombre de “obras”.

Las obras que se prestan a la protección por derecho de autor son, entre otras, las obras literarias como las novelas, los poemas y las obras de teatro; el material de referencia como las enciclopedias y los diccionarios, las bases de datos, los artículos de periódico; las obras artísticas como las pinturas, los dibujos, las fotografías y las esculturas, las obras arquitectónicas. Mediante el Derecho de Autor pueden también protegerse los programas informáticos.

Ahora bien, el Derecho de Autor no protege las ideas sino la expresión concreta de las mismas.

La protección por Derecho de Autor es automática, sin necesidad de registro ni de otros trámites. Una obra empieza a gozar de protección por derecho de autor desde su creación.

Ahora bien, numerosos países han adoptado un sistema de registro y depósito facultativos de las obras. Ese sistema contribuye, por ejemplo, a resolver litigios sobre la paternidad de la creación, transacciones financieras, ventas, y cesiones y transferencias de derechos.

En el Derecho de Autor están comprendidos dos tipos de derechos:

A. Los derechos patrimoniales, que permiten que el titular obtenga compensación financiera por el uso y la explotación de la obra.

B. Los derechos morales, cuya finalidad es velar por que se reconozca el vínculo personal que existe entre el autor su obra.

En México el derecho de autor está sujeto a un plazo: la protección se extiende durante la vida del autor y 100 años después de su muerte. Una vez que expira el plazo de protección, la obra pasa a ser del “dominio público”, lo que significa que a partir de esa fecha cualquier persona tiene la facultad de utilizar la obra sin tener que obtener autorización específica del titular del derecho de autor. <sup>[6 y 7]</sup>

### **1.3.2. DERECHOS CONEXOS.**

Los Derechos Conexos confieren protección a las siguientes categorías de personas y organizaciones:

- Artistas intérpretes y ejecutantes (actores, músicos, cantantes, bailarines, es decir, artistas en general), respecto de sus interpretaciones y ejecuciones.

- Productores de grabaciones sonoras (por ejemplo, grabaciones en casete y discos compactos), respecto de sus grabaciones.
- Organismos de radiodifusión respecto de sus programas de radio y de televisión.

Los Derechos de Autor y los Derechos Conexos protegen cosas distintas; y por ende son complementarios. Por ejemplo, en el caso de una canción, los Derechos de Autor protegen al compositor de la música y al autor de la letra; mientras que los Derechos Conexos, protegen a los artistas intérpretes de la canción.

En resumen, los Derechos Conexos serían aplicables a:

- Los músicos y el cantante que interpreten la canción.
- El productor de la grabación sonora en la que se incorpore la canción.
- El organismo que radiodifunda un programa que contenga la canción.

Como regla general, los artistas intérpretes y ejecutantes gozan de derechos patrimoniales para impedir la fijación, la radiodifusión y la comunicación al público de sus ejecuciones e interpretaciones. <sup>[7 y 8]</sup>

### **1.3.3. PROPIEDAD INDUSTRIAL.**

Comprende un grupo heterogéneo de figuras jurídicas que adoptan el ámbito empresarial; entre las cuales encontramos a: las patentes, los modelos de utilidad, los secretos industriales, los diseños industriales, las marcas, los nombres comerciales, las denominaciones de origen y los esquemas de trazado de circuitos integrados. <sup>[9]</sup>

#### **1.3.3.1. PATENTES.**

La patente es un derecho exclusivo que se concede sobre una invención, es decir, sobre un producto o un proceso, que ofrece una nueva manera de hacer algo o una solución nueva e inventiva a un problema. Así mismo para que una invención sea susceptible de protección por patente debe de cumplir tres requisitos: novedad, actividad inventiva y aplicación industrial. <sup>[9 y 10]</sup>

- **Novedad:**

Un invento es novedoso cuando la relación de causa y efecto entre el medio empleado y el resultado obtenido no era conocida en el “estado de la técnica”.

También existe la posibilidad de que el resultado sea conocido, pero se llegue a él a través de otros medios. En este sentido el titular de la patente no puede hacer nada.

- Actividad inventiva:

Existe cuando un técnico en la materia no deduce evidentemente del “estado de la técnica” la nueva propuesta que se pretende patentar.

No es necesario que la creación sea excepcional, genial o sorprendente; ya que la existencia del mérito inventivo no se relaciona con la sencillez o simplicidad del invento.

- Aplicación industrial:

Tiene por objeto excluir de su campo de aplicación las creaciones intelectuales puramente científicas, literarias y artísticas.

Ejemplo: una estatua como tal no puede ser usada en forma de que produzca un efecto funcional, ni produce un efecto funcional alguno. En cambio una nueva forma de una llave inglesa puede proporcionar ventajas en comparación con las que se tienen al emplear las llaves conocidas. La invención debe ser utilizable, es decir, materialmente realizable.

Se denomina “estado de la técnica”, al conjunto de conocimientos técnicos que se han hecho públicos mediante una descripción oral o escrita, por la explotación o por cualquier otro medio de difusión o información, en el país o en el extranjero.

- Lo que no se puede patentar:

- Los procesos esencialmente biológicos para la producción, reproducción y propagación de plantas y animales.
- El material biológico y genético tal como se encuentran en la naturaleza.
- Las razas animales.
- El cuerpo humano y las partes vivas que lo componen.
- Las variedades vegetales.

En México, las patentes tienen una vigencia de 20 años improrrogables, contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud con el pago de la tarifa correspondiente. <sup>[9 y 10]</sup>

- Trámite de Patente:

Después de haber constatado que la invención alegada cumple con los tres requisitos de patentabilidad antes descritos, el siguiente paso es llenar una solicitud de patente ante la oficina respectiva. En México ese trámite se efectúa en el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI), que es la autoridad administrativa en materia de propiedad industrial, cuyas facultades, entre otras son las siguientes:

Tramitar y, en su caso otorgar patentes de invención, y registros de modelos de utilidad, diseños industriales, marcas y avisos comerciales, emitir declaraciones de protección a denominaciones de origen, autorizar el uso de las mismas; la publicación de nombres comerciales, así como la inscripción de sus renovaciones, transmisiones o licencias de uso y explotación.

Una vez que se ha ingresado la solicitud de patente, la misma debe de pasar por dos tipos de exámenes, el *examen de forma* y el *examen de fondo*. El *examen de forma* tiene por objeto verificar que la documentación presentada está completa y debidamente llenada. El *examen de fondo* trata de la verificación de la novedad, actividad inventiva y aplicación industrial de la invención que solicita protección mediante patente.<sup>[11]</sup>

### 1.3.3.2. MODELOS DE UTILIDAD.

Existen creaciones del intelecto que implican una mejora en la utilización de objetos conocidos, dado que contribuyen a aumentar la funcionalidad al conferirles cualidades que los hacen más eficaces o cómodos para su aplicación o uso. Este es el factor determinante que justifica su protección jurídica.

La institución del modelo de utilidad es de origen alemán. Ello obedece a que el derecho germánico ha sido tradicionalmente uno de los más rigurosos en materia de patentabilidad, exigiendo que la invención presente una determinada altura inventiva. Pero en la constante evolución industrial y comercial, se han concebido avances o perfeccionamientos de objetos que carecen de mérito inventivo y que, por lo tanto, no serían patentables.<sup>[12]</sup>

En México, son registrables los modelos de utilidad que sean nuevos y susceptibles de aplicación industrial. Considerando como modelos de utilidad a los objetos, utensilios, aparatos o herramientas que, como resultado de una modificación en su disposición, configuración, estructura o forma, presenten una función diferente respecto de las partes que lo integran o ventajas en cuanto a su utilidad. Su registro tiene una vigencia de diez años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud.<sup>[9]</sup>

### 1.3.3.3. SECRETO INDUSTRIAL.

Un secreto puede definirse como la información que contiene una fórmula, un modelo o un patrón, una compilación de datos, un programa, un método, técnica o procedimiento, un dispositivo o mecanismo y que además:

- Puede utilizarse en una actividad Industrial o comercial.
- No es generalmente conocida en tal actividad industrial.
- Tiene valor económico debido a que no es generalmente conocida.
- Es objeto de medidas adecuadas para preservar su carácter secreto.

Se entiende entonces por secreto, todo aquel conocimiento que siendo útil a una empresa o persona, representa una ventaja competitiva en el rubro de actividad pertinente.

De acuerdo a la naturaleza de la información confidencial, corresponderá hablar de secreto científico, industrial o comercial. Observemos que está comprendida en este concepto toda información que es valiosa y mantenida en reserva.<sup>[12]</sup>

### **1.3.3.4. DISEÑOS INDUSTRIALES.**

Por diseño industrial se entiende el aspecto ornamental o estético de un artículo. El diseño industrial puede consistir en características tridimensionales, como la forma de un artículo, o en características bidimensionales, como la configuración, las líneas y el color.

Los diseños industriales se aplican a una amplia variedad de productos de la industria y la artesanía, que van desde los instrumentos técnicos y médicos a los relojes, las joyas, los electrodomésticos y aparatos eléctricos, pasando por los vehículos, las estructuras arquitectónicas, los estampados textiles, los bienes recreativos y otros productos de lujo.

En la mayoría de las legislaciones nacionales se estipula que para que el diseño industrial goce de protección debe ser visualmente atractivo, lo que significa que el diseño industrial tiene un carácter principalmente estético y que no se protegen los rasgos técnicos del artículo al que se aplique.

1) En la mayoría de los países, el diseño industrial debe registrarse a fin de acogerse a la protección estipulada en la legislación de diseños industriales. Por norma general, para ser susceptible de registro, el diseño debe ser “nuevo” u “original”. La definición de dichos términos varía de un país a otro, como también varía el procedimiento de registro. Por lo general, por “nuevo” se entiende que no se tiene conocimiento de que haya existido anteriormente un diseño idéntico o muy similar. Una vez registrado el diseño, se emite un certificado de registro.

2) Dependiendo de la legislación nacional de que se trate y del tipo de diseño, los diseños industriales también pueden quedar protegidos como obras de arte en virtud de la legislación de derecho de autor. En ese caso no es preciso efectuar un registro.

En algunos países es posible obtener una protección doble, es decir, en virtud de la legislación de diseños industriales y en virtud de la legislación de derecho de autor. En otros países, las legislaciones se excluyen mutuamente: si el titular escoge un tipo de protección no puede acogerse a la otra.

3) En otros países, los diseños industriales pueden ser protegidos contra la imitación en virtud de la legislación sobre competencia desleal.

El titular de un diseño industrial protegido goza del derecho a impedir la copia no autorizada o imitación del diseño por terceros. En ese derecho está incluido el derecho a fabricar, ofrecer, importar, exportar o vender todo producto en el que esté incorporado el diseño o al que se haya aplicado el mismo. Tiene también derecho a conceder una licencia o autorizar a terceros para utilizar el diseño sobre la base de condiciones convenidas de mutuo acuerdo. Por último, goza también de la prerrogativa de vender el derecho sobre el diseño industrial a terceros.

Por lo general, en las legislaciones de diseños industriales se contempla un plazo de protección de cinco años, con la posibilidad de renovar ese plazo por un período máximo de 15 años. <sup>[9 y 12]</sup>

### 1.3.3.5. MARCAS.

Una **marca es un signo** que permite identificar ciertos productos y servicios con los que fabrica o suministra una persona o empresa. Por consiguiente, contribuye a diferenciar los productos y servicios de los de la competencia.

Por ejemplo, “DELL” es una marca que identifica productos (computadoras y objetos informáticos).

Las marcas pueden consistir en una palabra (por ejemplo, Kodak) o en una combinación de palabras (Coca-Cola), letras y siglas (por ejemplo, EMI, MGM, AOL, BMW, IBM), cifras (por ejemplo, 7/11) y nombres (Ford y Dior) o abreviaturas de nombres (por ejemplo, YSL para Yves Saint Laurent). Pueden también consistir en dibujos (como el logotipo de la compañía petrolera Shell o el dibujo de un pingüino para los libros Penguin) o en signos tridimensionales como la forma y el embalaje de productos (por ejemplo, la forma de la botella de Coca-Cola o el embalaje del chocolate Toblerone). Pueden también consistir en una combinación de colores o en un único color (por ejemplo, el color naranja que utiliza la compañía telefónica ORANGE). Los signos no visibles, como la música y los olores, también pueden constituir marcas.

Ahora bien, en todos esos casos, la marca debe ser distintiva, a saber, debe poder diferenciar los productos y servicios a los que se aplique.

Existen otras categorías de marcas además de las marcas que identifican la fuente comercial de los productos y servicios.

Las **marcas colectivas** son marcas que se utilizan para indicar que los productos o servicios han sido fabricados o son suministrados por los miembros de una asociación. Se utilizan también para identificar los servicios suministrados por los miembros de una organización o entidad (por ejemplo, VISA).

Las **marcas de certificación** son marcas que se utilizan para los productos y servicios que satisfacen ciertas normas y que han sido certificadas como tales (por ejemplo, el símbolo Woolmark, que indica que los productos están confeccionados con 100% de lana y que son

conformes a las especificaciones de utilización de la Woolmark Company. Esa marca está registrada en 140 países y se han concedido licencias de utilización a fabricantes de 67 países que están en condiciones de cumplir esas normas de calidad).

Las marcas desempeñan varias funciones, en particular:

- Ayudan al consumidor a identificar y distinguir productos o servicios.
- Permiten que las empresas diferencien sus productos.
- Constituyen una herramienta de comercialización y de creación de imagen y reputación.
- Pueden ser objeto de licencia y constituir una fuente directa de ingresos mediante el cobro de regalías.
- Son un componente fundamental de los activos de las empresas.
- Estimulan a las empresas a invertir en el mantenimiento y la mejora de productos de calidad.
- Pueden ser útiles a la hora de obtener financiamiento.

La forma más común y eficaz de proteger una marca es la inscripción en el Registro. Las marcas son derechos territoriales, lo que significa que deben ser registradas por separado en cada país en el que se desee obtener protección.

Cabe señalar que, si no está protegida en un país, la marca puede ser utilizada libremente por terceros.

Si bien la duración de la protección puede variar (por lo general es de 10 años), el registro de la marca puede renovarse indefinidamente a condición de pagar las tasas correspondientes. <sup>[13]</sup>

### **1.3.3.6. NOMBRES COMERCIALES.**

Los nombres y las designaciones comerciales constituyen otra categoría dentro del ámbito de la propiedad industrial. Por nombre comercial se entiende el nombre o la designación que permite identificar a una empresa. En la mayoría de los países, los nombres comerciales se registran ante las debidas autoridades gubernamentales. Ahora bien, según lo dispuesto en el artículo 8 del Convenio de París para la Protección de la Propiedad Industrial, los nombres comerciales gozan de protección automática sin que exista la obligación de depósito o de registro, y formen o no parte de una marca. Por protección se entiende, por lo general, que el nombre comercial de una empresa no puede ser utilizado por otra, ya sea como nombre comercial o como marca de comercio de servicios y, en la medida en que ello pueda inducir a error al público, no puede utilizarse el nombre ni una designación similar al nombre comercial de que se trate. <sup>[13]</sup>

## **1.3.3.7. DENOMINACIONES DE ORIGEN.**

Se utiliza para productos que tienen cualidades específicas que se deben exclusiva o esencialmente al entorno geográfico de la elaboración del producto. Entre los ejemplos de denominaciones de origen protegidos en los Estados parte en el Arreglo de Lisboa relativo a la Protección de las Denominaciones de Origen y su Registro Internacional están “Habana”, que se utiliza para el tabaco cultivado en la región cubana de La Habana, o “Tequila”, para bebidas alcohólicas que se elaboran en zonas específicas de México.

En el plano nacional, las indicaciones geográficas son objeto de protección con arreglo a una amplia gama de instrumentos, como las leyes contra la competencia desleal, las leyes de protección del consumidor, las leyes de protección de las marcas de certificación o leyes especiales de protección de las indicaciones geográficas o las denominaciones de origen. En esos textos de ley se estipula, para resumir, la imposibilidad de que terceros utilicen indicaciones geográficas en la medida en que dicha utilización pueda inducir al público a error en cuanto al verdadero origen del producto. Entre las sanciones que pueden aplicarse a infracciones en esa esfera están requerimientos judiciales en los que se estipule la prohibición de utilización no autorizadas, el pago de indemnización por daños y perjuicios y de multas y, en casos más graves, penas de cárcel. <sup>[11 y 13]</sup>

## **1.3.3.8. ESQUEMAS DE TRAZADO DE CIRCUITOS INTEGRADOS.**

El problema de determinar qué tipo de protección debe concederse en relación con los esquemas de trazado o topografías de los circuitos integrados es relativamente nuevo. Aunque los componentes prefabricados de circuitos electrónicos llevan utilizándose desde hace mucho en la fabricación de equipos electrónicos (como las radios), la integración a gran escala de una amplia gama de funciones eléctricas en un componente de muy pequeña talla pasó a ser posible a raíz de los progresos realizados en la tecnología de los materiales semiconductores. La fabricación de circuitos integrados se realiza conforme a planes o esquemas de trazado sumamente detallados.

Es constante la necesidad de nuevos esquemas de trazado que reduzcan la dimensión de los circuitos integrados y permitan que estos últimos desempeñen un número mayor de funciones. Cuanto más pequeño sea el circuito integrado menor material será necesario para su fabricación y menor el espacio necesario para su integración. Los circuitos integrados se utilizan en una amplia gama de productos, tanto artículos de uso diario como los relojes, los televisores, las lavadoras y los coches como productos más complejos, como las computadoras y los servidores informáticos.

Los esquemas de trazado de los circuitos integrados no suelen ser invenciones patentables en la medida en que en su creación no cabe hablar de actividad inventiva aunque requieran mucho

trabajo por parte de un experto. Esos esquemas tampoco pueden acogerse a la protección por derecho de autor en la medida en que las leyes nacionales determinen que los esquemas de trazado no son susceptibles de protección por esos medios.

En respuesta a la incertidumbre en relación con la protección de los esquemas de trazado, el 26 de mayo de 1989 se adoptó, bajo los auspicios de la OMPI, el Tratado de Washington sobre la Propiedad Intelectual respecto de los Circuitos Integrados. <sup>[9]</sup>

### **1.4. PROPIEDAD INTELECTUAL Y LOS RECURSOS GENÉTICOS EN EL NUEVO CONTEXTO INTERNACIONAL.**

Los minerales, el petróleo y los recursos genéticos en cuanto a riquezas naturales o sociales del planeta, tienen muchas características en común, pero difieren en muchas otras. Comparten una distribución geográfica desigual, esto es, se localizan sólo en algunas zonas de la Tierra, con extensiones variables en algunos países en desarrollo.

No obstante mientras que el consumo creciente y la disponibilidad reducida del petróleo, por ejemplo, han dado pie a una preocupación general y ha permitido a los países productores acumular riquezas y acceder a tecnologías modernas, así como a estimular la búsqueda de otras fuentes de energía alternativas, nada similar ocurre con los recursos genéticos. El público general no parece estar lo suficientemente preocupado a causa de la rápida extinción de la biodiversidad, y los países dotados de recursos tampoco han obtenido beneficio directo derivado de sus usos. Sin embargo, si se han beneficiado de modo significativo en términos de mayor seguridad en la producción de alimentos, al compartir los avances en cultivos mejorados asociados al libre acceso a recursos genéticos.

La humanidad ha obtenido enormes beneficios económicos como resultado del libre acceso a recursos genéticos en lo que se refiere a alimentos; medicinas y productos industriales; pero ahora se expresan preocupaciones tanto acerca de los riesgos implícitos como de las condiciones en torno al acceso.

La razón principal de esta aparente discriminación económica, si se compara el manejo de recursos genéticos con otros bienes, en su fortaleza y a la vez en su debilidad: las plantas, animales, microorganismos y otros materiales biológicos constituyen recursos renovables, capaces de replicarse o de ser producidos en un sistema biológico. Se perpetúan gracias a la información contenida en su constitución genética, la cual heredan a sus progenies.

Sin embargo, mientras que plantas, animales y otros microorganismos, tomados como individuos constituyen bienes privados, no sucede lo mismo con la información genética que contienen y que garantiza su preservación. La capacidad inherente de los materiales biológicos de reproducirse por sí mismos, esto es, su carácter de portadores de información genética, fija claros límites a los

reclamos de propiedad; una vez que esta se adquiere, sea o no por medios legales, le resulta imposible al dueño original demostrar que la información genética utilizada le pertenece; así como con las semillas recuperadas para futuras propagaciones, con genes aislados para la producción de plantas o animales transgénicos, con proteínas importantes obtenidas mediante cultivos celulares para la producción sintética de sustancias bioquímicas activas y valiosas.

El carácter de la autoreproducción ha hecho que las invenciones fincadas en el material biológico replicante sean particularmente susceptibles de ser copiadas y explotadas por sujetos distintos al inventor. Las invenciones con esos atributos resultan difíciles de comercializar, y en ese sentido, la protección de la propiedad intelectual permite establecer condiciones para hacer factible su comercialización. Los derechos de propiedad intelectual proporcionan cierta seguridad al inventor a poder afrontar los frecuentes y considerables riesgos y costos inherentes al desarrollo de un producto con base en recursos biológicos.

La convención sobre biodiversidad, firmada el 5 de junio de 1992 en Río de Janeiro, reitera el principio del derecho soberano de las naciones sobre sus recursos naturales, y esto incluye la autoridad para determinar el acceso a recursos genéticos mediante legislaciones nacionales.<sup>[14]</sup>

### **1.5. FORMAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL RELACIONADAS CON LA BIOTECNOLOGÍA.**

Para la biotecnología en general, las patentes son de particular interés, especialmente para la Industria Farmacéutica y de Agrobiotecnología. Para que una invención (ya sea producto o proceso). Pueda ser patentada, debe ser nueva, constar de un paso inventivo y ser útil, esto es tener una aplicación industrial u algún otro uso práctico. Toda solicitud de patente se examina de manera crítica y oficial haciendo hincapié en estos requisitos.

*Las sustancias formadas de manera natural*, presentes como componentes de mezclas complejas, pueden en principio ser patentados cuando se aíslan de sus entornos, se identifican y se ponen a disposición del público por primera vez y se desarrolla un procedimiento para producirlas de manera que puedan ser utilizadas con fines prácticos. Esto se aplica tanto a sustancias de interés como a materia viva. En circunstancias que lo ameriten, tales sustancias no solo se clasifican como “descubrimientos”, sino que las autoridades legales les conceden la categoría de inventos.

*Las patentes de microorganismos* pueden ahora obtenerse en la mayoría de los países industrialmente desarrollados gracias a la decisión histórica de 1980 de la suprema corte de los Estados Unidos, que establece que la naturaleza viviente de los microorganismos no los excluye de ser patentables.

*Las patentes de plantas* pueden obtenerse así mismo en Estados Unidos, Europa, Japón, Australia y otros países. Para evitar confusiones legales; por ejemplo, en la disposición prototipo de la

Convención Europea sobre patentes (CEP), el artículo 53(b) excluye las patentes para “variedades de plantas y animales” y para “procesos biológicos esenciales para producir plantas y animales”.

*Las razas animales* producidas por métodos tradicionales no gozan de un sistema legal de protección comparable con el de los derechos que si tienen los fitogenetistas. En un principio, en Estados Unidos pueden obtenerse patentes para organismos artificiales (que no ocurren por si solos en la naturaleza), vivos, multicelulares, no humanos, pero que incluyen a los animales. La primera patente a un animal transgénico se otorgó en 1988 a la Universidad de Harvard dándole derechos sobre el “onco-ratón”, animal al que se le había introducido un oncogen para hacerlo más susceptible al cáncer y, por lo tanto, más sensible a posibles cancerígenos de prueba. En los países europeos hay también patentes disponibles para animales transgénicos. Una patente europea se otorgó al onco-ratón, pero actualmente se oponen a ella diversos grupos preocupados por el bienestar animal.

*Las patentes sobre compuestos* químicos correspondientes a secuencias de nucleótidos pueden también obtenerse en países industrialmente desarrollados. Las autoridades competentes de los países donde existe oposición a estas patentes consideran que el gen, en su estado natural, no se puede patentar, pero si se le puede otorgar una patente cuando se aísla y se produce para fines prácticos, industriales o con otros propósitos útiles. <sup>[14]</sup>

### 1.6. CÁNCER CÉRVICOUTERINO.

Desde hace unos veinte años, la autora norteamericana Susan Sontag publicó en su libro *La enfermedad y sus metáforas*, que causó sensación a escala mundial. En él se ocupa de las ideas y fantasías que se generan en torno a la metáfora del cáncer. Como pudo demostrar la autora recurriendo a muchas citas en la literatura y a lugares comunes muy extendidos, tienden a originar la profunda inseguridad y una dura carga emocional no solo en los afectados, sino también en sus familiares, amigos y los médicos que los asisten. Para muchos de ellos, la palabra “cáncer” evoca una imagen de creencias incontrolablemente destructivas, de decadencia, lenta agonía y muerte, pero también, algo de lo que habría de avergonzarse, es algo de lo que uno mismo es responsable. <sup>[15]</sup>

El término cáncer agrupa un término mayor a cien enfermedades neoplásicas, ya que cada tejido puede dar origen a un tumor maligno y algunos incluso pueden dar origen a más de un tipo. La célula cancerosa se caracteriza por la pérdida de los mecanismos normales de control en la división celular, lo cual se transmite de una a otra generación, evidenciando el involucramiento del material genético. La transformación maligna de las células se relaciona con la alteración de la estructura por mutaciones o arreglos genéticos y requiere dos o más mutaciones para transformar la célula normal en una cancerosa. Actualmente es posible identificar la susceptibilidad de los individuos para desarrollar algún tipo de neoplasia, pero estamos lejos de establecer medidas efectivas para su prevención. <sup>[16]</sup>

### 1.6.1. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.

Desde tiempo atrás se tenía el conocimiento de que algunas verrugas (que son producidas por el virus del papiloma humano), sobre todo en la región anogenital, sufrían un cambio hacia lesiones neoplásicas. En 1925, Buschke y Lowenstein describieron un tumor peculiar del área genital, del tipo verrugoso, histológicamente muy bien definido y con características macro y microscópicas de un condiloma acuminado gigante. Esta lesión finalmente se transformaba en un tumor maligno.

Numerosos estudios han señalado claramente que el cáncer cervicouterino tiene un patrón epidemiológico efectivamente relacionado con el comportamiento sexual de las pacientes.

Fue en 1976 cuando Sur Hausen planteó su hipótesis en la cual propone al virus del papiloma humano (VHP) como el agente sexualmente transmitido responsable de la transformación neoplásica en el cuello uterino. Posteriormente esta hipótesis fue validada, tanto por estudios epidemiológicos, como por la evidencia molecular de que el ADN del virus del papiloma está integrado en las células neoplásicas en más del 90% de los carcinomas cervicales, con lo que se puede asegurar, sin lugar a dudas, el papel causal que el virus del papiloma humano tiene en el desarrollo del cáncer cervicouterino. <sup>[16]</sup>

### 1.6.2. BIOLOGÍA DEL VPH.

El virus del papiloma humano es miembro de la familia Papoviridae. Los papilomavirus se caracterizan por ser virus pequeños, con un genoma de ADN circular, de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases de longitud, con un virión no envuelto que mide de 45-55nm de diámetro y una cápside proteica icosaédrica. Su genoma contiene 9-10 regiones codificantes que se denominaron marcos de lectura abierta. dichas regiones son segmentos de ADN que contienen secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas no estructurales involucradas en la regulación de las funciones virales y las proteínas estructurales involucradas en la producción de partículas infecciosas.

El primer paso para la infección por el VHP es el contacto por viriones intactos con las células inmaduras del epitelio escamoso, después del virus en el epitelio pueden ocurrir dos clases de infecciones: latentes o productivas.

En la infección de tipo latente de ADN viral permanece el núcleo en su forma circular, libre o episomal; el virus se mantiene en la superficie sin replicarse y no ocurren cambios morfológicos identificables, por lo cual la detección de esta infección solo puede efectuarse mediante métodos moleculares. Por el contrario, en la infección activa o productiva existe una intensa actividad de replicación del ADN viral, con generación de viriones, misma que se lleva a cabo en las células escamosas diferenciadas, esto es en las capas intermedia, y superficial del epitelio escamoso con producción de proteínas de cápside y síntesis de gran cantidad de ADN viral que inducen cambios celulares característicos en las células infectadas, los cuales son detectables por citología y por histología. <sup>[17]</sup>

### 1.6.3. TIPOS DE VPH.

Los VPH originan una variedad de lesiones proliferativas en la piel, la mucosa oral, la laringe y la región anogenital. Actualmente han sido clonados más de 100 tipos de VPH y por lo menos 20 de ellos muestran tropismo por el tracto anogenital.

Se han descrito tres grupos clínico-patológicos del VHP; cutáneo, mucoso y de la epidermodisplasia verruciforme. Y a su vez en subgrupos de bajo y alto riesgo. Cabe destacar que dentro de todas las lesiones intraepiteliales e invasoras, tanto en el epitelio escamoso como en el glandular se encuentran tipos de VHP clasificados como de alto riesgo; tales como los tipos: 16, 18, 31, 33, 35 y 39 por mencionar algunos. <sup>[18]</sup>

### 1.6.4. TRASTORNOS ASOCIADOS AL CÁNCER.

Dolor: en los estadios avanzados, de 55% a 95% de los enfermos con cáncer sufre dolor, y en un 25% es de intensidad grave hasta que el paciente muere. La organización mundial de la salud establece que el dolor causado por cáncer se debe tratar de acuerdo a una escala analgésica de intensidad del dolor; en dicha escala, se utilizan analgésicos no opiáceos, opiáceos y medicamentos adyuvantes, con una eficacia del 90%.

Depresión y ansiedad: los trastornos psicológicos en el enfermo con cáncer son reacciones emocionales a diferencias estructurales y funcionales, que acompañan el curso de la enfermedad y su tratamiento. Los más frecuentes comprenden la ansiedad y la depresión que se presentan en 82% de los pacientes, y con respecto a la frecuencia, le siguen las alteraciones psicosomáticas en 59% de los enfermos.

La ansiedad es el temor a algo no bien definido, a una amenaza flotante, a algo que es desconocido. También puede llamarse angustia.

La depresión es un trastorno del estado afectivo, en el cual un impulso vital se dirige hacia abajo, hay falta de interés y motivación, el mundo externo parece no importar y aparecen ideas esperanzadoras y de minusvalía.

Nausea y vómito: la prevención y el control de la náusea y vómito son trascendentales en el tratamiento del paciente con cáncer; ya que pueden ser el origen de graves alteraciones metabólicas, deterioro del estado físico y mental del paciente, desgarros esofágicos, fracturas óseas.

A pesar de los avances en el tratamiento farmacológico, la náusea y el vómito continúan siendo dos de los efectos colaterales que más angustian al paciente con cáncer y a sus familias.

Pérdida de peso involuntaria: es una manifestación frecuente en la práctica clínica y motivo de preocupación tanto para el paciente como para el médico que lo atiende, y para el último significa un verdadero reto. No obstante de ser un motivo frecuente de consulta clínica, su diagnóstico diferencial incluye una lista casi interminable de causas potenciales. <sup>[19]</sup>

En el ámbito internacional, el cáncer cervicouterino es la segunda causa de morbilidad y mortalidad por cáncer en la mujer. En 2000, se calculó que habría 470.606 casos nuevos y 233.372 defunciones al año entre las mujeres de todo el mundo. Además, se calculó que más del 80 por ciento de esta carga se presentaría en los países menos desarrollados, donde esta enfermedad es la segunda neoplasia maligna causante de muerte entre las mujeres.<sup>[20]</sup>

### 1.6.5. TERAPIAS PARA EL CÁNCER.

Las principales terapias para el cáncer comprenden la cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia; que son elegidos de acuerdo al estadio de la enfermedad en la que se encuentren.

Cirugía: es la técnica usada para remover los crecimientos cancerosos. Para varios tipos diferentes de cáncer, el retiro quirúrgico de un tumor puede ser suficiente para salvar al paciente. La probabilidad de una cura quirúrgica depende del tamaño, lugar, y etapa de desarrollo de la enfermedad. Cuando se remueve un tumor, el cirujano trata de remover lo más posible.

Radioterapia: También llamada terapia con rayos X o irradiación, es el uso de un tipo de energía (llamada radiación ionizante) para destruir las células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. La radioterapia lesiona o destruye las células en el área que recibe tratamiento al dañar su material genético y hacer imposible que crezcan y se dividan. Aunque la radiación daña las células cancerosas así como las normales, muchas células normales se recuperan de los efectos de la radiación y funcionan adecuadamente. El objeto de la radioterapia es destruir el mayor número posible de células cancerosas y limitar el daño que sufre el tejido sano del derredor.

Alrededor de la mitad de los pacientes con cáncer reciben algún tipo de radioterapia. Se puede usar la radioterapia sola o en combinación con otros tratamientos de cáncer, como la quimioterapia o la cirugía. En algunos casos, es posible que el paciente reciba varios tipos de radioterapia.

Quimioterapia: es un tipo de tratamiento contra el cáncer. Usa medicamentos para destruir las células cancerosas.

Las células cancerosas crecen y se dividen rápidamente. La quimioterapia para o demora el crecimiento de las células cancerosas. Pero también puede afectar las células sanas que crecen y se dividen rápidamente.

El daño a las células sanas podría causar efectos secundarios. Pero muchas veces los efectos secundarios mejoran o desaparecen después de terminar la quimioterapia.

Trasplante de médula ósea y trasplante de células madre de sangre periférica: La médula ósea es un material blando parecido a una esponja que se encuentra en el interior de los huesos. La médula ósea contiene células inmaduras llamadas células madre hematopoyéticas que son las células madre que forman la sangre. (Las células madre hematopoyéticas no son como las células madre embrionarias, las cuales se pueden convertir en cualquier tipo de célula del cuerpo). Las células madre hematopoyéticas se dividen para crear más células madre que forman la sangre, o

se transforman en una de estas tres clases de células sanguíneas: glóbulos blancos que combaten la infección; glóbulos rojos que transportan el oxígeno; o plaquetas que ayudan a que coagule la sangre. La mayor parte de las células madre hematopoyéticas se encuentran en la médula ósea, pero algunas células, las células madre de sangre periférica, se encuentran en el torrente sanguíneo. La sangre en el cordón umbilical también contiene células madre hematopoyéticas. Las células que provienen de cualquiera de estas fuentes se pueden usar para realizar trasplantes.

El trasplante de médula ósea (*bone marrow transplantation*, BMT) y el trasplante de células madre de sangre periférica (*peripheral blood stem cell transplantation*, PBSCT) son procedimientos que restauran las células madre que fueron destruidas a causa de una dosis alta de quimioterapia o de radioterapia. <sup>[21]</sup>

### 1.6.6. BÚSQUEDA DE ALTERNATIVAS Y USO DE COMPUESTOS NATURALES COMO LOS PROVENIENTES DE ALGAS MARINAS.

Las terapias conocidas contra el cáncer producen muchos efectos secundarios que pueden poner en riesgo la salud integral del paciente; es por eso que numerosos investigadores se han dado a la tarea de probar distintas alternativas, que sean efectivas y menos dañinas para el hombre. De esta forma los productos naturales o metabolitos secundarios de origen marino están recibiendo una mayor atención debido a que se ha probado que son una fuente importante de nuevas moléculas orgánicas.

Los organismos marinos están sujetos a condiciones ambientales completamente distintas a las presentes en ambientes terrestres, éstas determinan que las rutas biosintéticas también sean diferentes, por esta razón los organismos marinos pueden generar metabolitos secundarios con estructuras químicas únicas y distintas a las encontradas en ambientes terrestres.

Especies del género *Sargassum* han sido empleadas en la medicina tradicional china para varios tipos de enfermedades. Entre las propiedades terapéuticas más importantes de las especies de *Sargassum* se encuentran las siguientes: anticancerígena, antiinflamatoria, antibacterial, antifúngica, anticoagulante, antioxidante, antiviral e inmunorreguladora. Aunque los mecanismos de acción siguen siendo desconocidos, sus propiedades farmacológicas podrían ser principalmente atribuidas a sus metabolitos activos tales como triterpenoides, fluorotanninos, fucoidanos, esteroides y glicolípidos. Una amplia gama de propiedades farmacológicas de sus extractos de o componentes puros aislados han sido reconocidos. En general las numerosas especies de *Sargassum*, su química compleja y diversas propiedades farmacológicas hacen necesaria una evaluación crítica y sistemática de sus futuras aplicaciones.

Otras aplicaciones terapéuticas importantes de las especies de *Sargassum* se mencionan a continuación: *Sargassum natans* (antibacterial y fungicida) <sup>[22]</sup>, *Sargassum thunbergii* (antitumoral) <sup>[23, 24 y 25]</sup> *Sargassum palmieri* <sup>[26]</sup> y *Sargassum acinacifolium* <sup>[27]</sup> (anticoagulantes), *Sargassum micracanthum* Kuetzing <sup>[28]</sup>, *Sargassum dentifolium* C Agardh (antioxidante) <sup>[29]</sup>, *Sargassum polycystum* C Agard (protector hepático) <sup>[30]</sup>.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Según datos del INEGI, en México; durante el periodo comprendido entre 2000 y 2010 se registraron en promedio 14,278 solicitudes de patente anualmente. De las patentes concedidas, el 98% corresponde a inventores extranjeros; mientras que el 2% restante corresponde a las patentes de inventores nacionales. Estos datos alarmantes, sin ninguna duda; son sinónimo de la poca cultura que se tiene en México sobre la protección a las creaciones del intelecto humano mediante el sistema de patentes. Y por otra parte, del tipo de investigación que se desarrolla en nuestro país. <sup>[31 y 32]</sup>

En México, nuestra “máxima casa de estudios”, la UNAM, fuente de investigadores, profesionistas y recursos humanos de calidad; contribuye solamente con el 8% de las patentes nacionales anualmente concedidas. <sup>[31, 32 y 33]</sup> Por lo que, es necesario tomar acción inmediata, a fin de promover un desarrollo de la cultura de la Propiedad Intelectual, no solo en las universidades e institutos de investigación, sino también en la población mexicana en general.

Para que una invención sea patentable, en general debe de cumplir tres requisitos: novedad, actividad inventiva y aplicación industrial. La evaluación de estas tres condiciones requiere un análisis exhaustivo por parte de los examinadores de las oficinas de patente de cada país para así poder dar un dictamen acertado a cada solicitud de patente. <sup>[34]</sup>

En particular, el trabajo realizado dentro del Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, brinda protección a sus trabajos de investigación mediante el sistema de patentes. Siendo la principal línea de investigación el cáncer cervicouterino y sobre la cual se han probado distintas alternativas de tratamiento, a fin de mejorar la calidad de vida de la población.

El presente trabajo tuvo como fin redactar la solicitud de patente del extracto de *Sargassum buxifolium* y su uso en el tratamiento del cáncer cervicouterino; delimitando el estado de la técnica para superar el examen de fondo a realizar en el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

### 3. OBJETIVOS:

#### 3.1. GENERAL.

Elaborar la solicitud de patente del extracto de *Sargassum buxifolium* y su uso en el tratamiento del cáncer cervicouterino, auxiliándose del estado de la técnica y la información obtenida dentro del Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

#### 3.2. PARTICULARES.

Analizar el estudio del estado de la técnica del extracto de *Sargassum buxifolium* y su uso en el tratamiento del cáncer cervicouterino.

Reproducir la invención en el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Redactar la solicitud de patente del extracto de *Sargassum buxifolium* y su uso en el tratamiento del cáncer cervicouterino.

### 4. HIPÓTESIS:

Si se demuestra la novedad, actividad inventiva y aplicación industrial del extracto de *Sargassum buxifolium* y su uso en el tratamiento del cáncer cervicouterino; entonces se podrá elaborar la solicitud de patente de la invención realizada.

## 5. MATERIAL Y MÉTODO:

### 5.1. ESTUDIO DEL ESTADO DE LA TÉCNICA.

Se realizó una búsqueda de artículos científicos, patentes y solicitudes de patente en internet para analizar el estado de la técnica del extracto de *Sargassum buxifolium* y su uso en el tratamiento del cáncer cervicouterino.

Los documentos fueron leídos uno por uno y se evaluó su relevancia con el extracto de *Sargassum buxifolium* y su uso en el tratamiento del cáncer cervicouterino.

### 5.2. REPRODUCIBILIDAD DE LA INVENCIÓN.

Con el fin de verificar la reproducibilidad de la invención se evaluaron las propiedades antiproliferativas del extracto de *Sargassum buxifolium* mediante la cinética de proliferación para las líneas celulares CALO e INBL.

Se emplearon cultivos celulares de Cáncer Cervicouterino en estadios terminales (líneas celulares CALO e INBL). Dichas células fueron descongeladas y cultivadas en medio RPMI1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino y fueron incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y a una atmosfera húmeda saturante. Durante 1 a 9 días.

Como control, fueron empleadas las células en las mismas condiciones, pero sin el extracto.

### 5.3. SOLICITUD DE PATENTE:

Se redactó la solicitud de patente conteniendo siguientes apartados:

1. Título: Se redactó en forma descriptiva de lo que es o lo que hace la invención.
2. Campo de la invención: Se redactó campo técnico al que se refiere la invención.
3. Antecedentes de la invención: Se redactó la información técnica relacionada al extracto de *Sargassum buxifolium* y su uso en el tratamiento del cáncer cervicouterino.
3. Descripción detallada de la invención: Se redactó el proceso de obtención del extracto de *Sargassum buxifolium* y su uso en el tratamiento del cáncer cervicouterino.
4. Breve descripción de las figuras: Se incluyó la enumeración de las figuras haciendo referencia a ellas y a las distintas partes de que estén compuestas para ayudar a explicar la o las características de la invención.

5. Ejemplo: Se incluyó el mejor método conocido por el solicitante para llevar a cabo la invención.
6. Reivindicaciones: Se redactaron en función de las características técnicas de la invención.
8. Resumen de la descripción de la invención: Se redactó la síntesis de la divulgación contenida en la solicitud.
9. Figuras o dibujos: Se incluyeron las figuras o dibujos relativos a la invención.

Las hojas que contienen la descripción, las reivindicaciones, el resumen y los dibujos se ordenaron y enumeraron consecutivamente; además de cumplir los siguientes requisitos:

- Utilizar papel blanco tipo Bond de 36 Kg.
- Ser legibles de tal manera que puedan reproducirse por fotografía, procedimientos electrónicos, offset o microfilme.
- Ser de formato rectangular de 21.5 x 28 cm. (tamaño carta), o de formato A4 (21 x 29.7 cm).
- Utilizarse sólo por un lado y en sentido vertical.
- Tener los siguientes márgenes en blanco: mínimo de 2 cm. en el superior, en el inferior y en el derecho y de 2.5 cm en el izquierdo. Máximo de 4 cm. en el superior e izquierdo y de 3 cm. en el derecho y el inferior.
- Las hojas que contengan los dibujos se presentan sin marco y tienen una superficie utilizable que no excede de 17.5 x 24.5 cm.
- La descripción, las reivindicaciones y el resumen se ordenan y enumeran consecutivamente, con números arábigos colocados en el centro de la parte superior o inferior de las hojas, sin invadir los márgenes especificados. Después del resumen, se incluyen los dibujos, pudiendo numerar por separado las hojas, por ejemplo, si son 3, quedan 1/3, 2/3 y 3/3.
- No presentar arrugas, rasgaduras o enmendaduras.
- Estar razonablemente exentas de borraduras y no contener correcciones, tachaduras, ni interlineaciones.

La escritura de los textos de la descripción, las reivindicaciones y el resumen cumplió con los siguientes requisitos:

- Ser mecanografiada o impresa, salvo en el caso de los símbolos y caracteres gráficos y las fórmulas químicas o matemáticas, que pueden escribirse en forma manuscrita o dibujarse, siempre que fuere necesario.
- Redactarse con un espacio entre líneas de 1 1/2 o doble espacio y numerando al margen izquierdo, por lo menos de 5 en 5 los renglones de cada hoja.
- Hacerse con caracteres cuyas mayúsculas no sean inferiores a 0.21 cm de alto y de color negro e indeleble.

## 6. RESULTADOS:

### 6.1. ESTADO DE LA TÉCNICA:

#### ARTÍCULOS DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA:

**D1:** Por casi 2000 años, especies del género *Sargassum* han sido empleadas en la medicina tradicional china para varios tipos de enfermedades. Entre las propiedades terapéuticas más importantes de las especies de *Sargassum* se encuentran las siguientes: anticancerígena, antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica, anticoagulante, antioxidante, antiviral e inmunorreguladora. Una amplia gama de propiedades farmacológicas de sus extractos de o componentes puros aislados han sido reconocidos. Sin embargo, las numerosas especies, la química compleja y diversas propiedades farmacológicas del género *Sargassum* necesitan una evaluación crítica y sistemática en su investigación y futuras aplicaciones (Liu L et al, 2012).

**D2:** Evalúa las propiedades antiproliferativas de los polisacáridos extraídos de *Sargassum fusiforme* en modelos in vivo e in vitro con células tumorales A549 correspondientes a cáncer de pulmón. La extracción es llevada a cabo con agua caliente y posterior precipitación con etanol (Chen X et al, 2011).

**D3:** Evalúa las propiedades antiproliferativas de los polisacáridos extraídos de *Sargassum pallidum* en muestras de actividad en células HepG2, A549 y MGC-803. La extracción se lleva a cabo empleando técnicas de separación por membrana, extracción de CO<sub>2</sub> y ultrasonificación (Ye H et al, 2008).

**D4:** Evalúa las propiedades de diferentes fracciones de extractos de polisacáridos solubles en agua de *Sargassum latifolium*, muestran una actividad antiproliferativa prometedora contra leucemia linfoblástica (Gamal-Eldeen A. M. et al, 2009).

#### LITERATURA DE PATENTES:

**D5:** La patente US 8, 168,173 que describe un proceso para obtener un suplemento energético que comprende una mezcla de algas entre las cuales se encuentra el género *Sargassum*; la mezcla se seca y se esteriliza con isótopos isotérmicos y se presenta en cápsulas.

**D6:** La solicitud de patente US 20080145380 comprende un suplemento nutricional para el tratamiento del cáncer, esta se puede presentar en tabletas, cápsulas, jarabe o bolsitas. Comprende mezclas de algas verde azules y pardas; entre las cuales se encuentra *Sargassum*. El suplemento nutricional comprende la adición de vitaminas y minerales y además excipientes para poder presentar el suplemento en las formas antes mencionadas.

**D7:** La solicitud de patente US 20110223191, comprende un extracto alcohólico para el tratamiento del cáncer a partir de especies de Solanum, plantas y algas tropicales, entre las cuales se incluye Sargassum.

**D8:** La solicitud de patente US 20080052718 comprende una composición fitocética que contiene la mezcla de al menos dos plantas o extractos de las mismas, entre las cuales se encuentra Sargassum en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables. Las mezclas de plantas y la adición de nutrientes y Sargassum fusiforme. Para el tratamiento de enfermedad circulatoria, un trastorno endocrino femenino, o un trastorno de la piel, SOP, psoriasis. Además se comprende formas que incluyan agua o gelatina.

## 6.2. REPRODUCIBILIDAD DE LA INVENCIÓN:

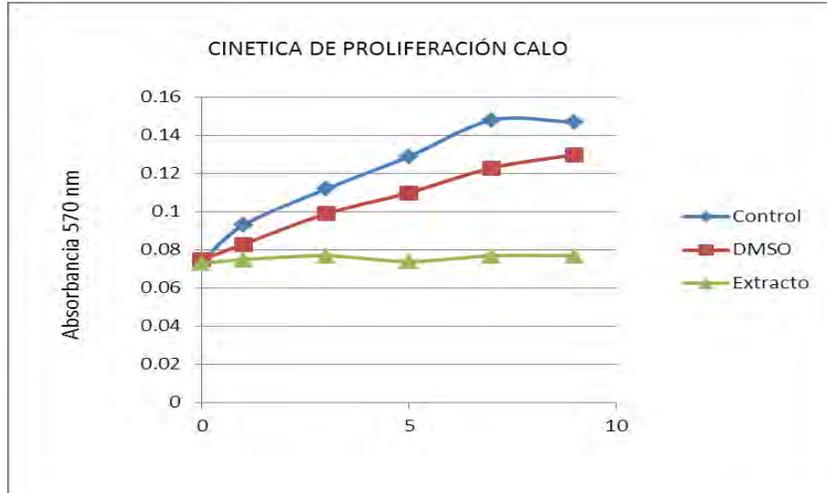


FIGURA 1. Células CALO cultivadas en medio RPMI1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y a una atmosfera húmeda saturante. Durante 9 días.

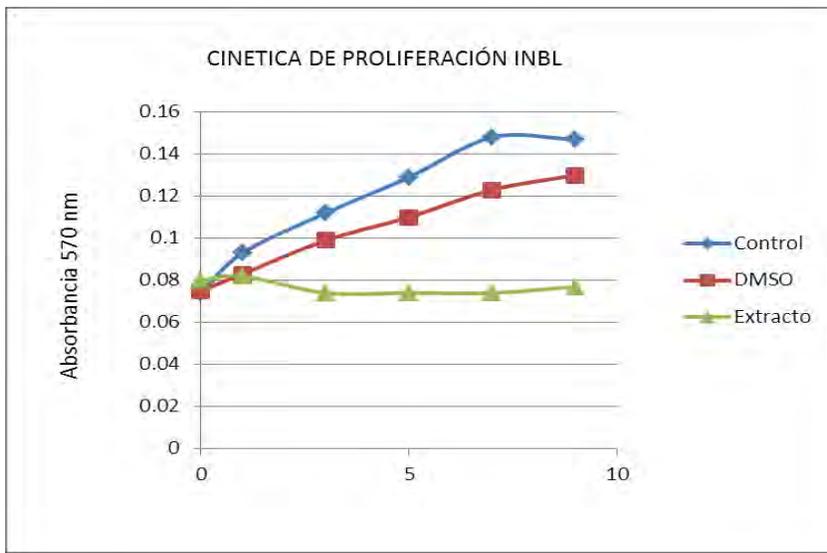


FIGURA 2. Células cultivadas en medio RPMI1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y a una atmosfera húmeda saturante. Durante 9 días.

### 6.3. SOLICITUD DE PATENTE:

#### EXTRACTO DE *Sargassum buxifolium* Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DEL CANCER CERVICOUTERINO

##### CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso del extracto de *Sargassum buxifolium* (SaBu) en el tratamiento del cáncer cervicouterino.

La presente invención describe las propiedades del extracto de SaBu mostrando actividad antiproliferativa y de inducción de apoptosis sobre las células de carcinoma de cérvix; además de la actividad inmunorreguladora sobre los linfocitos de sangre periférica (LSP).

##### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2008 causó 7,6 millones de defunciones (aproximadamente un 13% del total). De estos, los cánceres causados por infecciones virales, tales como las producidas por virus de hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por papilomavirus humanos (PVH), son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios. Teniendo que un 70% de las muertes por cáncer registradas en 2008 se produjeron en países del llamado tercer mundo.

Se prevé que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo y alcancen la cifra de 13,1 millones en 2030.

En particular, el cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas entre las mujeres mexicanas. Este tumor está asociado fuertemente a una etiología viral (el virus del papiloma humano). En México cada dos horas muere una mujer a causa de este cáncer, lo que implica alrededor de 4,000 muertes de mujeres al año a causa de esta enfermedad; por lo anterior es la primera causa de muerte de mujeres en este país, lo que convierte al CaCu en un problema nacional en materia de salud pública.

Fue en 1976 cuando Harald zur Hausen planteó la hipótesis en la cual propone al virus del papiloma humano (VHP) como el agente sexualmente transmitido responsable de la transformación neoplásica en el cuello uterino. Posteriormente esta hipótesis fue validada, tanto por estudios epidemiológicos, como por la evidencia molecular de que el ADN del virus del papiloma está integrado en las células neoplásicas en más del 90% de los carcinomas cervicales, con lo que se puede asegurar, sin lugar a dudas, el papel causal que el virus del papiloma humano tiene en el desarrollo del cáncer cervicouterino.

El virus del papiloma humano es miembro de la familia *Papoviridae*. Los papilomavirus se caracterizan por ser virus pequeños, con un genoma de ADN circular, de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases de longitud, con un virión no envuelto que mide de 45-55nm de diámetro y una cápside proteica icosaédrica. Su genoma contiene 9-10 regiones codificantes que se denominaron marcos de lectura abierta. Dichas regiones son segmentos de ADN que contienen secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas no estructurales involucradas en la regulación de las funciones virales y las proteínas estructurales involucradas en la producción de partículas infecciosas.

El primer paso para la infección por el VHP es el contacto por viriones intactos con las células inmaduras del epitelio escamoso (células basales o células metaplásicas); después del virus en el epitelio pueden ocurrir dos clases de infecciones: latentes o productivas.

En la infección de tipo latente el ADN viral permanece en el núcleo en su forma circular, libre o episomal; el virus se mantiene en la superficie sin replicarse y no ocurren cambios morfológicos identificables, por lo cual la detección de esta infección solo puede efectuarse mediante métodos moleculares. Por el contrario, en la infección activa o productiva existe una intensa actividad de replicación del ADN viral, con generación de viriones, misma que se lleva a cabo en las células escamosas diferenciadas, esto es en las capas intermedia, y superficial del epitelio escamoso con producción de proteínas de cápside y síntesis de gran cantidad de ADN viral que inducen cambios celulares característicos en las células infectadas, los cuales son detectables por histología y citología. (De Ruiz AP, Lazcano PE, Hernández AM. Cáncer cervicouterino, diagnóstico, prevención y control. 2 ed. México DF: editorial Medica panamericana; 2005.p. 57-65).

Etapas de evolución del CaCu:

Las siguientes etapas son empleadas en la clasificación clínica del cáncer cervicouterino.

Etapa 0 o carcinoma *in situ*. El carcinoma *in situ* es un cáncer en su etapa inicial. Las células anormales se encuentran sólo en la primera capa de células que recubren el cuello uterino y no invaden sus tejidos más profundos.

Etapa I. En esta primera etapa el cáncer se encuentra circunscrito estrictamente al cuello uterino.

Etapa II. Es la afección vaginal que excluye al tercio inferior o infiltración de los parametrios (ligamentos de sostén del cuello uterino) sin llegar a la pared lateral de la pelvis.

Etapa III. En esta etapa, empiezan a suceder los cambios críticos en esta enfermedad. El cáncer se ha extendido a toda la región pélvica. Las células cancerosas también pueden haberse expandido a la parte inferior de la vagina. Las células también pueden haberse diseminado para bloquear los uréteres.

Etapa IV. Metástasis. En esta etapa la extensión del cáncer se encuentra por fuera de los límites del tracto reproductor. Es la última y más avanzada etapa de esta enfermedad y usualmente los tratamientos convencionales para combatir la progresión de las células tumorales no son efectivos.

Las principales terapias para el cáncer comprenden la cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia; que son elegidas de acuerdo al estadio de la enfermedad. Sin embargo, ya sea como terapias únicas o en combinación producen muchos efectos secundarios que pueden poner en riesgo la salud integral del paciente; es por eso que numerosos investigadores se han dado a la tarea de probar distintas alternativas, que sean efectivas y menos dañinas para la mujer.

En este sentido, los organismos marinos han llamado la atención de diversos investigadores. Particularmente, el género *Sargassum* es uno de los principales productores de compuestos activos, se encuentra ampliamente distribuido en costas tropicales de todo el mundo y diversas especies pertenecientes a este género han sido estudiadas y reportadas con numerosas aplicaciones, tales como: *Sargassum natans* en su uso como antibiótico y fungicida (Tiznado et al, 2007), *Sargassum thunbergii* con actividad antitumoral (Itoh H et al, 1993), *Sargassum sp.* empleando sus extractos

acuosos y etanólicos contra *E. coli* y *Micrococcus sp* (Freile P et al, 2000), *Sargassum palmeri* y *Sargassum acinacifolium* como anticoagulantes (De Lara et al, 1992), *Sargassum micracanthum kuetzing* (Makoto I et al, 2005) y *Sargassum dentifolium C Agardh* (Sana M et al, 2001) empleados como antioxidantes, *Sargassum thunbergii* empleado como secuestrador de radicales libres en daño al ADN en linfocitos (Pyo Jam P, 2005), *Sargassum polycystum C Agardh* en protección hepática (Raghavendram R, 2005).

En el estado de la técnica encontramos a la patente US 8, 168,173 que protege un proceso para obtener un suplemento energético que comprende una mezcla de algas entre las cuales se encuentra el género *Sargassum*; la mezcla se seca y se esteriliza con isótopos isotérmicos y se presenta en cápsulas.

La solicitud de patente US 20080145380 comprende un suplemento nutricional para el tratamiento del cáncer, esta se puede presentar en tabletas, cápsulas, jarabe o bolsitas. Comprende mezclas de algas verde azules y pardas; entre las cuales se encuentra *Sargassum*. El suplemento nutricional comprende la adición de vitaminas y minerales y además excipientes para poder presentar el suplemento en las formas antes mencionadas.

La solicitud de patente US 20110223191, comprende un extracto alcohólico para el tratamiento del cáncer a partir de especies de *Solanum*, plantas y algas tropicales, entre las cuales se incluye *Sargassum*.

La solicitud de patente US 20080089946 comprende una composición fitocéutica que contiene la mezcla de al menos dos plantas o extractos de las mismas, entre las cuales se encuentra *Sargassum* en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables. Las mezclas de plantas y la adición de nutrientes y *Sargassum fusiforme*. Para el tratamiento de enfermedad circulatoria, un trastorno endocrino femenino, o un

trastorno de la piel, SOP, psoriasis. Además se comprende formas que incluyan agua o gelatina.

Los principales problemas conocidos que se presentan en el estado de la técnica son: La presencia de demasiados tipos de algas en un suplemento energético no asegura la estabilidad, selectividad ni la eficacia de la composición; de la misma forma, el uso de suplementos nutricionales con multicomponentes es fuente de toxicidad potencial. Además de que, el uso de isótopos radiactivos podría tener efectos nocivos en la salud.

En la presente invención se obtiene un extracto de SaBu que sin la adición de nutrientes u otros compuestos es específico y efectivo en el tratamiento del cáncer cervicouterino aun en sus estadios avanzados, presentando actividad antiproliferativa y de inducción de apoptosis. Además de que evita la toxicidad potencial que presentan las composiciones con multicomponentes, y ejerce una actividad inmunorreguladora en LSP.

En el estado de la técnica no existen estudios sobre actividad anticancerígena de SaBu, por lo que en la presente invención se demuestra la actividad antitumoral de más de una fracción del extracto de SaBu, mediante un proceso de extracción líquido-líquido.

Actualmente SaBu no tiene una actividad industrial o comercial conocida. A la luz de esta patente, se presenta una aplicación industrial no obvia y sorprendente en el estado de la técnica, además de la obtención de la actividad inmunorreguladora.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

FIGURA 1. Cinética de proliferación para la línea celular CALO en presencia y ausencia del extracto de SaBu.

FIGURA 2. Cinética de proliferación para la línea celular INBL en presencia y ausencia del extracto de SaBu.

### **DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona un novedoso método de tratamiento para el cáncer cervicouterino, empleando el extracto de SaBu.

La invención descrita en este documento comprende la colecta, conservación y obtención del extracto de SaBu en un solvente apropiado.

Los ejemplares de SaBu fueron recolectados en el Golfo de México, particularmente en playa Los Muñecos, Estado de Veracruz, en el 2008. Una vez hecha la recolecta se fijaron con etanol y se guardaron en bolsas con cierre hermético etiquetadas para su posterior confirmación taxonómica. Una vez determinados los ejemplares, se llevó a cabo el secado de los mismos para su maceración.

Posterior a la maceración de los ejemplares secos, se realizó una extracción que de una manera no limitativa puede ser: sólido-líquido con un solvente no polar y posterior extracción líquido-líquido de al menos un componente polar y un componente no polar.

El solvente no polar se selecciona del grupo de hidrocarburos que consiste en pentano, hexano, éter de petróleo, tolueno, ligroína y/o combinaciones de los mismos.

El componente polar se selecciona de un diverso grupo de solventes orgánicos que consiste en etanol, metanol, cloruro de metileno, cloroformo, éter, dioxano, ácido acético, anhídrido acético, acetona, acetato de etilo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido y/o combinaciones de los mismos.

Del extracto se obtuvo el concentrado; y de éste se realizó la técnica de cromatografía en capa fina con el fin de seleccionar los eluyentes adecuados para la separación por cromatografía en columna. Se observó que la mezcla de disolventes adecuados, preferiblemente y de manera no limitativa fue: una mezcla binaria de acetatos con un disolvente no polar clorado con una con una proporción dentro del rango 1-7 para el primer disolvente, y de 1-9 para el segundo. Con base en los resultados de capa fina se llevó a cabo la cromatografía en columna y se lograron separar los pigmentos en diferentes tonalidades que comprenden desde amarillo hasta naranja que corresponden a los compuestos como carotenos y xantofilas respectivamente. Posteriormente el extracto fue fraccionado en porciones entre 0.5 y 3ml, obteniendo un total de 15 a 30 fracciones.

### Determinación de las propiedades antiproliferativas.

Para evaluar las propiedades antiproliferativas del extracto de *Sargassum buxifolium*, de manera no limitativa, se emplearon líneas celulares de Cáncer Cervicouterino (CaCu) en estadios terminales. Dichas líneas fueron descongeladas y cultivadas en medio RPMI1640 suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino (SFB).

Cada una de las líneas celulares fue cultivada hasta alcanzar una confluencia entre el 40 y el 80%, en botellas de 25cm<sup>3</sup> con 5mL de medio de cultivo RPMI1640 suplementado con 10% de SFB, y fueron incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y a una atmosfera húmeda saturante.

### Determinación de IC50

Los cultivos se realizaron en un periodo de 9 días, donde las líneas celulares de CaCu fueron cultivadas en placas de 96 pozos, en cada pozo se colocaron de  $1 \times 10^4$  a  $3 \times 10^4$  células con 100µl de medio RPMI1640 al 10% de SFB y 100µl de la dilución del extracto de SaBu. Como control fueron cultivadas células en ausencia de las diluciones

del extracto de SaBu. Para esta condición fueron colocadas  $1 \times 10^4$  a  $3 \times 10^4$  células en cada pozo con medio RPMI al 10% de SFB. De las fracciones obtenidas, se llevaron a cabo diferentes diluciones con medio RPMI1640. Considerando las características del extracto, el vehículo de las células se eligió de dimetilsulfóxido, dimetilformamida y/o combinaciones de los mismos. El valor de IC50 se determinó espectrofotométricamente mediante la técnica de tinción con cristal violeta. Utilizando la siguiente fórmula:  $A=abc$

Donde

A: es la absorbancia de la muestra

a: coeficiente de extinción

b: es la longitud del paso óptico

c: es la concentración de la muestra

Determinación de la cinética de proliferación.

A partir de los valores de IC50 se eligieron las diluciones con mayor actividad y se cultivaron de 1-9 días para obtener la cinética de proliferación para cada una de las líneas celulares CaCu. Fueron utilizadas placas de 96 pozos, en cada pozo se colocaron de  $1 \times 10^4$  a  $3 \times 10^4$  células con 100  $\mu$ l de medio RPMI1640 al 10% de SFB y 100  $\mu$ l de la IC50 más activa de las fracciones del extracto de SaBu. Como primer control fueron utilizados cultivos de células de CaCu en ausencia de las diluciones del extracto de SaBu. Como segundo control fueron incubadas células en presencia del vehículo empleado y la dilución inicial del extracto crudo. La cinética se determinó diariamente hasta completar los 9 días, mediante la evaluación de las placas por la técnica de cristal violeta para lo cual las células de cada pozo fueron fijadas con 100  $\mu$ l de glutaraldehído al 1.1% por un periodo de 20 minutos, una vez fijadas se hace un lavado con 100  $\mu$ l de PBS y después

teñidas con 100 µl de cristal violeta por un periodo de 20 minutos en una placa de agitación. Transcurrido el tiempo de agitación se lleva a cabo la lectura de las placas en un lector de ELISA.

### Dilucidación del efecto antiproliferativo de SaBu

Las líneas celulares CaCu fueron cultivadas en cajas petri por periodos de 24, 36 y 48 horas. En cada caja fueron cultivadas  $1 \times 10^6$  células con 3mL de medio RPMI1640 al 10% de SFB y 1mL del extracto de SaBu. Como control fueron cultivadas  $1 \times 10^6$  células de CaCu en las mismas condiciones, pero en ausencia de extracto de SaBu. Transcurrido el tiempo de cultivo las células son incubadas con 4 ml de una solución amortiguadora de fosfatos a pH 7. Después fueron colocadas en un tubo cónico de 15mL y centrifugarlas a 4500 rpm para obtener el botón celular. El sobrenadante fue decantado y el botón fue lavado con PBS, en seguida fue resuspendido y es nuevamente centrifugado a las mismas condiciones. Las células fueron fijadas de manera no limitativa con un disolvente alcohólico. Enseguida las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en 600µl de RNAasa, se dejó reposar entre 30 y 80min. Posteriormente, la muestra fue llevada a un volumen final de 1mL agregando 400µl de PBS. Finalmente a cada muestra se adicionaron 4µL de yoduro de propidio y fueron leídas en un citómetro de flujo (FACS Aria II, BD systems USA)® y analizadas con el software BDFacs DIVA®.

### Evaluación de especificidad antiproliferativa

Se utilizaron de 8 a 10 ml de sangre periférica humana de donadores sanos, la muestra fue transferida a tubos cónicos de vidrio para separar el paquete de células rojas. Posteriormente el paquete de células blancas fue lavado en dos ocasiones con 4 ml de medio RPMI1640 y resuspendido, después se centrifugaron a 4500 rpm en una centrifuga. El sobrenadante se descartó. Para la separación de células mononucleadas se

utilizó un gradiente de densidad de Ficoll-Histopaque en tubos de 15 ml cónicos de vidrio. La muestra fue centrifugada a 1000 rpm y la capa de células mononucleadas se recupera y lava con PBS en tres ocasiones. Se cultivaron  $2 \times 10^6$  LSP en cajas petri con 3 ml de medio RPMI1640 al 10% de SFB y 1mL del extracto de SaBu. Como control fueron cultivados sin extracto de SaBu en las mismas condiciones más 100 UI de IL-2. Los LSP en presencia y ausencia de la fracción de SaBu fueron cultivados durante 72 horas y el efecto fue evaluado a las 24, 48 y 72 horas mediante la observación de la proliferación celular para cada condición.

Evaluación de la inducción de apoptosis sobre las células de carcinoma de cérvix.

Se realizó la inducción de la expresión del mRNA de proteínas apoptóticas como Bid y citocromo C.

Los resultados obtenidos mostraron la actividad inmunorreguladora del extracto de SaBu. Determinada mediante la técnica de cristal violeta y de manera indirecta por la formación de agregados celulares, lo que pone de manifiesto una inducción hacia la proliferación y diferenciación de la población de leucocitos utilizada.

De manera no limitativa esta novedosa invención presenta las siguientes ventajas:

- El extracto de *Sargassum buxifolium* no requiere la adición de nutrientes u otros compuestos para ser efectivo en el tratamiento del cáncer cervicouterino aun en sus estadios avanzados.
- El extracto de *Sargassum buxifolium* presenta actividad antiproliferativa sobre las células de carcinoma de cérvix.
- El extracto de *Sargassum buxifolium* muestra una actividad selectiva sobre las células de carcinoma de cérvix.
- El extracto de *Sargassum buxifolium* induce apoptosis en las células tumorales.

- El extracto de *Sargassum buxifolium* evita la toxicidad potencial que presentan las composiciones multicomponentes.
- El extracto de *Sargassum buxifolium* ejerce una actividad inmunorreguladora sobre la aglutinación de los linfocitos de sangre periférica (LSP).
- El extracto de *Sargassum buxifolium* ejerce una actividad inmunorreguladora sobre la proliferación de LSP.
- *Sargassum buxifolium* presenta aplicación industrial no obvia.
- El extracto de *Sargassum buxifolium* se obtiene mediante un sencillo proceso de extracción líquido-líquido.
- La concentración del extracto de *Sargassum buxifolium* que promueve la actividad farmacológica se encuentra en el orden de  $1 \times 10^{-5}$ .
- El extracto de *Sargassum buxifolium* *per se* tiene efecto terapéutico. Es decir no requiere combinación con algunas otras especies de algas para ejercer su efecto terapéutico.
- El extracto de *Sargassum buxifolium* no contiene residuos de disolventes orgánicos significativos.
- El mayor efecto antiproliferativo se encuentra en una fracción del extracto de *Sargassum buxifolium*.

A continuación se muestra un ejemplo ilustrativo, más no limitativo, de una forma de reproducir la invención:

### **EJEMPLO**

Extracción sólido-líquido con hexano de los ejemplares secos y macerados, posterior extracción líquido-líquido con acetato de etilo. Separación por cromatografía en columna empleando acetato de etilo-cloruro de metileno en proporción 2:5. La propiedad antiproliferativa se evaluó en cada una de las siguientes líneas celulares

de carcinoma de cérvix: CALO e INBL, las cuales fueron cultivadas en medio RPMI1640 suplementado al 10% SFB e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y a una atmosfera húmeda saturante, hasta alcanzar una confluencia del 40%.

Para la determinación de IC<sub>50</sub>, los cultivos se realizaron en un periodo de 9 días, donde las líneas celulares de CaCu fueron cultivadas en placas de 96 pozos, en cada pozo se colocaron  $2 \times 10^4$  células con 100µl de medio RPMI1640 al 10% de SFB y 100µl de la dilución del extracto de SaBu. Como control fueron cultivadas las células en ausencia de las diluciones del extracto de SaBu. Para esta condición fueron colocadas  $2 \times 10^4$  células en cada pozo con medio RPMI al 10% de SFB. De las fracciones obtenidas, se llevaron a cabo diferentes diluciones con medio RPMI1640. El vehículo utilizado fue dimetilformamida. El valor de IC<sub>50</sub> se determinó espectrofotométricamente mediante la técnica de tinción con cristal violeta.

### Determinación de la cinética de proliferación.

A partir de los valores de IC<sub>50</sub> se eligieron las diluciones con mayor actividad y se cultivaron de 1-9 días para obtener la cinética de proliferación para cada una de las líneas celulares CaCu (FIGURA 1 Y 2). Fueron utilizadas placas de 96 pozos, en cada pozo se colocaron  $2 \times 10^4$  células con 100µl de medio RPMI1640 al 10% de SFB y 100µl de la IC<sub>50</sub> más activa de las fracciones del extracto de SaBu. Como primer control fueron utilizados cultivos de células CALO e INBL en ausencia de las diluciones del extracto de SaBu. Como segundo control fueron incubadas células en presencia de dioxano empleado como vehículo de dilución inicial del extracto crudo. La cinética se determinó diariamente hasta completar los 9 días, mediante la evaluación de las placas por la técnica de cristal violeta para lo cual las células de cada pozo fueron fijadas con 100 µl de glutaraldehído al 1.1% por un periodo de 20 minutos, una vez fijadas se hace un lavado con 100 µl de PBS y

después son teñidas con 100  $\mu$ l de cristal violeta por un periodo de 20 minutos en una placa de agitación. Transcurrido el tiempo de agitación se lleva a cabo la lectura de las placas en un lector de ELISA.

Para la dilucidación del efecto antiproliferativo de SaBu, las líneas celulares CALO e INBL fueron cultivadas en cajas petri por periodos de 24, 36 y 48 horas. En cada caja fueron cultivadas  $1 \times 10^6$  células con 3mL de medio RPMI1640 al 10% de SFB y 1mL del extracto de SaBu. Como control fueron cultivadas  $1 \times 10^6$  células CALO e INBL en las mismas condiciones, pero en ausencia de extracto de SaBu. Transcurrido el tiempo de cultivo las células son incubadas con 4 ml de una solución amortiguadora de fosfatos a pH 7. Después fueron colocadas en un tubo cónico de 15mL y centrifugarlas a 4500 rpm para obtener el botón celular. El sobrenadante fue decantado y el botón fue lavado con PBS, en seguida fue resuspendido y es nuevamente centrifugado a las mismas condiciones. Las células fueron fijadas de manera no limitativa con un disolvente alcohólico. Enseguida las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en 600 $\mu$ l de RNAasa, se dejó reposar entre 30min. Posteriormente, la muestra fue llevada a un volumen final de 1mL agregando 400 $\mu$ l de PBS. Finalmente a cada muestra se adicionaron 4 $\mu$ L de yoduro de propidio y fueron leídas en un citómetro de flujo (FACS Aria II, BD systems USA) ® y analizadas con el software BDFacs DIVA®.

Para la evaluación de especificidad antiproliferativa del extracto de SaBu, se utilizaron 10 ml de sangre periférica humana de donadores sanos, la muestra fue transferida a tubos cónicos de vidrio para separar el paquete de células rojas. Posteriormente el paquete de células blancas fue lavado en dos ocasiones con 4 ml de medio RPMI1640 y resuspendido, después se centrifugaron a 4500 rpm en una centrifuga. El sobrenadante se descartó. Para la separación de células mononucleadas se utilizó un gradiente de densidad de Ficoll-Histopaque en tubos de 15 ml cónicos de vidrio.

La muestra fue centrifugada a 1000 rpm y la capa de células mononucleadas se recupera y lava con PBS en tres ocasiones. Se cultivaron  $2 \times 10^6$  LSP en cajas petri con 3 ml de medio RPMI1640 al 10% de SFB y 1mL del extracto de SaBu. Como control fueron cultivados sin SaBu en las mismas condiciones más 100 UI de IL-2. Los LSP en presencia y ausencia de la fracción de SaBu fueron cultivados durante 72 horas y el efecto fue evaluado a las 24, 48 y 72 horas mediante la observación de la proliferación celular para cada condición.

Para la evaluación de la inducción de apoptosis sobre las células de carcinoma de cérvix, se realizó la inducción de la expresión del mRNA de proteínas apoptóticas como Bid y citocromo C.

### **REIVINDICACIONES**

Habiendo descrito suficientemente nuestra invención, la consideramos como una novedad y por lo tanto reclamamos de nuestra exclusiva propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

1. El uso del extracto de *Sargassum buxifolium* y sus variedades en el tratamiento de cáncer cervicouterino.
2. De conformidad con la reivindicación 1, el proceso de obtención de un extracto del alga *Sargassum buxifolium* y sus variedades para el tratamiento del cáncer cervicouterino.
3. De conformidad con la reivindicación 2, el proceso para la obtención del extracto de *Sargassum buxifolium* y sus variedades, que comprende la maceración de los ejemplares secos y una extracción que de una manera no limitativa puede ser: sólido-líquido con un solvente no polar y una

- posterior extracción líquido-líquido de al menos un componente polar y un componente no polar.
4. De conformidad con la reivindicación 3, la selección del eluyente no polar de un grupo de hidrocarburos que consiste en pentano, hexano, éter de petróleo, tolueno, ligroína y/o combinaciones de los mismos.
  5. De conformidad con la reivindicación 3, la selección del eluyente polar de un grupo que consiste en etanol, metanol, cloruro de metileno, cloroformo, tetracloruro de carbono, éter, dioxano, ácido acético, anhídrido acético, acetona, acetato de etilo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido y/o combinaciones de los mismos.
  6. De conformidad con la reivindicación 3, el concentrado del extracto y su posterior fraccionamiento por cromatografía en columna.
  7. De conformidad con la reivindicación 6, la mezcla de eluyentes adecuados para la separación por cromatografía en columna, preferiblemente y de manera no limitativa se emplea una mezcla binaria de acetatos con un disolvente no polar clorado con una con una proporción dentro del rango 1-7 para el primer disolvente, y de 1-9 para el segundo.
  8. De conformidad con la reivindicación 6, la obtención de un total de 15 a 30 fracciones.
  9. De conformidad con la reivindicación 8, la dilución de las fracciones con un disolvente adecuado.
  10. De conformidad con la reivindicación 1, las fracciones 2, 13, 14, 16 y 17 del extracto y su uso en el tratamiento del cáncer cervicouterino.
  11. De conformidad con la reivindicación 10, La concentración de la fracción del extracto que promueve la actividad farmacológica se encuentra en el orden de  $1 \times 10^{-5}$ .

12. De conformidad con las reivindicaciones 1 a 11, el uso del extracto de *Sargassum buxifolium* y sus variedades como inmunoregulador.

**RESUMEN**

La presente invención presenta un novedoso tratamiento para el cáncer cervicouterino a partir de un extracto de *Sargassum buxifolium*.

Las pruebas realizadas al extracto de *Sargassum buxifolium*, muestran que esta alga tiene propiedades antiproliferativas y de inducción de apoptosis sobre las células de carcinoma de cérvix. Además, el mismo extracto actúa como agente inmunoregulador en linfocitos de sangre periférica.

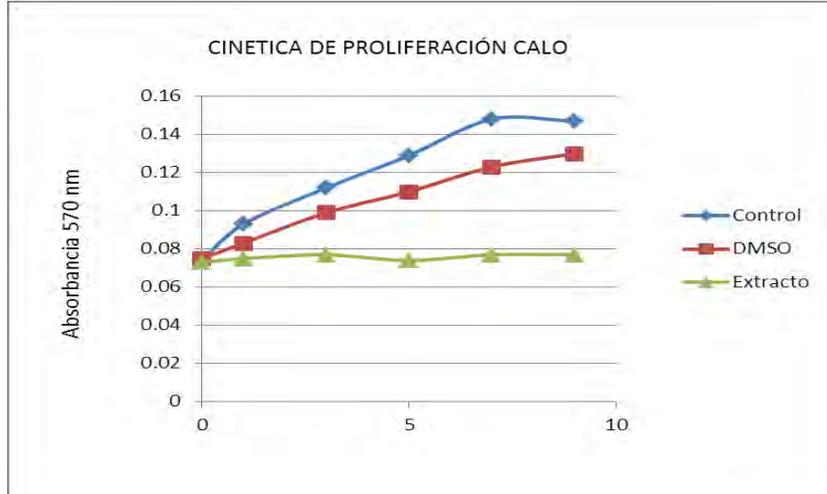


FIGURA 1

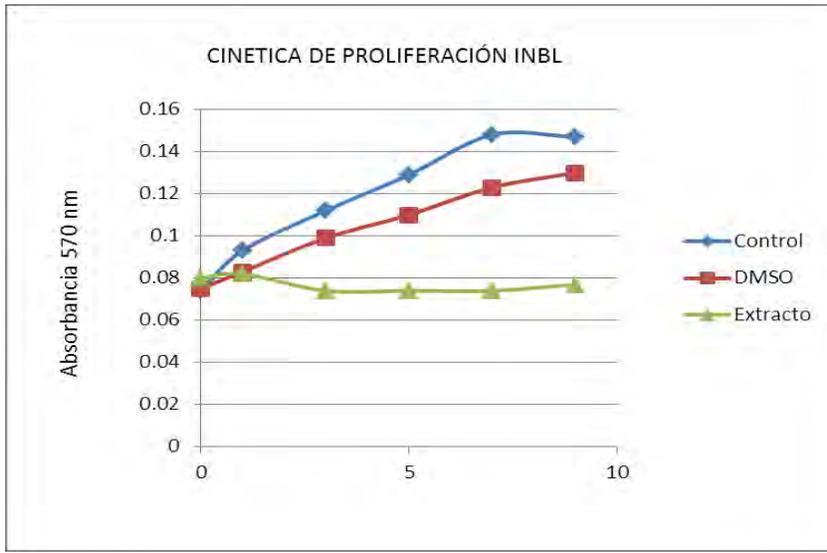


FIGURA 2

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

Del estado de la técnica podemos encontrar que desde hace tiempo se conoce el uso de las especies del género *Sargassum* en la medicina tradicional China; mostrando diversas propiedades terapéuticas debidas a sus metabolitos originados a partir de rutas bioquímicas distintas. Inclusive *Sargassum fusiforme*, *Sargassum pallidum*, *Sargassum latifolium* han sido empleados como agentes antiproliferativos en líneas celulares de cáncer. Un experto en la materia, sabe que cada tipo de cáncer es distinto. Y además no se ha reportado la obtención del extracto de *Sargassum buxifolium* ni el uso en líneas celulares de cáncer cervicouterino.

Para el caso de patentes y solicitudes de patente cercanas a la invención, se tiene que hay solicitudes que comprenden: A) la obtención de un producto energético que comprende una mezcla de algas entre las cuales se encuentra el género *Sargassum*; la mezcla se seca y se esteriliza con isótopos isotérmicos y se presenta en cápsulas. B) un extracto alcohólico para el tratamiento del cáncer a partir de especies de *Solanum*, plantas y algas tropicales, entre las cuales se incluye *Sargassum*. C) un suplemento nutricional para el tratamiento del cáncer, esta se puede presentar en tabletas, cápsulas, jarabe o bolsitas. Comprende mezclas de algas verde azules y pardas; entre las cuales se encuentra *Sargassum*. El suplemento nutricional comprende la adición de vitaminas y minerales y además excipientes para poder presentar el suplemento en las formas antes mencionadas. Y D) una composición fitocéutica que contiene la mezcla de al menos dos plantas o extractos de las mismas, entre las cuales se encuentra *Sargassum* en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables. Las mezclas de plantas y la adición de nutrientes y *Sargassum fusiforme*. Para el tratamiento de enfermedad circulatoria, un trastorno endocrino femenino, o un trastorno de la piel y psoriasis. Además se comprende formas que incluyan agua o gelatina.

Del estado de la técnica se observan algunas desventajas, tales como: la presencia de demasiados tipos de algas en un suplemento energético no asegura la estabilidad, selectividad ni la eficacia de la composición. De la misma forma, el uso de suplementos nutricionales con multicomponentes es fuente de toxicidad potencial. Además de que, el uso de isótopos radiactivos podría tener efectos nocivos en la salud.

En la invención descrita en la solicitud de patente, se obtiene un extracto de *Sargassum buxifolium* que sin la adición de nutrientes u otros compuestos es selectivo y efectivo en el tratamiento del cáncer cervicouterino aun en sus estadios avanzados, presentando actividad antiproliferativa y de inducción de apoptosis. Además se evita la toxicidad potencial que presentan las composiciones con multicomponentes.

## 8. CONCLUSIONES:

El estado de la técnica muestra la evidencia de la presencia de especies del género *Sargassum* en suplementos alimenticios enriquecidos con vitaminas y otros compuestos que ayudan al tratamiento del cáncer y están en forma de tabletas y cápsulas; sin embargo, no hacen referencia a *Sargassum buxifolium* y su uso en el tratamiento del cáncer cervicouterino. Por lo cual la invención descrita cumple con el criterio de novedad.

El proceso de obtención del extracto de *Sargassum buxifolium* y su uso en el tratamiento del cáncer cervicouterino no se deducen del estado de la técnica. Por lo que la invención antes descrita es novedosa y es originada a partir de un proceso creativo; por lo que tiene actividad inventiva.

La invención descrita comprende el uso novedoso del extracto de *Sargassum buxifolium* en el tratamiento del cáncer cervicouterino; por lo que puede ser empleado en cualquier rama de la actividad económica, presentando así aplicación industrial.

Se logró demostrar la novedad, actividad inventiva y aplicación industrial del extracto de *Sargassum buxifolium*, de conformidad con los artículos 16 y 19 de la Ley de la Propiedad Industrial.

## 9. PROPUESTAS:

Realizar estudios de preformulación y formulación del extracto para poder ofrecer al público un remedio herbolario en una forma farmacéuticamente aceptable.

Realizar estudios de estabilidad de las formas farmacéuticamente aceptables, a fin de determinar las condiciones de almacenamiento del producto.

Desarrollar un método de cultivo in vitro del alga para poder obtener el extracto a gran escala y de una forma sustentable.

## **10. ANEXOS:**

### **10.1. ANEXO 1:**

# **PATENTE RELACIONADA**



US008168173B2

(12) **United States Patent**  
Crihan et al.

(10) **Patent No.:** US 8,168,173 B2  
(45) **Date of Patent:** May 1, 2012

- (54) **CERCAN: AN ENERGY SUPPLEMENT PRODUCT FOR BOOSTING THE IMMUNE SYSTEM**
- (76) Inventors: **Ioan G Crihan**, New York, NY (US); **Geoffrey G Woods**, Fairfield, CT (US); **Jerrold E. Hyams**, New York, NY (US)
- (\* ) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 472 days.
- (21) Appl. No.: **12/078,670**
- (22) Filed: **Apr. 3, 2008**
- (65) **Prior Publication Data**  
US 2009/0252813 A1 Oct. 8, 2009
- (51) **Int. Cl.**  
*A23L 1/05* (2006.01)  
*A23L 1/30* (2006.01)  
*A23L 1/31* (2006.01)  
*A23L 3/26* (2006.01)  
*A23L 3/015* (2006.01)  
*A01N 63/00* (2006.01)  
*A01N 65/00* (2009.01)
- (52) **U.S. Cl.** ..... 424/93.7; 426/240; 426/575; 426/641; 426/648; 426/665
- (58) **Field of Classification Search** ..... None  
See application file for complete search history.
- (56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

6,399,105 B1 *	6/2002 Collin	424/550
6,455,013 B1 *	9/2002 Crihan	422/186
2009/0252813 A1 *	10/2009 Crihan et al.	424/548

OTHER PUBLICATIONS

Derwent English Abstract: 2007-646904, Abstract only; 2007.\*  
Derwent English Abstract: 2002-140591, Abstract only; 2002.\*  
Derwent English Abstract: 2006-222681, Abstract only; 2006.\*  
"Quick View Gamma Radiation Technology", MEGARAD, Inc. brochure, at least before Aug. 8, 2006, p. 1-16.  
"Quick View Gamma Radiation Technology", MEGARAD, Inc. revised Sep. 19, 2002, online brochure, <http://megaradinc.tripod.com/index.htm> of Aug. 12, 2003., pp. 1-16.  
"Quick View Gamma Radiation Technology", MEGARAD, Inc. revised Aug. 24, 2003, online brochure, <http://magaradinc.tripod.com>, pp. 1-16.  
"Countries Using Irradiation to Sterilize Food", listing, at least before Aug. 8, 2006, p. 1.  
Countries Using Irradiation (with Gamma) to Sterilize Organic Material, listing, at least before Aug. 8, 2006, p. 1-8.  
"Irradiation Levels and Effects", listing, at least before Aug. 8, 2006, pp. 1-2.  
"Gammat", <http://en.wikipedia.org/wiki/Gamat> online search, printed May 6, 2010, pp. 1-2.  
"Sea Cucumber", [http://en.wikipedia.org/wiki/Sea\\_cucumber\\_\(food\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Sea_cucumber_(food)) online search, printed Jul. 25, 2010, p. 1.  
"Gamt: The Traditional Healer from the Sea", <http://www.langkawi-beaches.com/langkawi-gamat.html> online search, printed May 6, 2010, pp. 1-3.  
"Holothroidea", <http://tolweb.org/Holothroidea> online search, printed May 5, 2010, pp. 1-3.

"Sea Cucumber", <http://itmonline.org/arts/seacuke.htm>. online search, printed May 2, 2010, pp. 1-2.  
"Sea Cucumber", <http://fao.org/docrep/007/y5501e/y5501e0b.htm> online search, printed May 2, 2010, pp. 1-6.  
"Sea Cucumber", [http://www.gne-trading.com/learn\\_cucumber.html](http://www.gne-trading.com/learn_cucumber.html) online search, printed May 6, 2010, pp. 1-4.  
Sea Cucumber., <http://hubpages.com/hub/greenextkudus> online search, printed May 6, 2010, p. 1.  
"Sea Urchins", [http://www.insbioscience.com/ins\\_bio/health\\_cucumber.html](http://www.insbioscience.com/ins_bio/health_cucumber.html) online search, printed May 6, 2010, p. 1.  
"Sea Urchins", <http://microscopy-uk.org.uk/mag/artjul00/urchin1.html>. online search May 5, 2010, p. 1.  
"Sea Urchins", <http://google.com/images> online search, printed May 6, 2010, p. 1-6.  
"Sea Urchins", [http://en.wikipedia.org/wiki/Sea\\_urchin](http://en.wikipedia.org/wiki/Sea_urchin) online search, printed Jul. 25, 2010, pp. 1-2.  
"File: Yokohama Chinese Mdicine Shark fin etc.jpg", [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Yokohama\\_Chinese\\_Medicine\\_Shark\\_fin\\_etc.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Yokohama_Chinese_Medicine_Shark_fin_etc.jpg) online search, printed Jul. 25, 2010, pp. 1-2.  
"Shark Fin Soup", [http://en.wikipedia.org/wiki/Shark\\_fin\\_soup](http://en.wikipedia.org/wiki/Shark_fin_soup) online search, printed Jul. 25, 2010, p. 1.  
"Sponge", [http://en.wikipedia.org/wii/Sea\\_sponge](http://en.wikipedia.org/wii/Sea_sponge) online search, printed Jul. 25, 2010, p. 1.  
"Calcium Carbonate", [http://en.widipedia.org/wiki/Calcium\\_carbonate](http://en.widipedia.org/wiki/Calcium_carbonate) online search Jul. 25, 2010, pp. 1-2.  
"Skeleton", [http://en.wikipedia.org/wiki/Sea\\_sponge](http://en.wikipedia.org/wiki/Sea_sponge) online search Jul. 25, 2010, p. 1.  
"Sargassum", <http://en.lwikipedia.org/wiki/Sargassum> online search Jul. 25, 2010, p. 1.  
"Immunity (medical)", [http://en.wikipedia.org/wiki/Immunity\\_\(medical\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Immunity_(medical)) online search, printed Jul. 28, 2010, pp. 1-2.  
"Immunology", <http://en.wikipedia.org/wiki/Immunilogy> online search, printed Jul. 28, 2010, p. 1.  
"Historical examination of the immune system", <http://en.wikipedia.org/wiki/Immunology> online search, printed Jul. 28, 2010, p. 1.  
"Pathogen", <http://en.wikipedia.org/wiki/Pathogen> online search, printed Jul. 28, 2010, pp. 1-2.  
"Clinical immunology", <http://en.wikipedia.org/wiki/Immunology> online search, printed Jul. 28, 2010; p. 1.  
"Cytokine", <http://en.wikipedia.org/wiki/Cytokine> online search, printed Jul. 28, 2010, p. 1.  
"Interleuin", <http://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin> online search, printed Jul. 28, 2010, p. 1.  
"Interferon", <http://en.wiki/pedia.org/wiki/Interferon> online search, printed Jul. 28, 2010, p. 1.  
"Peptide bond formation", <http://en.wiki/pedia.org/wiki/Interferon> online search, printed May 6, 2010, p. 2.  
"Sea Sponges", <http://www.google.co/images?um=1&hl=en&tbs=isch%3A1&sa=lg=sea-sponges&ag...> online search, printed May 6, 2010, p. 1.

\* cited by examiner

Primary Examiner — Debbie K Ware  
(74) Attorney, Agent, or Firm — Merek, Blackmon & Voorhees, LLC

(57) **ABSTRACT**

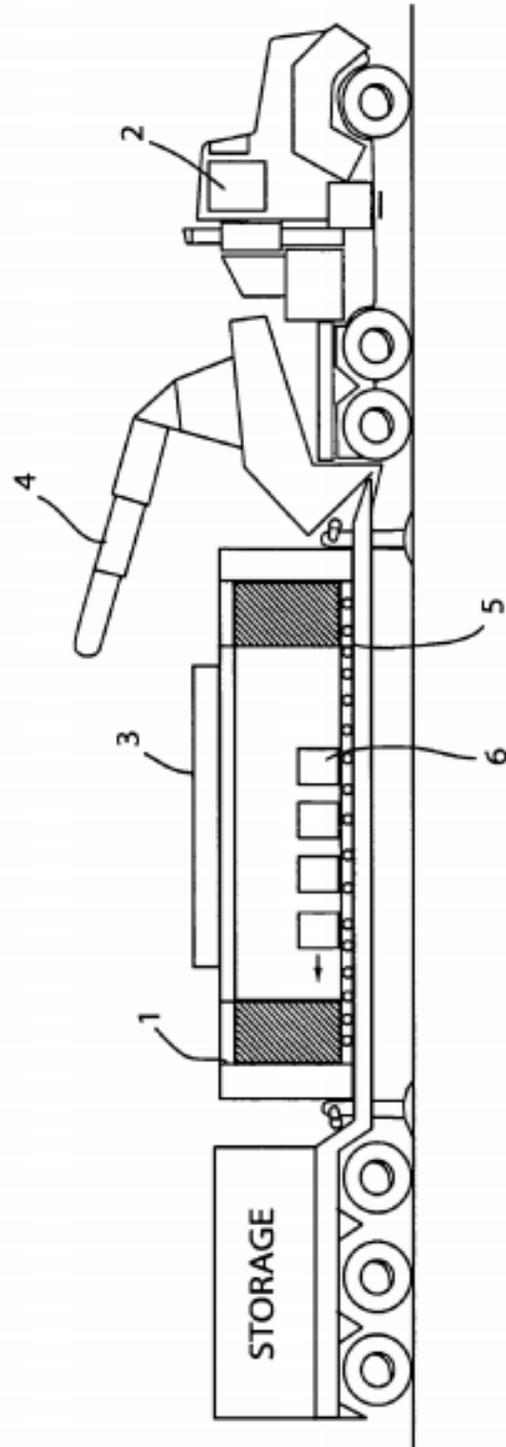
This invention concerns the process of creating an energy supplement product, good also as an anti-aging, aphrodisiac and as an alternative source to prevent or to remedy some diseases. The product is a composition of five ingredients: four marine animals (sea cucumber, sea urchin, sea sponge, and shark fin), and an algae called Sargassum. These ingredients are sterilized and then dried by using isothermal isotopes, reduced to powder, measured and encapsulated.

10 Claims, 1 Drawing Sheet

U.S. Patent

May 1, 2012

US 8,168,173 B2



1

**CERCAN: AN ENERGY SUPPLEMENT  
PRODUCT FOR BOOSTING THE IMMUNE  
SYSTEM**

CROSS REFERENCE TO RELATED  
APPLICATIONS

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application 60/836,131, filed Aug. 8, 2006.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 shows a side plan view of a transportable trailer having a drawing tractor.

DETAILED DESCRIPTION

This invention concerns the process of producing an energy supplement product, good also as an anti-aging, as aphrodisiac and as alternative source for preventing or remedy some diseases. It is based on four marine animals: sea cucumber (Gamat variety), sea sponge, sea urchin (red but also green), shark fin, and a seaweed called Sargassum. The ingredients produced by these marine elements are sterilized and then dried by using isothermic isotopes, transformed into powder, measured, and then introduced into capsules.

All of the ingredients aforementioned are a good source of energy. The sea cucumber, specifically the golden variety type called "Gamat" provides many vitamins (A, B1 or thiamine, B2 or riboflavin, B3 or niacin, C and E) and minerals (calcium, manganese, iron, magnesium, potassium). A good source of vitamins and minerals is also the algae called Sargassum. The only non-edible element, the sea sponge, is rich in calcium.

It is also believed they help prevent and fight various diseases, such as cancer (sea sponges), or aging (sea cucumber and sea urchin). A similar product exists already on the market with the ingredients transformed into jelly and put into plastic containers. The containers are kept and transported in refrigerators. The disadvantage of the refrigeration is that, in case of interruption of electricity, the jelly is thawed. The re-refrigeration of the thawed product is in this case dangerous for the consumer. Besides the danger of thawing, the containers with jelly are difficult to be used by individuals during trips, or other occasions.

DESCRIPTION OF THE DRAWING

FIG. 1 shows a transportable trailer 1 having a drawing tractor 2 for bringing the irradiation chamber which is suitably housed in a clad housing to a sterilization and drying site. The trailer has a removable protective roof 3 which may be removed by a crane 4 in order to load or unload the radioisotope source 3. The trailer has a roller conveyor system 5 upon which containers 6 are moved into and out of the irradiation

2

chamber in a timed sequence for a preselected dwell time in the irradiation chamber. The dwell time can be such as to ensure that each container and its contents receive between 1 million and 5 million RADs.

- 5 The invention claimed is:
1. A method of producing an energy supplement product, comprising:
    - a) providing a mixture, the active ingredients of the mixture consisting essentially of Sargassum seaweed, Gamat sea cucumber, sea sponge skeleton, shark fin, and one of the group of red sea urchin gonads and green sea urchin gonads; and
    - b) sterilizing and drying the mixture with isothermic isotopes in a device comprising an irradiation chamber to form the energy supplement product.
  - 10 2. The method of claim 1, wherein said mixture is sterilized by irradiation in a mobile, wheeled metal chamber.
  3. The method of claim 1, wherein said mixture is sterilized by irradiating with one million to five million rads.
  4. The method of claim 3, further comprising:
    - c) converting the mixture of step b) into a powder.
  - 15 5. A method of producing an energy supplement product comprising:
    - a) forming a mixture of Sargassum seaweed, Gamat sea cucumber, sea sponge skeleton, shark fin, and one of the group of red sea urchin gonads and green sea urchin gonads;
    - b) sterilizing and drying the mixture of step a) with isothermic isotopes in an irradiating chamber;
    - c) converting the mixture of step b) into a powder; and
    - d) encapsulating the powder of step c) to produce an energy supplement product.
  6. The method of claim 5, wherein said mixture is sterilized by irradiation with one million to five million rads.
  7. The method of claim 5, wherein said irradiating chamber is in a mobile, wheeled metal housing.
  8. A method of producing an energy supplement product comprising:
    - a) providing a mixture consisting of Sargassum seaweed, Gamat sea cucumber, sea sponge skeleton, shark fin, and one of the group of red sea urchin gonads and green sea urchin gonads;
    - b) sterilizing and drying the mixture with isothermic isotopes in an irradiating chamber;
    - c) converting the mixture of step b) into a powder; and
    - d) encapsulating the powder of step c) to produce an energy supplement product;
 wherein said energy supplement is capable of boosting an immune system in an individual.
  9. The method of claim 8, wherein said mixture is sterilized by irradiation with one million to five million rads.
  10. The method of claim 8, wherein said irradiating chamber is in a mobile, wheeled metal housing.

\* \* \* \* \*

**10.2. ANEXO 2:**

**SOLICITUDES DE  
PATENTE  
RELACIONADAS**



US 20110223191A1

(19) **United States**

(12) **Patent Application Publication**  
**Mohamed et al.**

(10) **Pub. No.: US 2011/0223191 A1**  
(43) **Pub. Date: Sep. 15, 2011**

(54) **ANTI-CANCER NUTRACEUTICAL  
COMPOSITION**

**Publication Classification**

(75) Inventors: **Suhaila Mohamed**, Serdang (MY);  
**Farideh Namvar**, Serdang (MY);  
**Kheen Kuan Chan**, Serdang (MY)

(51) **Int. Cl.**  
*A61K 36/02* (2006.01)  
*A61K 36/889* (2006.01)  
*A61K 36/67* (2006.01)  
*A61K 36/81* (2006.01)  
*A61K 36/04* (2006.01)  
*A61K 36/05* (2006.01)  
*A61K 36/03* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(73) Assignee: **UNIVERSITI PUTRA  
MALAYSIA, SELANGOR (MY)**

(21) Appl. No.: **13/128,537**

(22) PCT Filed: **Dec. 23, 2009**

(52) **U.S. Cl. .... 424/195.17; 424/727; 424/734;  
424/725**

(86) PCT No.: **PCT/MY2009/000213**

§ 371 (c)(1),  
(2), (4) Date: **May 10, 2011**

(57) **ABSTRACT**

(30) **Foreign Application Priority Data**

Dec. 23, 2008 (MY) ..... PI 20085248

A comestible composition with anti-cancer property comprises alcohol soluble extracts from plant parts of *Piper* species, palm species, tropical seaweeds, and/or *Solanum* species.

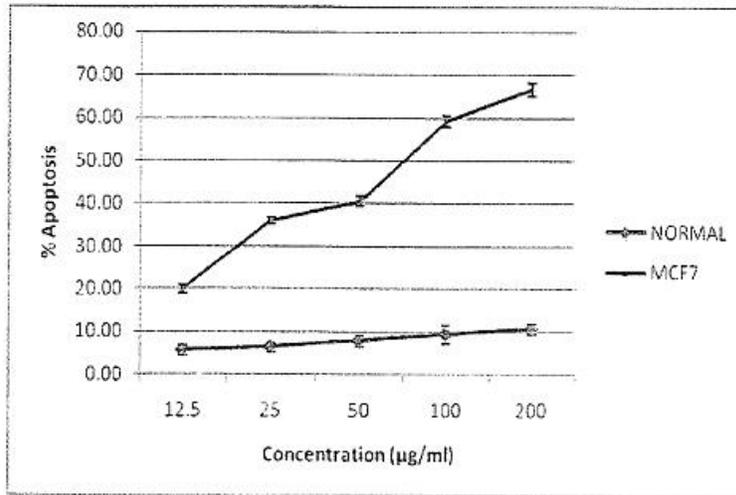


Figure 1

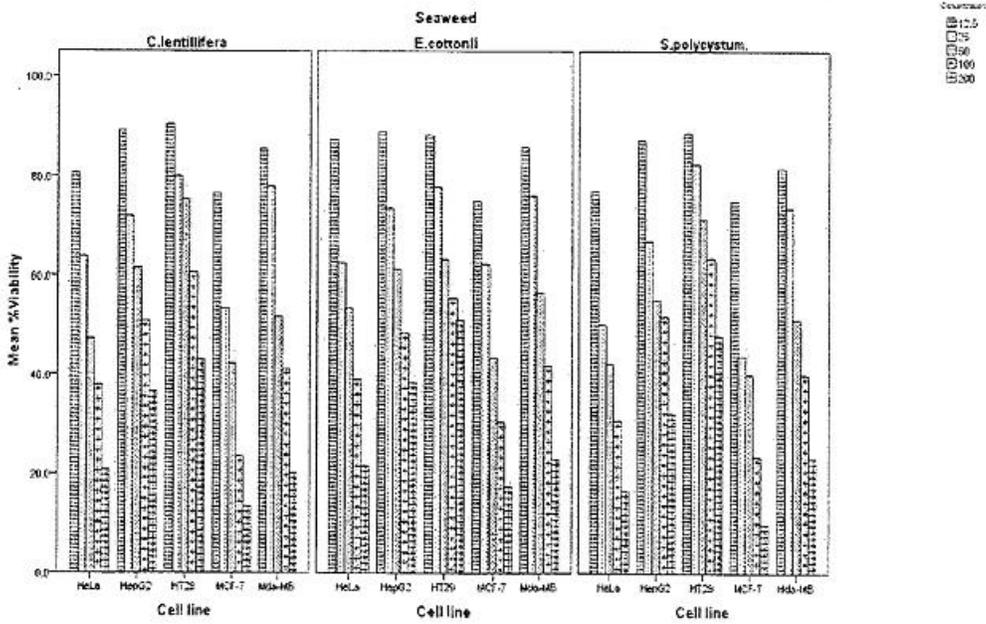


Figure 2

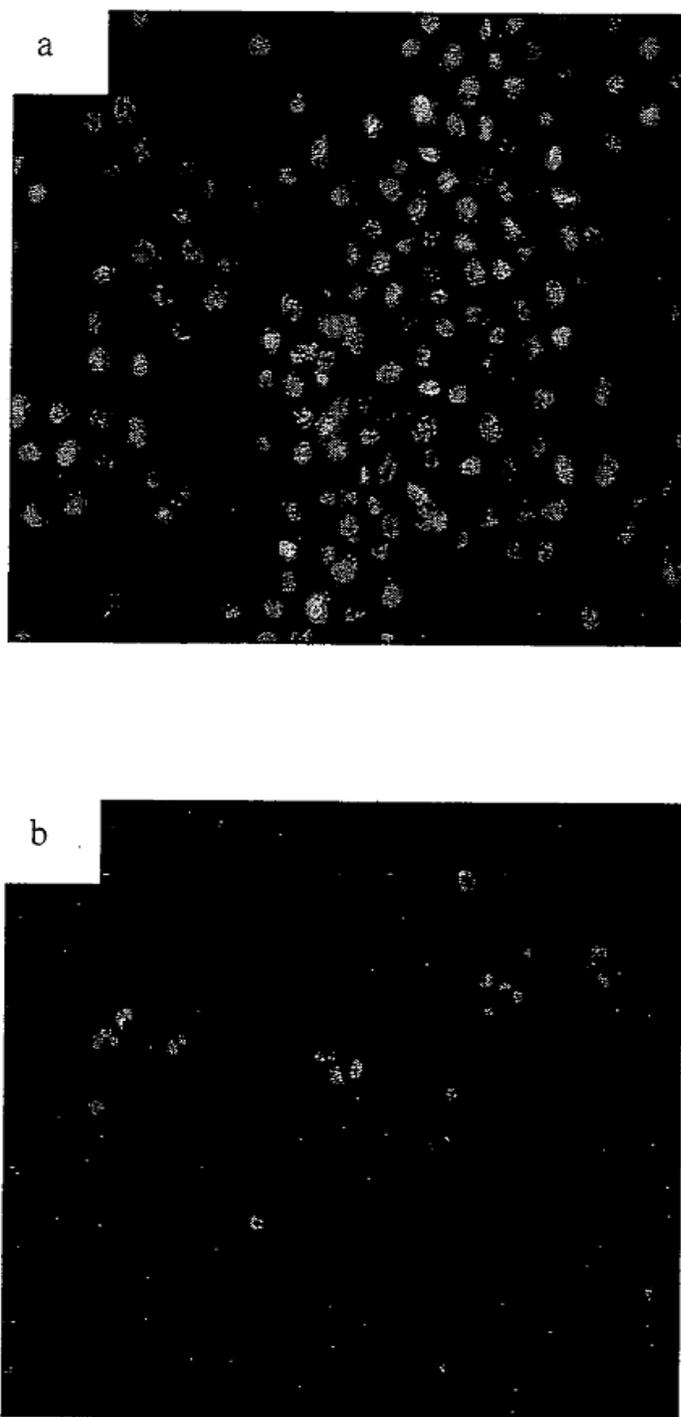


Figure 3

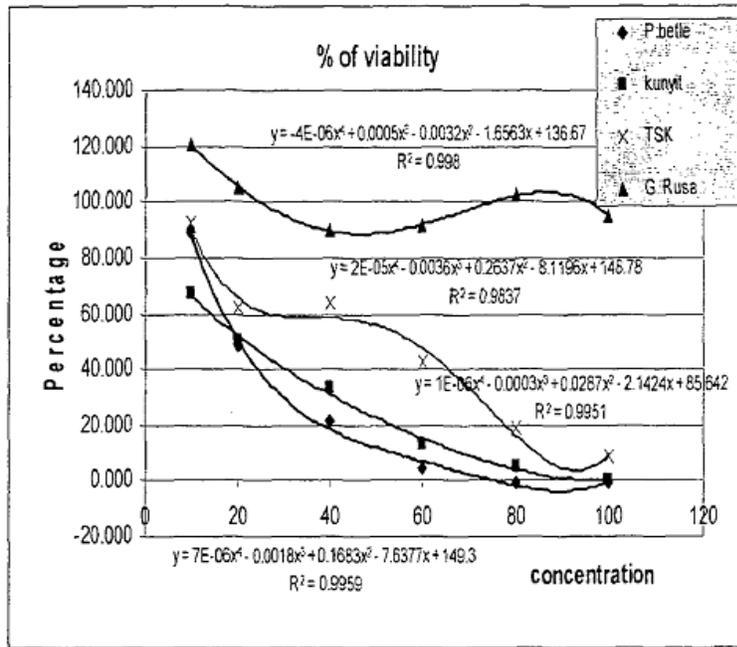


Figure 4

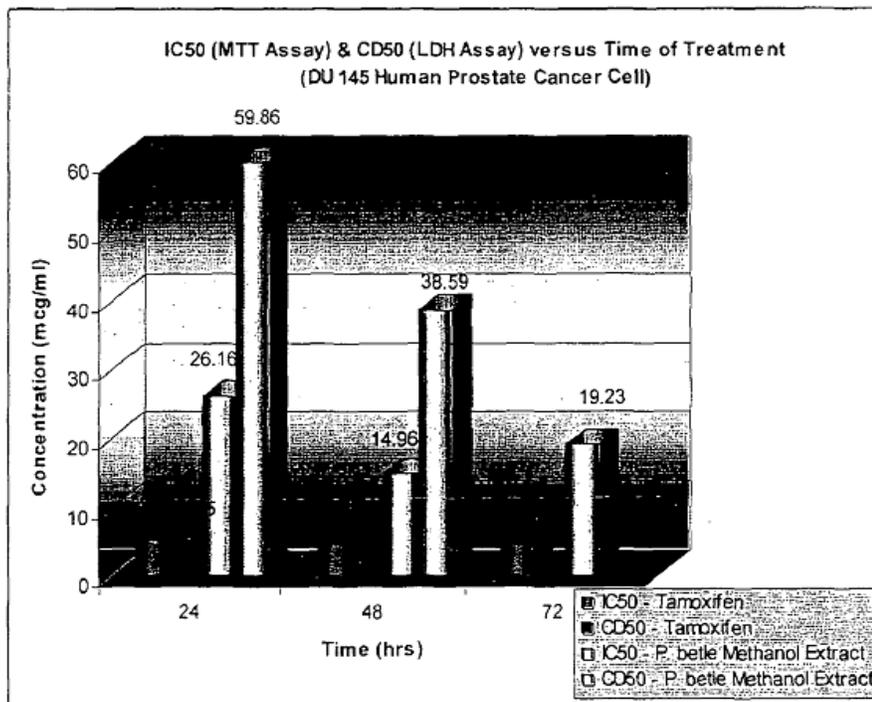


Figure 5

**ANTI-CANCER NUTRACEUTICAL  
COMPOSITION**

## FIELD OF INVENTION

[0001] The present invention relates to a nutraceutical composition with significant anti-cancer property. In more specific, the disclosed composition contains extract from plant parts of the *Piper* species, tropical seaweeds, palm and/or *Solanum* species.

## BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Unrestrained cell proliferation is the characteristic of cancer or tumor cells with damaged genes that directly control their cell cycles. Changes in cell survival contribute to a number of human diseases, including cancer, viral infections, autoimmune diseases, neurodegenerative disorders, and AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). Natural physiological cell death occurs primarily through apoptosis. Apoptosis is the natural process of removing cells in normal or pathologic tissues. Rapid condensation and budding of the cell occur, with the formation of membrane-enclosed apoptotic bodies containing well-preserved organelles, which are phagocytosed and digested by adjacent local cells, without any inflammation. Apoptosis takes place spontaneously in malignant tumors, often significantly retarding their growth, and are increased in tumors responding to irradiation, cytotoxic chemotherapy, heating and hormone ablation. Apoptosis can be regulated by certain proto-oncogenes and the p53 tumor suppressor gene. C-myc expressions are involved in the initiation of apoptosis in some situations, and bcl-2 is a new type of proto-oncogene that inhibits apoptosis, rather than stimulating mitosis. Antibodies against a cell-surface protein designated APO-1 or Fas can enhance apoptosis in some human lymphoid cell lines which may have therapeutic uses.

[0003] Apart from that, it was found nutraceuticals derived from certain parts of plants also capable of causing apoptosis to cancer cells while these nutraceuticals are administered to the subject at an effective amount. Thus retarding the progression or even leading to the regression of cancer.

[0004] Different metabolites from various plants have been proven to possess anti-cancer properties. Subsequently, different anti-cancer products containing these metabolites as the active ingredients have been developed. For example, Kimura et. al. filed a Japanese patent application no. 2006306897 which are directed to provide a new anti-gastric cancer agent that suppresses gastric cancer cell proliferation which employs the fucoidan originating from Mozuku seaweed as the effective component. The fucoidan originating from hot water extract of Mozuku seaweeds, for example, Ito mozuku (*Nemacladus decipiens*), Okinawa mozuku (*Cladophora okamurae*) or Futo mozuku (*Tinocladia crassa*) or the like or a purified product thereof obtained by treating the extract with a quaternary ammonium salt.

[0005] Another United States patent application no. 2003015712 filed by Iwasaki, Teruaki to disclose a nutritious supplemental composition for suppression against onset of large intestinal cancer and manufacturing method thereof. The invention provided a composition containing well-balanced nutrition, having an effect to suppress the mutagenesis substances. The disclosed invention claims to have no adverse reaction even if the composition is continued to be taken as nutritious supplemental substance and capable of promoting

healthy state. The composition preferably contains dietary fibre in a range of 15 wt % to 30 wt % in respect to a total amount of composition. The dietary fibre contains in the form of dried koji fine powder including dead fungi of *Aspergillus*.

[0006] Another U.S. Pat. No. 4,708,962 provides an antiviral and antitumor cyclohexadienone compositions. Besides, a method for inhibiting, remitting or controlling the growth of tumors or tumor cells utilizing the disclosed compositions is provided as well. More particularly, the antitumor compositions comprise, as active ingredient, an antitumor effective amount of halogenated chamigrenes extracted and derived from red alga and sea hares which diet upon red alga.

[0007] In United State patent application no. 2006228432, an alpha-glucosidase inhibitors is disclosed and a method to obtain the claimed subject. The claimed alpha-glucosidase inhibitors is actually an extract derived from the plant source of *Piper longum* and acquired through a polar solvent. Owing to its property in inhibiting alpha-glucosidase activity, the extract is believed in preventing progression of cancer cells.

[0008] European patent application 1508334 claims a water soluble extract from plant of *solanum* genus and a pharmaceutical product containing the extract as an active ingredient in inhibiting growth of tumor/cancer cells, particularly liver cancer cells, lung cancer cells and breast cancer cells.

[0009] Another Japan patent publication no. 2004091472 discloses an apoptosis inducer contained in potato anthocyanin comprises the anthocyanin pigment-containing extract. The extract is acquired from agricultural species such as *Solanum tuberosum*, *Andigena L* and *S. phureja*.

## SUMMARY OF THE INVENTION

[0010] The present invention aims to provide a nutraceutical composition which is effective against cancer cells. In more specific, the nutraceutical composition is capable of inducing apoptosis in cancer cell line without affecting growth of normal cells.

[0011] Further object of the present invention is to provide a method to acquire the above mentioned composition through an extraction method.

[0012] At least one of the preceding objects is met, in whole or in part, by the present invention, in which one of the embodiment of the present invention a composition with anti-cancer property comprising alcohol soluble extract from vegetative parts of *Piper* species, palm species, tropical edible seaweed, and/or *Solanum* spp. In the most preferred embodiment, the *Piper* species is *Piper betel* to be used in the present invention.

[0013] In further embodiment, the disclosed composition may contain also alcohol soluble extract from palm leaf, *Solanum* species and/or tropical seaweeds. Likewise, the *Solanum* species is any one or combination of (but not limited to) *S. mammosum*, *S. verbascifolium*, *S. tuberosum*, *S. trilobatum*, *S. torvum*, *S. seafortianum*, *S. sarmentosum*, *S. nigrum*, *S. melongena*, *S. maroniense*, *S. microcarpon*, *S. jasminoides*, *S. indicum*, *S. ferox*, *S. coagulans*, *S. blumei*, *S. aculeatissimum*, while the tropical seaweeds are any one or combination of *Eucheuma cottonii*, *Caulerpa lentillifera*, and *Sargassum polycystum*.

[0014] In one of the aspect, the Palm species is *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, *Phoenix dactylifera* and *Cocos nucifera*. Moreover, it is the leaves of these species that are used for extracting the useful compounds.

[0015] Another major aspect of the present invention includes a method for obtaining alcohol soluble extract with anti-cancer property from plant parts of *Piper* species, palm leaves, *Solanum* species and/or tropical seaweeds comprising the steps of pre-treating plant parts of the *Piper* species, palm leaves, plant parts of the *Solanum* species and/or tropical seaweeds; subjecting the pre-treated plant parts for extraction using a first polar extraction solvent comprising an alcohol, with or without a co-solvent; and concentrating the extraction solvent/s to form a powdery composition or paste after removing the pre-treated plant parts. In respect to the preferred embodiment, the *Piper* species is *Piper betel*, palm leaf, tropical seaweeds and the *Solanum* species is any one or combination of *S. mammosum*, *S. verbascifolium*, *S. tuberosum*, *S. trilobatum*, *S. torvum*, *S. seaforthianum*, *S. sarmenosum*, *S. nigrum*, *S. melongena*, *S. maroniense*, *S. microcarpon*, *S. jasminoides*, *S. indicum*, *S. ferox*, *S. coagulans*, *S. blumei*, *S. aculeatissimum*.

[0016] To effectively extract metabolites from the plant parts, the ratio of weight of the pre-treated plant parts to the first polar extraction solvent is preferably in a range of 1-3: 6-10 (w/v).

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0017] FIG. 1 is a graph showing the Percentages of apoptotic breast cancer MCF-7 cells in the presence of *Sargassum polycystum* alcoholic extract SPME (0-200 µg/ml) compared to normal cells;

[0018] FIG. 2 is a graph showing the Reduction of viability of five human cancer cells after 48 h incubation, measured by MTT test (mean±S.D.; n=3) by each seaweeds alcoholic dry extracts (concentration 12.5 to 200 µg/ml);

[0019] FIG. 3 are microscope photographs showing morphological changes of breast cancer MCF-7 cells after treatment by *S. polycystum* extract followed by Hoechst 33342 staining which (a) Fluorescence microscope photographs of control cells treated with 0.1% DMSO, (b) cells treated with 25 µg/ml *S. polycystum* extract after 24 h incubation;

[0020] FIG. 4 is a graph showing the viability of MDA 435 and MCF 7 breast cancer cells after incubating in various concentrations of extracts of *Piper* spp., Turmeric (Kunyit), and *Solanum mammosum* Terung Susu Kambing (TSK) for 48 hrs and 72 hours respectively (MTT Assay); and

[0021] FIG. 5 is a graph showing the viability (MTT assay) and Cell Death (LDH assay) of DU 145 Human Prostate cancer cells after incubating in various concentrations of extracts of *Piper* spp., for 24-72 hrs respectively (MTT Assay).

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0022] One skilled in the art will readily appreciate that the present invention is well adapted to carry out the objects and obtain the ends and advantages mentioned, as well as those inherent therein. The embodiment describes herein is not intended as limitations on the scope of the invention.

[0023] The term "pharmaceutically effective amount" used herein through out the specification refers to the amount of the active ingredient, the extract, to be administered orally to the subject to trigger the desired effect without or causing minimal toxic adverse effect against the subject. One skilled in the art should know that the effective amount can vary from one individual to another due to the external factors such as age,

sex, diseased state, races, body weight, formulation of the extract, availability of other active ingredients in the formulation and so on.

[0024] With respect to the preferred embodiment of the present invention, a method for preparing extracts from plant parts of the tropical seaweeds, palm leaf, *Solanum* spp. fruits and *Piper* spp. is disclosed. The method basically comprises the steps of pre-treating plant parts from Tropical seaweeds, palmaria family, *Solanum* spp. and *Piper* spp. extracting the pre-treated parts using a solvent, (with or without a co-solvent); removing the pre-treated parts from the used solvent; and concentrating the used solvent to acquire the herbal extract. The disclosed method is found to be effective in isolating the favored compounds, peptides or active metabolites which provides a anti-cancer enhancement effects or health promoting effect towards the injured system upon ingestion orally or topically of a subject. In particular, method for obtaining alcohol soluble extract with anti-cancer property from plant parts of *Piper* species, palm species, *Solanum* species and/or tropical seaweeds comprising the steps of pre-treating plant parts of the *Piper* species, palm species, *Solanum* species and/or tropical seaweeds; subjecting the pre-treated plant parts for extraction using alcohol (with or without the presence of a co-solvent); concentrating the extraction solvent to form a powder or paste.

[0025] In one of the aspect, the Palm species is *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, *Phoenix dactylifera* and *Cocos nucifera*. Moreover, it is the leaves of these species that are used for extracting the useful compounds.

[0026] According to another preferred embodiment of the disclosed method, the plant parts are pre-treated before subjecting to extraction. The pre-treatment process may involve a washing step to clean any dirt or physical pollutants captured at the surface of the alcoholic extracts. Other pre-treatment step may include reducing the moisture content of the plant parts by any known means or approaches in the art to improve the extraction rate and yield. In the preferred embodiment, the plant parts are subjected to drying in an oven at 40-110° C. The drying temperature shall not be set too high as such practice may degrade the active metabolites and compounds contained within the alcoholic extracts of. The preferred temperature shall range from 40° C. to 70° C. Other pre-treatment steps that can be employed are preparing the dried plant parts into small fragments, or pulverization to paste or powdery form prior to the soaking step or extraction. The fragmented portion or pulverized plant parts can greatly increase the available contact surface of the dried plant parts that are exposed to extraction solvent thus enhancing the rate as well as the yield of the extraction method.

[0027] Preferably, the pre-treated plant parts may be subjected to a plurality occasion of extraction using different types of extraction solvent to obtain the optimal yield. Though mere soaking the pre-treated plant parts into the extraction solvent shall be able to extract the active compounds due to the polarity attraction of the extraction solvent, the process may be accelerated by stirring the extraction mixture, or the use of heat and pressure, both of the extraction solvent and the pre-treated alcoholic extracts of, during the time the extraction is conducted. It is important to note that the extracted compounds from the alcoholic extracts of are mainly constituted of bio-phenols, proteins, pigments, minerals, polysaccharides, lipids, small peptides and other bio-active compounds. Therefore, the efficiency rate of the extraction may be sensitive towards pH changes in the extrac-

tion solvent. In the most preferred embodiment of the disclosed method, the pH of the extraction content shall fall within pH 3 to 9.5 for achieving optimal yield and extraction rate. Applying appropriate amount of heat energy to the extraction system is another feasible approach to enhance the extraction rate and yield. Relying upon the solvent utilized, the heating is most preferred within the range of 40° C. to 120° C., most preferably 40° C. to 90° C. Precaution should be taken into consideration that denaturalisation possibly occurs at high temperature of heating.

**[0028]** It is important to note that the extracts used in the disclosed method in the preferred embodiment derives from the plant species of but not limited to, *Euchema cottonii*, *Appaphycus alvarezii*, *Caulerpa lentillifera*, *Sargassum polycystum*, *Piper* species, *Arecaceae* family and *Solanum* species. The extracts obtained from the abovementioned plant species are suitable to be incorporated into edible or topical products, or as capsules, ointments, lotions and tablets.

**[0029]** The desired compounds to be extracted from the alcoholic extracts of are mainly constituted of, but not limited to, biophenols, proteins, lipids, saccharides, minerals and small peptides. Due to polarity of these compounds, the polar solvent such as alcohol is found to be effective in extracting these desired compounds from the plant matrix. To acquire optimal yield by using effective amount of extraction solvent, the ratio the pre-treated plant parts to the extraction solvent is preferably 1-3: 6-10 (w/v). More preferable, the plant parts of the *Piper* species and *Arecaceae* family are leaves.

**[0030]** Preferably, the pre-treated plant parts after subjecting to extraction can be separated by any known means and approaches in the art for disposal. Vacuum filtration is most preferred as such approach is commonly available. Similarly, vaporization of the used extraction solvent to concentrate compounds can be performed by different approaches. For example, drying the used extraction solvent using heat energy or vacuum drying. Concentrating the compounds by dissipating the used extraction solvent shall finally reach to the stage where the compounds are concentrated to a paste or powdery form. This paste or powdery form of compounds extract can then be utilized for various applications.

**[0031]** Attention is now drawn to another embodiment of the present invention which involves a comestible and topical composition with anti-cancer property comprising alcohol soluble extract derived the plant parts of Tropical seaweeds, *Solanum* spp. fruits and *Piper* spp. leaves and *Palmae* family using an appropriate extraction solvent. The comestibles mentioned herein can be any common daily consumed processed food such as bread, noodles, confections, chocolates, beverages, and the like. One skilled in the art shall appreciate the fact that the aforesaid extract can be incorporated into the processed comestibles, capsules, tablets or topical medicine thereon shall not depart from the scope of the present invention.

**[0032]** As setting forth in the above description, the composition with anti-cancer property comprising alcohol soluble extract from leaves of *Piper* and *Palm* species. Apart from that the composition may further comprise alcohol soluble extract derived from the plants of tropical seaweeds and *Solanum* species. More preferably, the plant is any one or combination of the plant species of, but not limited to, *Euchema cottonii*, *Appaphycus alvarezii*, *Caulerpa lentillifera*, *Sargassum polycystum*, *Elaeis guineensis*, *Elaeis ole-*

*ifera*, *Phoenix dactylifera* and *Cocos nucifera*, *Piper* spp. and *Solanum* species. In the most preferred embodiment, the *Piper* species is *Piper betel*. Similarly, the *Solanum* species is any one or combination of *S. mammosum*, *S. verbascifolium*, *S. tuberosum*, *S. trilobatum*, *S. torvum*, *S. seaforthianum*, *S. sarmentosum*, *S. nigrum*, *S. melongena*, *S. maroniense*, *S. microcarpon*, *S. jasininoides*, *S. indicum*, *S. ferox*, *S. coagulans*, *S. blumei*, *S. aculeatissimum*, while the tropical seaweed is any one or combination of *Eucheuma cottonii*, *Culerpa lentillifera*, *Appaphycus alvarezii* and *Sargassum polycystum*. The inventors of the present invention found that the alcohol soluble extract derived from the aforementioned species possesses both acceptable taste that confers the derived extract to be comfortably incorporated with the comestibles product, capsules, tablets or topical medicine with minimal additional refining process.

**[0033]** In one of the aspect, the *Palm* species is *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, *Phoenix dactylifera* and *Cocos nucifera*. Moreover, it is the leaves of these species used for extracting the useful compounds.

**[0034]** According to the preferred embodiment, the extract to be incorporated into the comestibles and medicine can be acquired from any known method not limited only to the foregoing disclosed method. Following to another embodiment, the extract is prepared in a concentrated form, preferably paste or powdery form which enables the extract to be incorporated in various formulations of the comestibles, capsules, tablets or topical products.

**[0035]** In line with the preferred embodiment, the extract shall be the plant metabolites which are susceptible to an extraction solvent. The compounds and small peptides with the anti-cancer and cardiovascular system health-promoting properties are those metabolites with polarity in the alcoholic extracts. Therefore, the extract from the alcoholic extracts of plant parts of tropical seaweeds, *Solanum* spp. and *Piper* spp. and *Palmae* family is preferably derives from the extraction solvent of water, alcohol, acetone, chloroform, liquid CO<sub>2</sub> and any combination thereof.

**[0036]** In view of the prominent property of promoting anti-cancer and general healthcare of the cardiovascular system by the extracts in a subject, further embodiment of the present invention includes a method comprising the step of administering orally or topically to the subject an effective amount of an extract derived from plant/s of tropical seaweeds, *Solanum* spp. fruit, palm spp. and *Piper* spp. Leaves.

**[0037]** The following example is intended to further illustrate the invention, without any intent for the invention to be limited to the specific embodiments described therein.

#### Example 1

**[0038]** Vegetative parts of the plants were collected, cleaned, washed and cut into small pieces and oven dried at 40° C. overnight. The dried material was ground using a blender and extracted three times with hot and cold alcohol (1:10 v/v) and three times with hot and cold water or with mixtures of chloroform and alcohol. Other solvent such as acetone may be used as a medium for the extraction. This is a process designed to separate soluble compound by diffusion from a solid matrix (plant tissue) using a liquid matrix (solvent). Alcohol, water, chloroform and acetone has produced good yield in extracting the active components. The extrac-

tion was done a few times. The pooled extracts were vacuum-dried at 40° C. and stored until used.

Example 2

**[0039]** The alcoholic extract of all these three tropical seaweeds species tested showed no toxicity to normal Vero cell line (Table 1). The alcoholic tropical seaweeds extracts exhibited dose and time depended inhibition against the proliferation of the five tested cancer cell lines. The IC50 values (Table 1) for breast cancer MDA-MB 231 cell line, were approximately 50 µg/ml for *S. Polycystum*, 60 µg/ml for *C. lentillifera*, and 100 µg/ml for *E. Cottonii*. The IC50 values for cervical cancer HeLa cell line, were approximately 30 µg/ml for *S. Polycystum*, 55 µg/ml for *C. lentillifera*, and 70 µg/ml for *E. Cottonii*. Amongst the tropical seaweeds extracts *S. Polycystum* extract (SPME) showed the strongest anti-proliferation activity against all the cancer cell lines tested with IC50 values of 25, 50, 30, 100, 150 µg/ml after 24 h treatment on breast cancer MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, liver cancer HepG2, and colon cancer HT-29 cells, respectively. A very good correlationship were found between the cancer cells anti-proliferation activity with the extracts total polyphenols content, and electron donor activities but not with their proton donor activities.

TABLE 1

The IC50 values of tropical seaweeds alcoholic dry extracts on various human cancer cell lines expressed as µg/ml, and Cytotoxicity on Vero cells				
Cell line	Incubation Time (hr)	IC50(µg/ml)		
		S. polycystum	C. lentillifera	E. cottonii
MCF-7	24	25 ± 0.1	30 ± 0.6	47 ± 0.1
	48	22 ± 0.3	30 ± 0.9	40 ± 0.4
	72	20 ± 0.2	25 ± 0.5	30 ± 0.5
HeLa	24	30 ± 0.3	55 ± 0.1	70 ± 0.4
	48	25 ± 0.4	48 ± 0.1	60 ± 0.8
	72	20 ± 0.1	40 ± 0.7	50 ± 0.4
MDA-MB-231	24	50 ± 0.4	60 ± 0.8	100 ± 0.3
	48	50 ± 0.6	50 ± 0.6	90 ± 0.2
	72	42 ± 0.3	40 ± 0.2	80 ± 0.4
HepG2	24	100 ± 0.1	110 ± 0.6	100 ± 0.5
	48	95 ± 0.5	100 ± 0.4	90 ± 0.6
	72	90 ± 0.8	100 ± 0.6	90 ± 0.1
HT-29	24	150 ± 0.2	200 ± 0.2	>200
	48	150 ± 0.3	150 ± 0.3	>200
	72	120 ± 0.5	120 ± 0.9	>200
Maximum non-toxic concentration on Vero cells (µg/ml) by observing morphological changes				
Vero cells		1000	1250	1000

Values are expressed as Mean ± Standard deviation, n = 3.

**[0040]** The methanolic tropical seaweeds extracts exhibited dose and time dependent inhibition against the proliferation of the breast cancer cell lines with IC50 values of 47 µg/ml after 24 h treatment.

**[0041]** In a preliminary study we showed that the methanolic tropical seaweeds (*Eucheuma cottonii*) extracts have cytotoxic effect on the five human cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, HepG2, and HT-29). The estrogen +ve human breast cancer MCF-7 cell line was the most sensitive and the human colon carcinoma HT-29 was the most resistant cell line to this tropical seaweeds extract. These results showed that the extracts of the tropical seaweeds selectively

inhibited the growth of particular or tumour cells. These results suggested that the active substances from tropical seaweeds interact with special cancer-associated receptors or cancer cell specific molecules, to trigger the mechanisms leading to cancer cell death.

**[0042]** Percentages of apoptotic MCF-7 cells in the presence of ECME (0-200 µg/ml) compared to normal cells are depicted in FIG. 1. The percentages of apoptotic cells increased from 18% to 76% by increasing the concentration of the tropical seaweeds extract from 40 to 200 µg/ml.

Example 3

**[0043]** Percentages of apoptotic MCF-7 cells in the presence of SPME (0-200 µg/ml) compared to normal cells are depicted in FIG. 1. Apoptosis (natural suicidal cell death) was evaluated using fluorescence microscopy by calculating the percentage of cells showing nuclear morphology of apoptosis after staining with Hoechst 33342. Percentages of apoptotic cells increased from 20% to 68% by increasing the concentration of the tropical seaweeds extract from 12.5 to 200 µg/ml. This increasing apoptosis did not occur in normal cell lines. The MTT assay showed them to be cytotoxic against all the cell lines in a dose dependent manner, with brown tropical seaweeds (*S. polycystum*) having the greatest inhibition. Cytotoxicity was not observed in normal Vero cell line. The estrogen positive breast cancer MCF-7 and human cervical adenocarcinoma HeLa cell lines were most sensitive to *S. Polycystum* crude methanol extract (SPME), with IC50 of 20 µg/ml, after 72 hours incubation. The IC50 value of SPME on MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, HepG2, and HT-29 cells was approximately 25, 50, 30, 100, 150 µg/ml after treatment for 24 h. Treatment of MCF-7 cells with various concentrations of SPME resulted in growth inhibition and induction of apoptosis in a time- and dose-dependent manner. The cancer cells anti-proliferative activities in the extracts were due to the phenolic compounds and electron donor free radical scavenging activities.

**[0044]** The cytotoxicity of the tropical seaweeds extracts was evaluated by examining the method of growth inhibition. When the growth inhibited cells were stained with Hoechst 33342, apoptotic cell death was observed in all the cancer cell cultures, and suggested that ECME caused irreversible damages in the cultured cancer cells.

Example 4

**[0045]** Tropical seaweeds administration lengthened the rat estrous cycle from 4.2±0.82 to 5.8±1.1 at 150 mg/kg body wt. and to 5.6±1.8 at 300 mg/kg body wt. The Institutional Animal Care and Use Committee (IAUC) of Faculty of Veterinary Medicine at University Putra Malaysia (UPM) approved all the experimental procedures, and all animal research were conducted according to the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. Rats were allowed for acclimatization a week before the induction. Previous reports suggest that exposure to estrogens and an imbalance in the estrogen/progesterone ratio may be the most critical determinants in risk of estrogen-dependent diseases. Japanese women (who have one of the lowest rates of breast, endometrial, and ovarian cancers in the world) have longer menstrual cycles and lower serum estradiol levels than their Western women. To date, these low rates have been partly attributed to the soy-rich diets inherent among Asian populations. Previous studies investigating the role of dietary soy or genistein on the rat

estrous cycle showed either no effects or only a modest 10% increase in cycle length, suggesting that tropical seaweeds may exert a greater effect in increasing cycle length than soy intake. The tumour (cancer) incidence rate of each group respectively was 87.5% (7%) in control untreated group, 37.5 (3%) in low 150 mg/kg dose *Eucheama cottonii* methanolic extract (ECME) group, 12.5% (1%) in high 300 mg/kg dose ECME group. Statistical analysis showed that the tumor incidence rates of both treated groups were significantly lower than that of control group. The total tumor volume of each group respectively was: 9.8 cm<sup>3</sup> in control untreated group, 0.95 cm<sup>3</sup> in 300 mg/kg ECME group, 2.4 cm<sup>3</sup> in 150 mg/kg ECME group. Statistical analysis showed that the total tumor volume of all treated groups were significantly (P<0.05) smaller than that of control untreated group.

Example 5

[0046] An experiment whereby 40 rats were randomly divided into 5 groups consist of eight rats in each group, with one negative control group (normal diet) was conducted (FIG. 1). Rat mammary gland tumour were induced using rat mammary gland cancer cells inoculated subcutaneously into mammary fat pad (right flank) of female Sprague-Dawley rats with a 200 µl of cell mixture (total 6×10<sup>7</sup> cells) using a 26-gavage needle. Oil palm fronds extract (OPFE) were dissolved in water and administered orally. All animals were inspected daily, while body weights were recorded weekly. Rats were palpated weekly to monitor tumor development. The diameters of each tumor were measured with calipers and tumor volume was calculated using the following formula: largest diameter×(smallest diameter)<sup>2</sup>×0.4.

high dose 300 mg/kg post inoculation treatment (H-PoIT) group. Statistical analysis showed that the tumor incidence rates of H-PIT, L-PIT, H-PoIT and L-PoIT groups were significantly (P<0.05) lower than that of control group. The tumor incidence rate of the L-PoIT group was significantly higher than the other treated groups. The difference of the tumor incidence rate of L-PIT group and H-PoIT group did not have difference significance.

[0048] The total tumor volume of each group respectively was: 10.7 cm<sup>3</sup> in control group, 0.8 cm<sup>3</sup> in H-PIT group, 1.4 cm<sup>3</sup> mL-PIT group, 0.9 cm<sup>3</sup> in H-PoIT group and 2.6 cm<sup>3</sup> in L-PoIT group. Statistical analysis showed that the total tumor volume of all treated groups were significantly smaller than that of the untreated control group. The total tumor volume of L-PoIT group and L-PIT group were significantly bigger than that of high dose groups. POFE showed an anti-proliferation effect on the growth of MCF-7 cells at medium and high concentration like estrogen. The results showed that consumption of POFE benefitted the animals in preventing new development of breast cancer or therapeutic treatment of a pre-existing one. The benefits of consumption of the plant product thus indicate a possible component in a prevention and treatment strategy. In the present study, we found the tumor incidence, and the sums of tumor volume in all treatments groups were lower than that of control group. We previous showed, oil palm frond methanolic extract contained high phenolic and flavonoid compounds and moderate antioxidant activities.

Example 6

[0049] Six selected tropical edible plants (*Anacardium occidentale*, *Morinda elliptica*, *Cymbopogon citratus*, *Piper*

TABLE 2

Experimental procedures and mammary tumors among the groups at autopsy							
Group Name	Group Details	Acclimation (1 week)	Pre-inoculation Treatment (4 week)	Inoculation	Post-inoculation Treatment (2 week)	Incidence (%)	Total Volume (cm <sup>3</sup> )
A = Ctrl	Control	+	-	+	-	87.5% <sup>a</sup>	10.7
B = L.PIT	Pre & post inoculation with low dietary OPFE (150 mg/kg)	+	+	+	+	25% <sup>c</sup>	1.4
C = H.PIT	Pre & Post inoculation with high dietary OPFE (300 mg/kg)	+	+	+	+	12.5% <sup>d</sup>	0.8
D = L <sub>1</sub> PoIT	Post-Inoculation with low dietary OPFE (150 mg/kg)	+	-	+	+	37.5% <sup>b</sup>	2.6
E = H <sub>1</sub> PoIT	Post-Inoculation with high dietary OPFE (300 mg/kg)	+	-	+	+	25% <sup>c</sup>	0.9

Incidence rate followed by different superscript alphabets were significantly different at 5% level.

[0047] The tumour incidence rate of each group respectively was 87.5% (7%) in control group, 25% (2%) in low dose 150 mg/kg pre and post inoculation treatment (L-PIT) group, 12.5% (1%) in high dose 300 mg/kg pre and post inoculation treatment (H-PIT) group, 37.5% (3%) in low dose 150 mg/kg post inoculation treatment (L-PoIT) group, and 25% (2%) in

*betle*, *Carica papaya* and *Elaeis guineensis*) were compared for anti-cancer activity using the MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-di-phenyl tetrazolium bromid). The MTT assay is used to determine the cytotoxic property of methanol plant extracts on "MDA-MB-435 estrogen receptor-negative human breast cancer" cells using the IC<sub>50</sub> (50% Inhibitory

Concentration) value as an indicator of their effectiveness. The strongest anti-cancer effects were shown by the *Piper betle* leaf extract that exhibited  $IC_{50}$  value of 18 ( $\pm 9.07$ )  $\mu\text{g/ml}$  against the MDA-MB-435 estrogen receptor-negative human breast cancer cell, followed by *Carica papaya* [66.00 ( $\pm 8.48$ )  $\mu\text{g/ml}$ ], *Morinda elliptica* [68.25 ( $\pm 9.18$ )  $\mu\text{g/ml}$ ], *Cymbopogon citratus* [71.00 ( $\pm 9.15$ )  $\mu\text{g/ml}$ ], and *Elaeis guineensis* [75.00 ( $\pm 8.63$ )  $\mu\text{g/ml}$ ]. *Anacardium occidentale* showed no measurable inhibition by MTT assay. All the edible tropical plant leaves showed no cytotoxicity on normal human cell lines.

1-13. (canceled)

14. A composition with anti-cancer properties comprising an alcohol soluble extract from leaves selected from the group consisting of *Piper* species, Palm species, and combinations thereof.

15. A composition according to claim 14, further comprising an alcohol soluble extract from plant parts of *Solanum* species and/or tropical seaweeds.

16. A composition according to claim 15, wherein the *Solanum* species is selected from the group consisting of *S. mammosum*, *S. verbascifolium*, *S. tuberosum*, *S. trilobatum*, *S. torvum*, *S. seaforthianum*, *S. sarmentosum*, *S. nigrum*, *S. melongena*, *S. maroniense*, *S. microcarpon*, *S. jasminoides*, *S. indicum*, *S. ferox*, *S. coagulans*, *S. blumei*, *S. aculeatissimum*, and combinations thereof.

17. A composition according to claim 15, wherein the tropical seaweeds is selected from the group consisting of *Kappaphycus* species, *Euchema* species, *Caulerpa* species, *Sargassum* species, and combinations thereof.

18. A composition according to claim 14, wherein the Palm species is selected from the group consisting of *Elaeis* species, *Phoenix* species, *Cocos* species, and combinations thereof.

19. A method for obtaining an alcohol soluble extract with anti-cancer properties from plant parts of *Piper* species, palm species, *Solanum* species and/or tropical seaweed, comprising:

pre-treating plant parts of the *Piper* species, *Solanum* species and/or tropical seaweed;

subjecting the pre-treated plant parts for extraction using a first polar extraction solvent comprising an alcohol;

subject the pre-treated plant parts using a second polar extraction solvent comprising water; and

concentrating the first and second polar extraction solvent to form a powdery or paste-like composition after removing the pre-treated plant parts.

20. A method according to claim 19, wherein the *Solanum* species is selected from the group consisting of *S. mammosum*, *S. verbascifolium*, *S. tuberosum*, *S. trilobatum*, *S. torvum*, *S. seaforthianum*, *S. sarmentosum*, *S. nigrum*, *S. melongena*, *S. maroniense*, *S. microcarpon*, *S. jasminoides*, *S. indicum*, *S. ferox*, *S. coagulans*, *S. blumei*, *S. aculeatissimum*, and combinations thereof.

21. A method according to claim 19, wherein the Palm species is selected from the group consisting of *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, *Phoenix dactylifera*, *Cocos nucifera*, and combinations thereof.

22. A method according to claim 19, wherein ratio of weight of the pre-treated plant parts to the first polar extraction solvent is in a range of 1-3:6-10 (w/v).

23. A method according to claim 19, wherein the plant parts of the *Piper* species are leaves.

24. A method according to claim 19, wherein the tropical seaweeds is selected from the group consisting of *Kappaphycus* species, *Euchema* species, *Caulerpa* species, *Sargassum polycystum*, and combinations thereof.

\* \* \* \* \*



US 20080145380A1

(19) **United States**

(12) **Patent Application Publication**  
**Teas**

(10) **Pub. No.: US 2008/0145380 A1**

(43) **Pub. Date: Jun. 19, 2008**

(54) **ALGAE AND CANCER TREATMENT**

**Publication Classification**

(76) **Inventor: Jane Teas, Columbia, SC (US)**

(51) **Int. Cl.**  
*A61K 36/05* (2006.01)  
*A61P 35/04* (2006.01)  
*A61K 36/03* (2006.01)

**Correspondence Address:**  
**The Weintraub Group, P.L.C.**  
**Suite 240, 32000 Northwestern Highway**  
**Farmington Hills, MI 48334**

(52) **U.S. CL. .... 424/195.17**

(57) **ABSTRACT**

(21) **Appl. No.: 12/002,451**

A composition for primary prevention, treatment to slow progression of cancer or as an adjuvant therapy in treating cancer is defined by a mixture of a blue-green algae and a brown algae. These algae may be ingested simultaneously or serially. The composition may be formulated as a component of nutritional supplement. The composition and/or nutritional supplement may be ingested as a tablet, gel cap, emulsion, liquid, syrup or the like.

(22) **Filed: Dec. 17, 2007**

**Related U.S. Application Data**

(60) **Provisional application No. 60/875,183, filed on Dec. 15, 2006.**

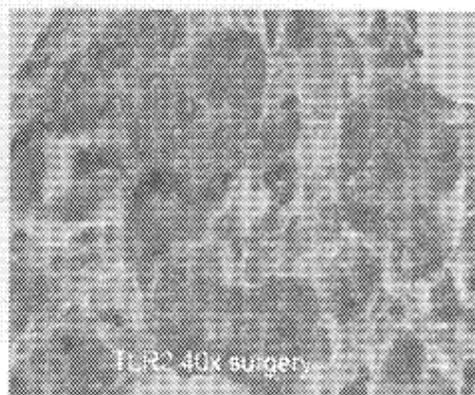
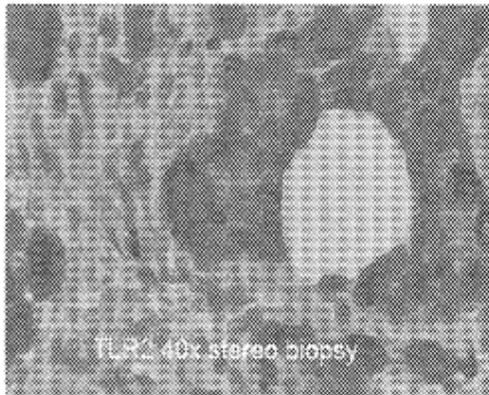
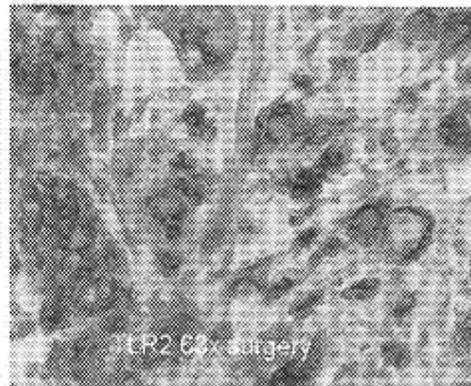


Figure 1

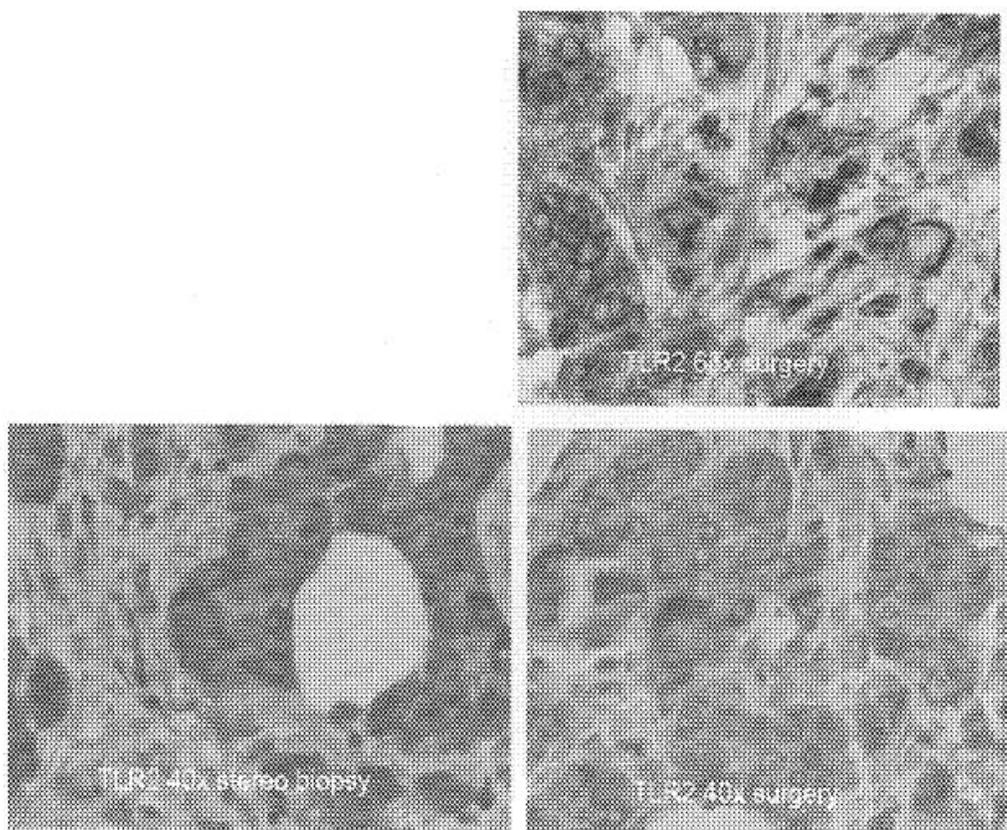


Figure 2

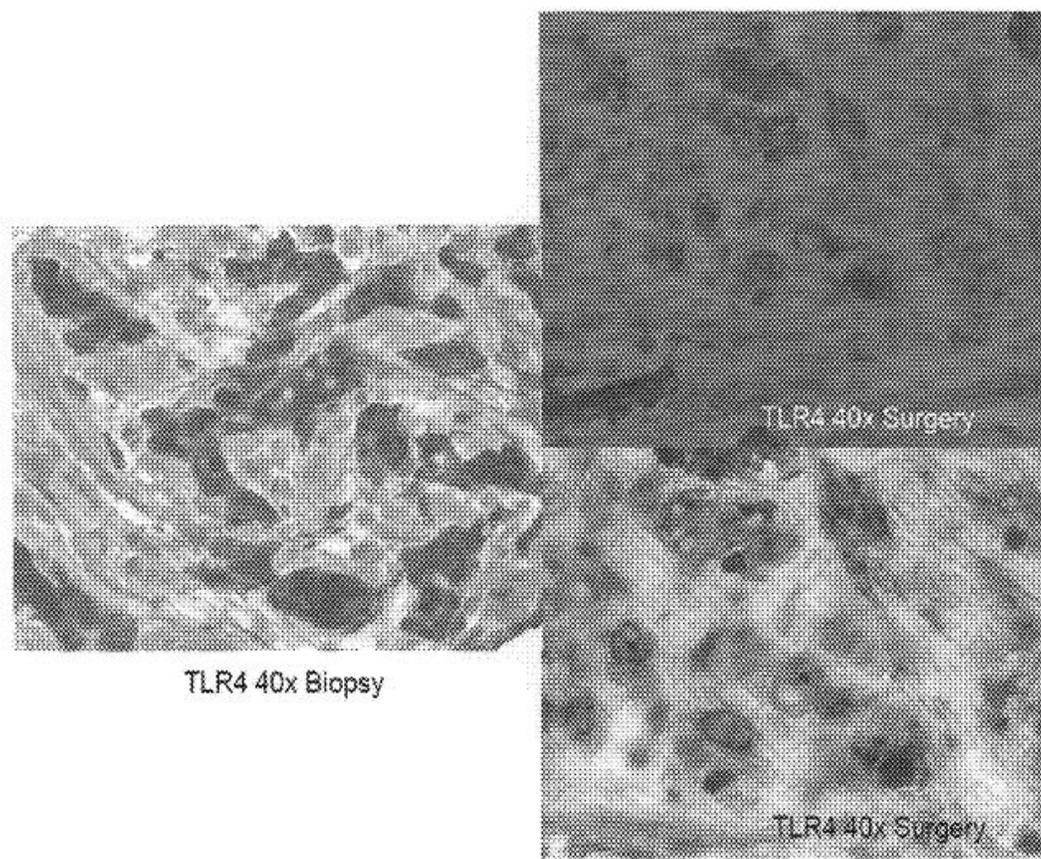


Figure 3

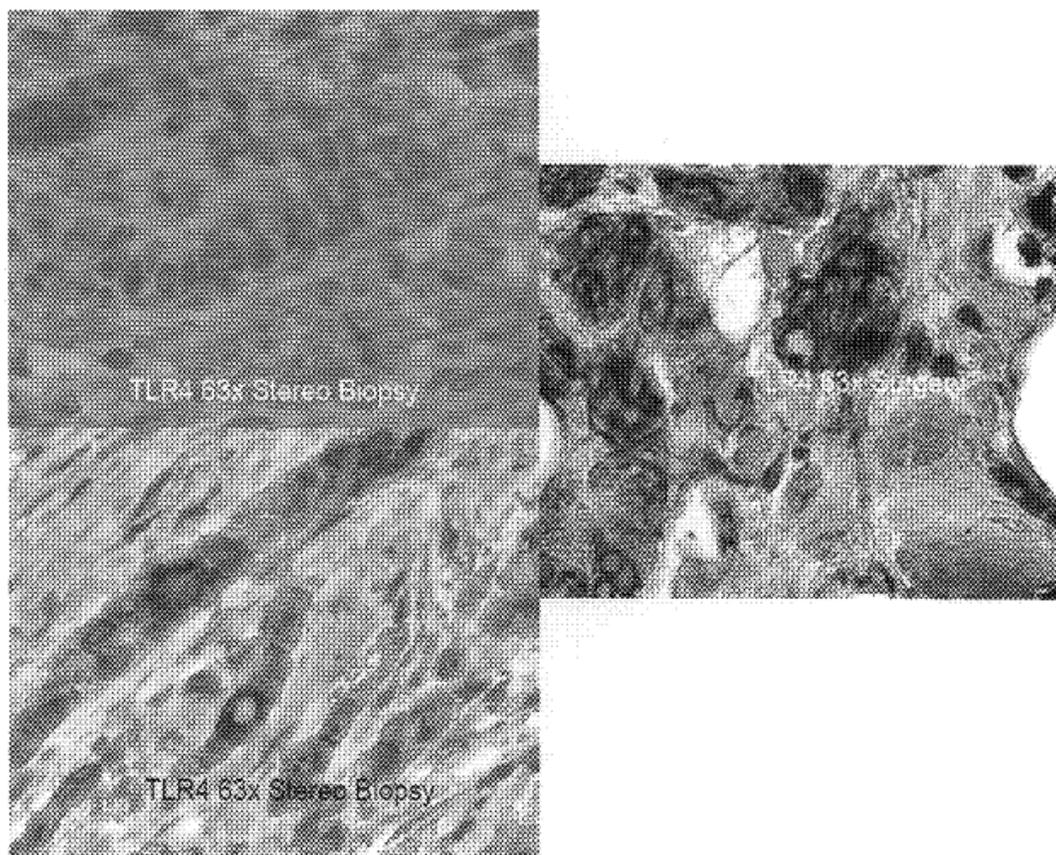


Figure 4

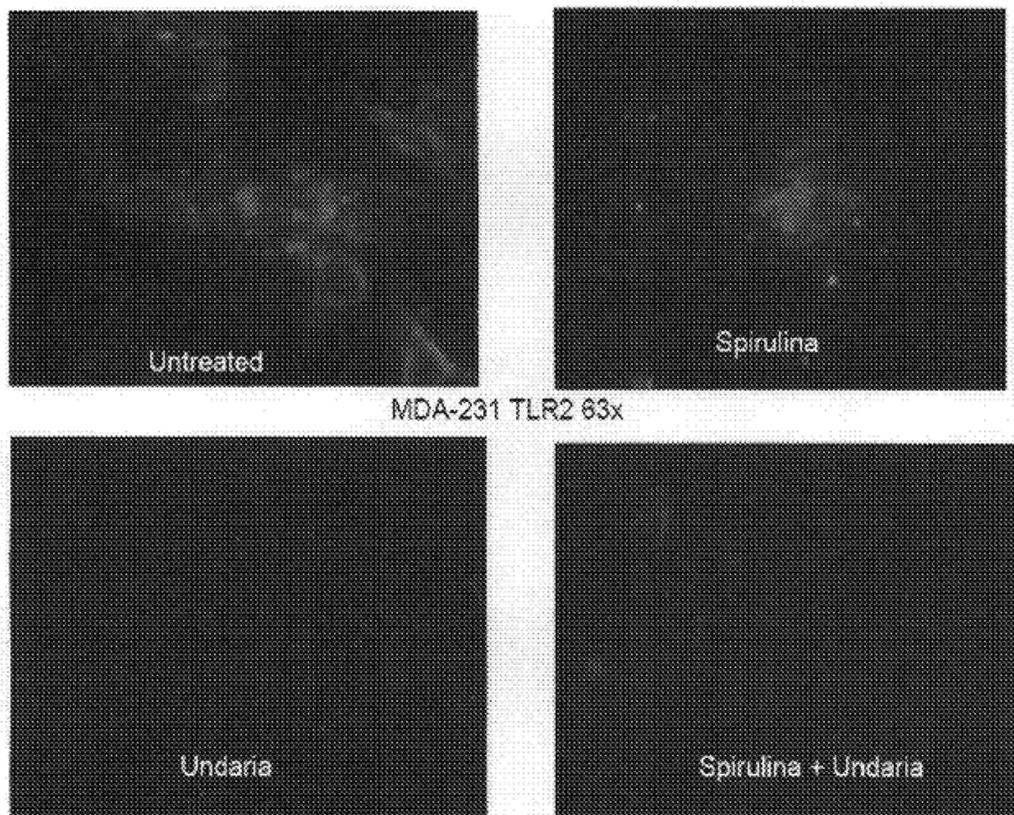


Figure 5

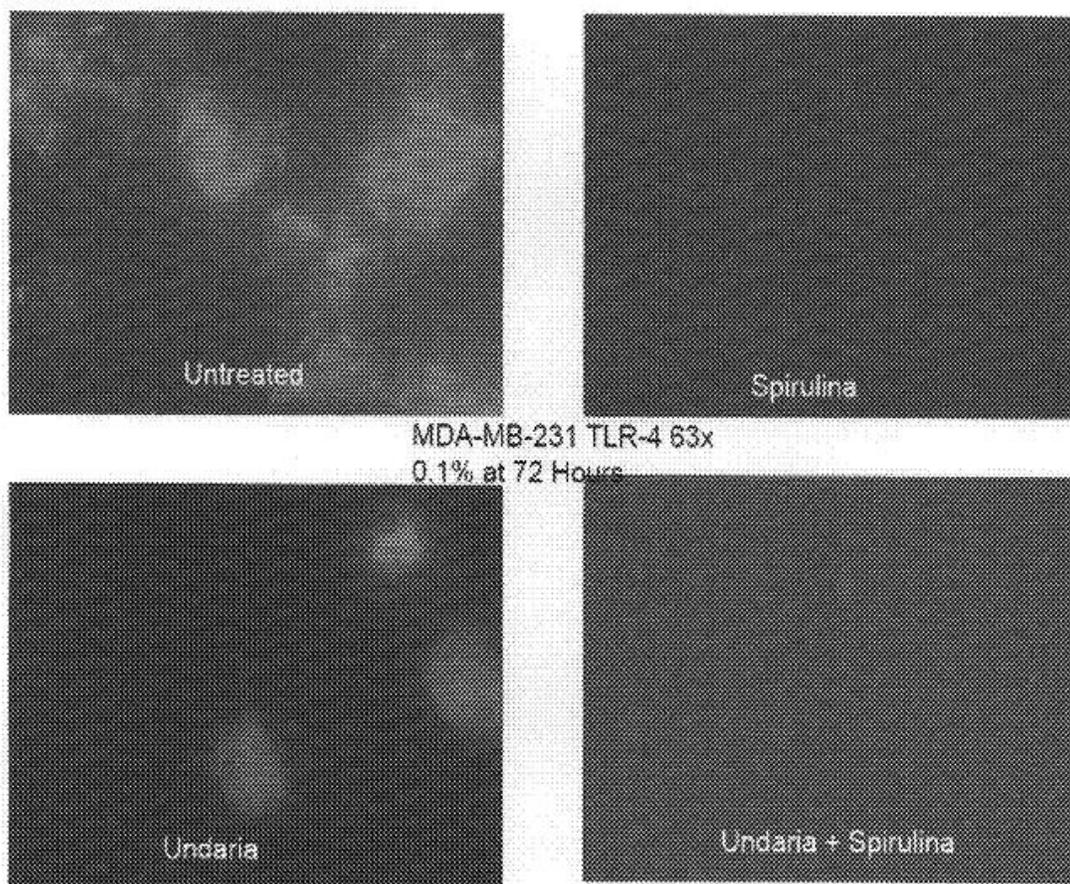


Figure 6

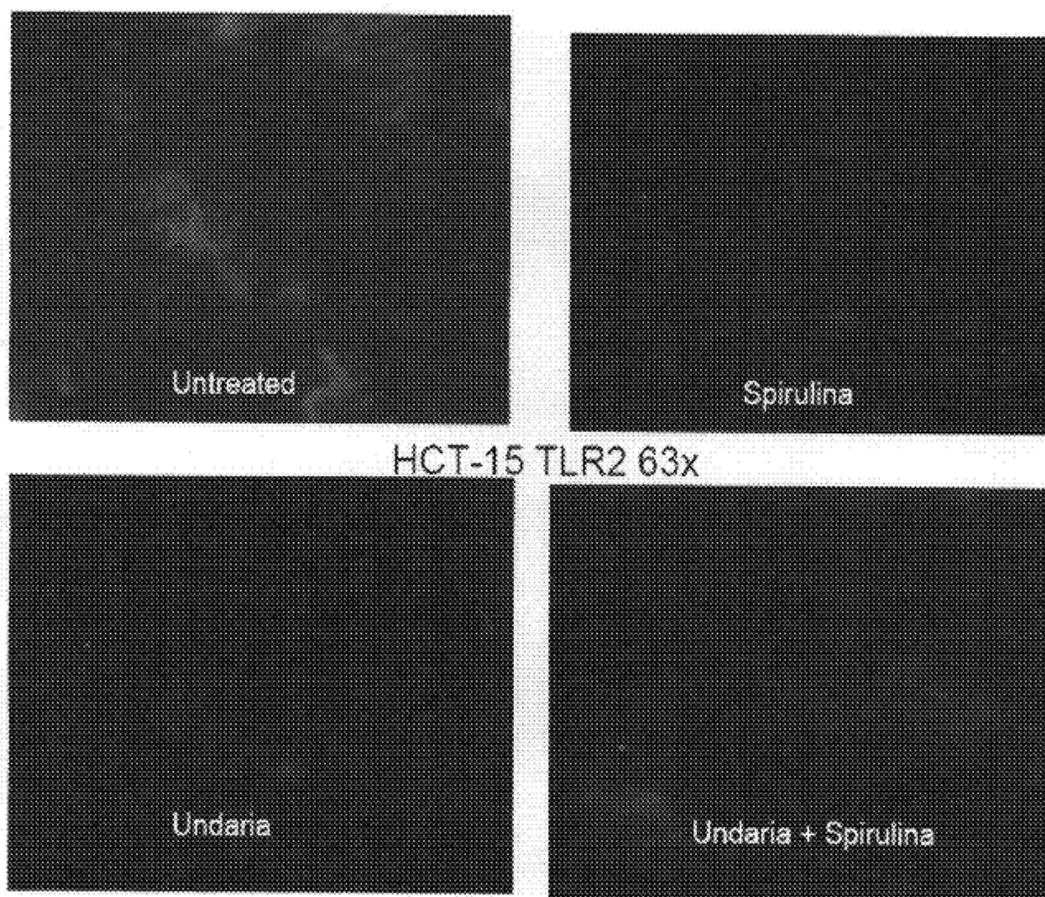


Figure 7

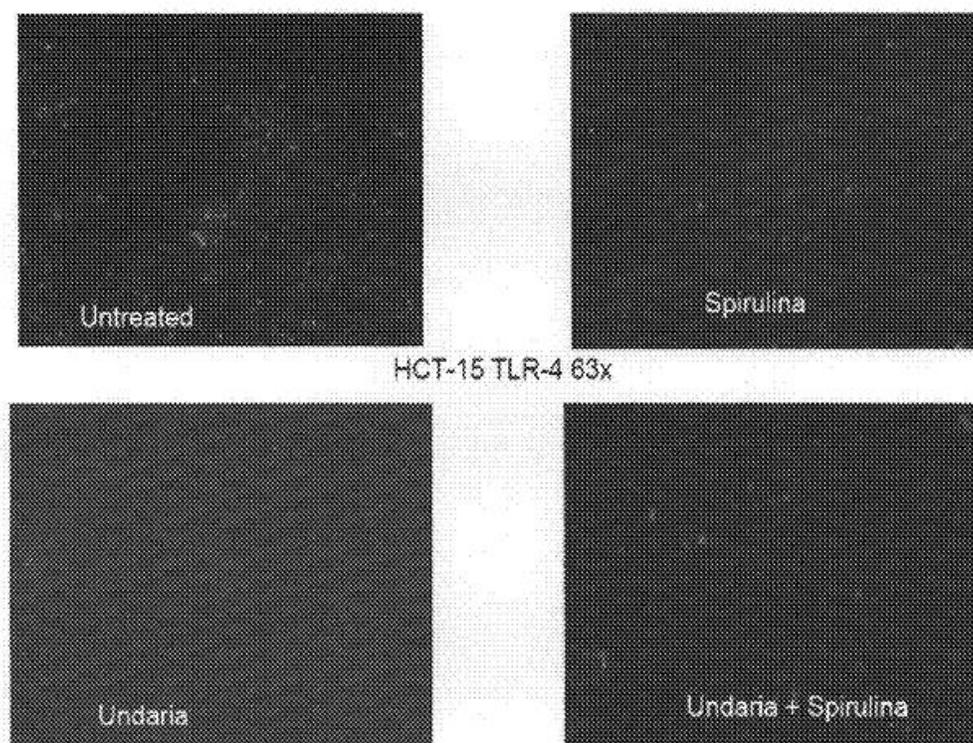
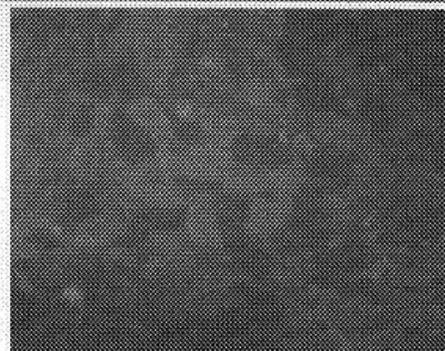
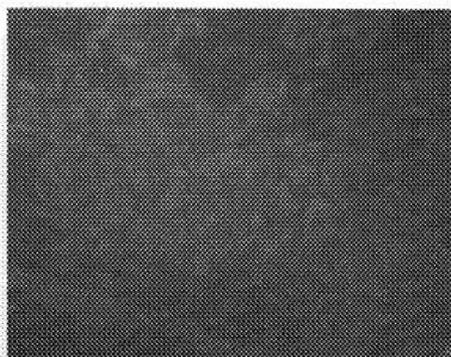


Figure 8

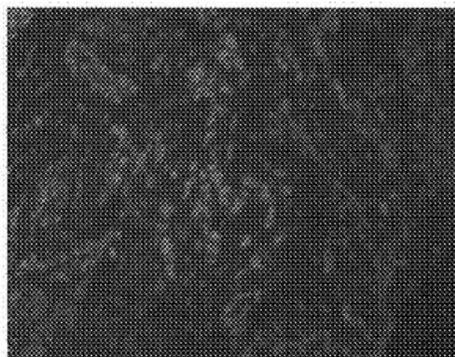


PR Stereo with DAPI 200x

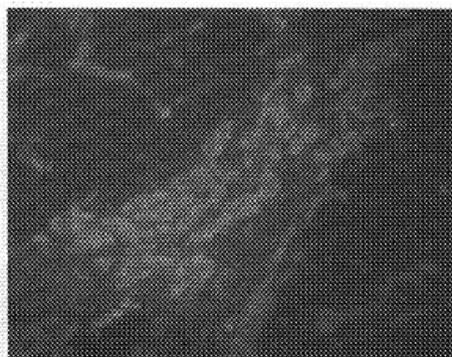


PR Surgery DAPI 200x

Figure 9



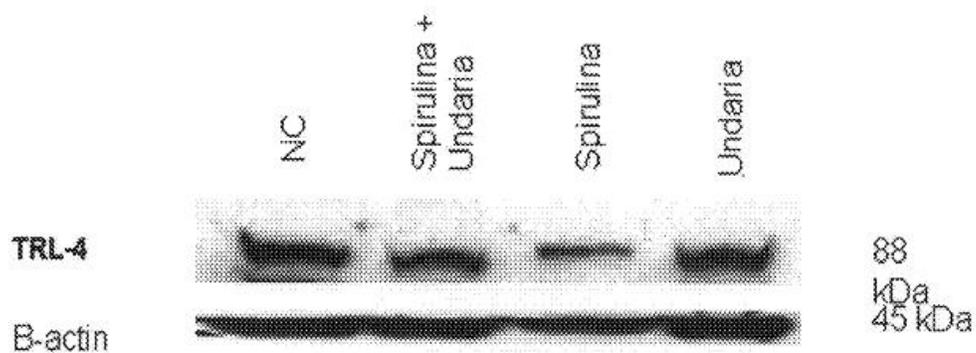
ER Stereo with DAPI 200x



ER Surgery with DAPI 200x

**Figure 10**

The effects of Spirulina and Undaria on HCT-15 TLR-4 protein expression



**Figure 11**

The effects of Spirulina and Undaria on MDA-MB-231 TLR-4 protein expression

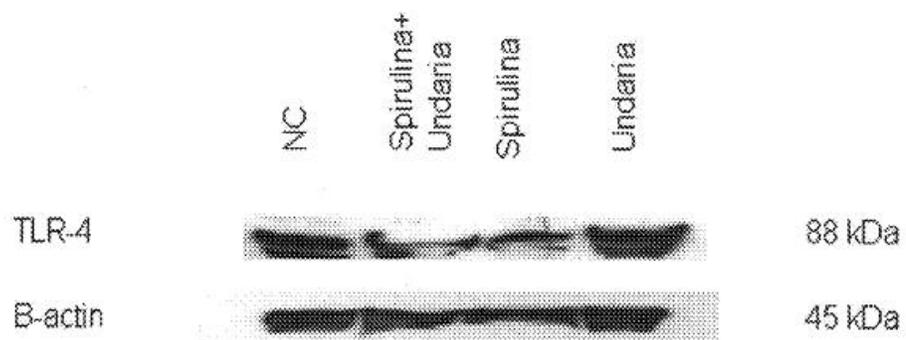


Figure 12

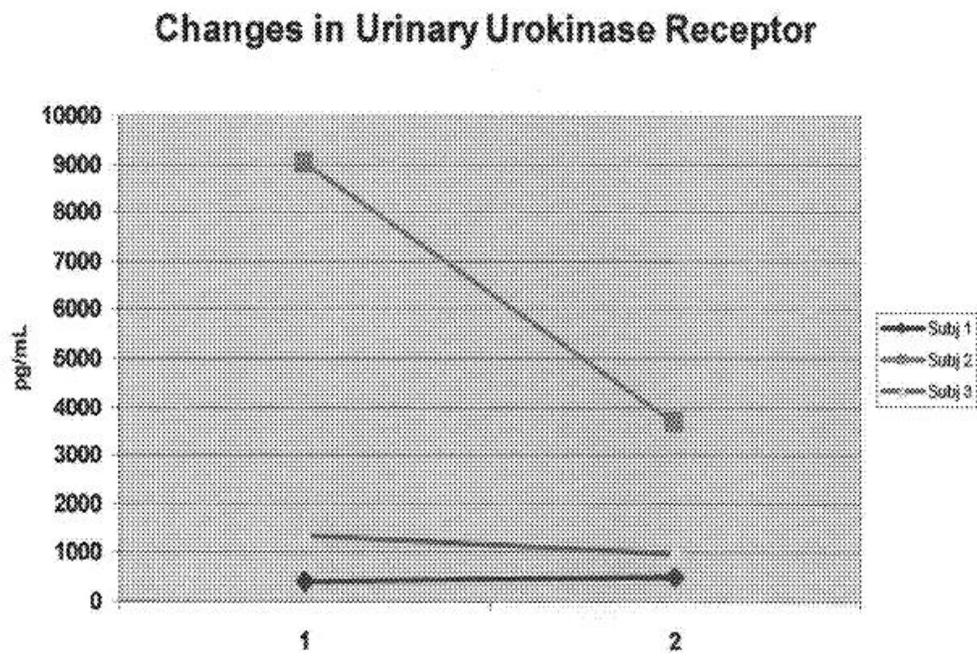
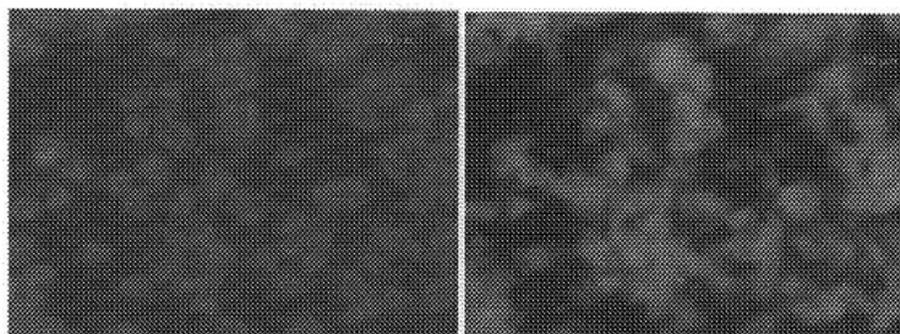
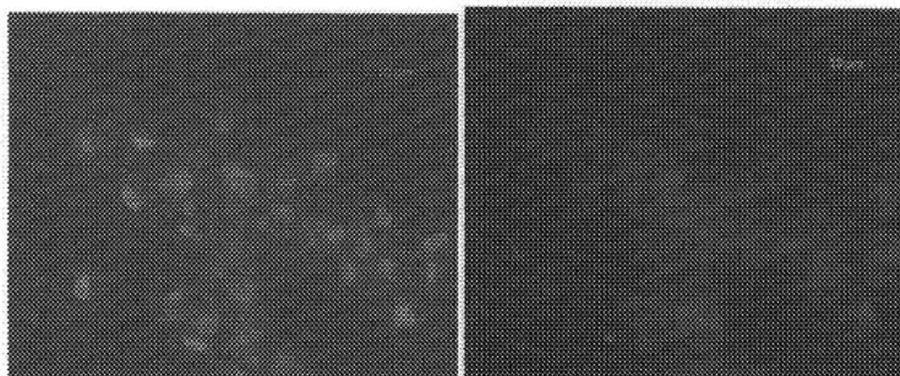


Figure 13



1. Control DAPI

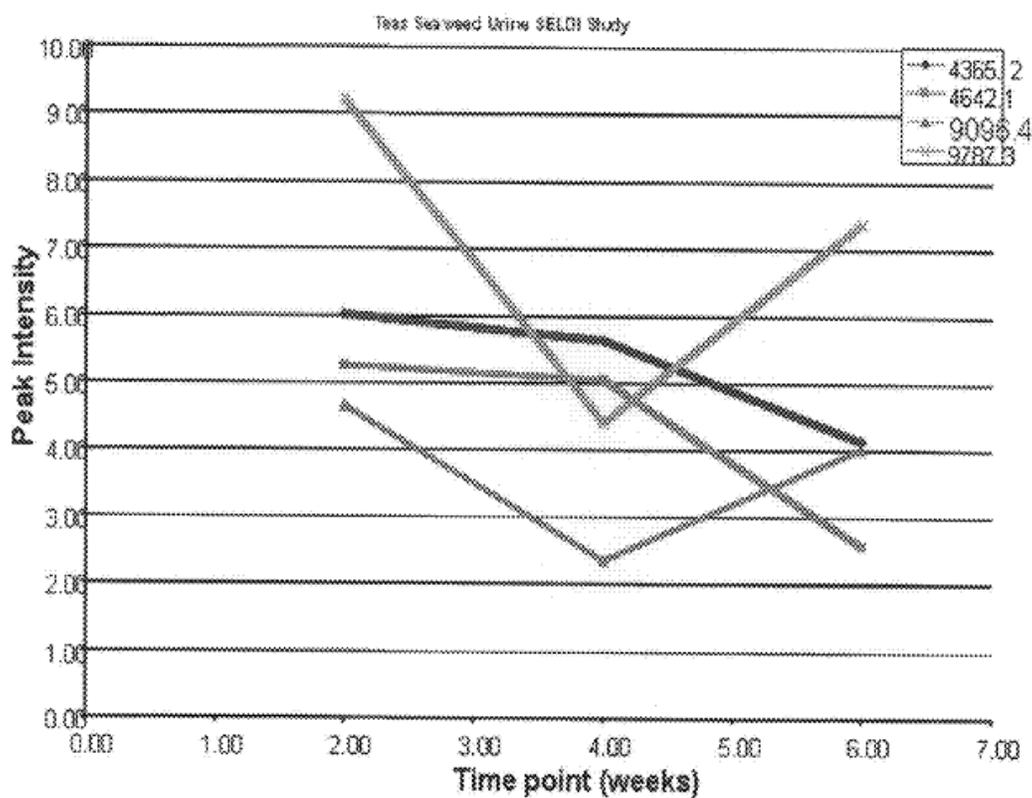
Control stained for urokinase



2. Seaweed plus Spirulina DAPI

Seaweed plus Spirulina stained for urokinase stain

Figure 14



**ALGAE AND CANCER TREATMENT**

**CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

[0001] This application is a completion application of co-pending U.S. provisional application Ser. No. 60/875,183, filed Dec. 15, 2006, the entire disclosure of which is hereby incorporated by reference.

**FIELD OF INVENTION**

[0002] The present invention relates to the novel use of dietary algae to reduce cancer cell metabolism.

**BACKGROUND OF INVENTION**

[0003] The epidemiologic evidence for seaweed as a chemopreventive food is very compelling. Although daily seaweed consumption is not uniform, even in Japan, people in Okinawa consume more seaweed and more pork, but have the lowest cancer incidence, mortality, and longest life spans<sup>1</sup>. Using data from the 1970s, predating widespread westernization of the Japanese diet, Japanese women had one third the rate of pre-menopausal breast cancer and one ninth the rate of postmenopausal breast cancer<sup>2</sup>. When a Japanese woman developed breast cancer, she was more likely to survive at least five years longer than a woman diagnosed with breast cancer in the United States<sup>3,4</sup>, and this seems to continue even after Japanese women immigrate to the US<sup>5,6</sup>. In a more recent study, Asian women who were born in the US have 60% higher risk of developing breast cancer than Asian women born in Asia<sup>7</sup>. This difference is even more striking when recent immigrants from Asia are compared to those who have been in the US for 10 or more years: their increased risk of developing breast cancer is 80% higher than Asian women who have lived in the US for less than 10 years. This argues strongly for an effect of environment and probably diet. Many food habits change with migration, including increased meat and milk, decreased vegetables, decreased rice, and especially decreased dietary seaweed.

[0004] In addition, other epidemiological studies of diet and cancer have yielded important correlates of dietary risks for developing cancer, such as high sugar, low fruit and vegetable intake, and high fat intakes, but there has only been one clinical study of a specific dietary intervention for people with diagnosed cancer. The first study by Thompson<sup>8</sup> suggests that supplementation with flaxseed can improve the tumor characteristics (higher apoptosis, lower tumor cell proliferation, and decreased HER2 expression) even during a short period of time between breast cancer diagnosis and breast cancer surgery. Dietary manipulations after cancer diagnosis are welcome additions for cancer patients who would like to be able to increase their likelihood of survival by as many avenues as possible. Dietary algae, a common food in countries like Japan and Korea, where breast cancer rates are significantly lower than in the US, could have an effect on breast cancer cells in breast cancer patients.

[0005] *Spirulina* is a common dietary supplement. As food, it is currently used by people living along the shores of Lake Chad and was been used by the Aztecs about 500 years ago<sup>9</sup>. In Chad, the average daily dose of *spirulina* is between 9-12 g/d dry weight 10. Its efficacy in cancer treatment is less well researched than that of seaweeds, but nine studies have shown *spirulina* to induce cancer cell apoptosis<sup>11-14</sup>, inhibit tumor cell proliferation<sup>11, 14, 15</sup>, inhibit carcinogen metabolism<sup>16</sup>,

17, inhibits tumor metastases in animals<sup>18</sup>, immune stimulation<sup>19-21</sup>, including two studies in humans, one showing immune enhancement<sup>22</sup>, and one showing inhibition of oral precancerous lesions<sup>23</sup>. Most recently, inhibition of cyclooxygenase-2, leading to decrease prostaglandin production and upregulated Bcl-2 expression<sup>14</sup> in normal cells treated with chemotherapy, and downregulated Bcl-2 in tumor cells<sup>13</sup> have been identified, as well as caspase 3 activation<sup>24</sup>. Cell cycle arrest has also been identified, leading to increased apoptosis of cancer cells but protection of normal cells<sup>12</sup>. These studies show *spirulina* may have pro-apoptotic activity against tumor cells and be protective of healthy cells and whole animals.

[0006] This background forms the basis for further examination of the biologic basis of algae's inhibitory effects on breast cancer. An initial study was conducted in rats and was designed to answer the question of whether dietary seaweed could inhibit DMBA-induced mammary tumors. In a study of *Laminaria angustata* (one of the most commonly consumed seaweeds in Japan), there was a doubling in the time to developing the first tumor, and significantly fewer tumors per tumor bearing rat<sup>25</sup>. Three other investigators, using two different species of brown seaweed (*Laminaria religiosa*<sup>26, 27</sup>, and *Undaria pinnatifida*<sup>28</sup>), all replicated the Teas study using seaweed as a protective dietary component against DMBA-induced cancers and reported similar protective effects.

**SUMMARY OF INVENTION**

[0007] In accordance with the purposes of this invention, as embodied and broadly described herein, this invention, in one aspect, relates to the use of algae to reduce cancer cell metabolism. Additional advantages of the invention will be set forth in part in the description which follows or may be learned by practice of the invention.

[0008] For a more complete understanding of the present invention reference is made to the following detailed description and accompanying drawings, in which:

**DESCRIPTION OF THE FIGURES**

[0009] The patent or application file contains at least one drawing executed in color. Copies of this patent or patent application publication with color drawings will be provided by the Office upon request and payment of the necessary fee.

[0010] FIG. 1 shows:

- TLR2 40X stereo biopsy
- TLR2 63X surgery
- TLR2 40X surgery

[0011] FIG. 2 shows:

- TLR4 40X stereo biopsy
- TLR4 40X surgery
- TLR4 40X surgery

[0012] FIG. 3 shows:

- TLR4 63X stereo biopsy
- TLR4 63X surgery
- TLR4 63X surgery

[0013] FIG. 4 shows:

MDA-231 TLR2 63X:

[0014] FIG. 5 shows:

MDA-231 TLR4 63X:

[0015] FIG. 6 shows:

HCT-15 TLR2 63X:

[0016] FIG. 7 shows:

HCT-15 TLR4 63X:

[0017] FIG. 8 shows:

PR Stereo with DAPI 200X

PR Surgery DAPI 200X

[0018] FIG. 9 shows:

ER Stereo with DAPI 200X

ER Surgery with DAPI 200X

[0019] FIG. 10 shows the effects of *Spirulina* and *Undaria* on HCT-15 TLR-4 protein expression.

[0020] FIG. 11 shows the effects of *Spirulina* and *Undaria* on MDA-MB-231 TLR-4 protein expression.

[0021] FIG. 12 shows the Changes in Urinary Urokinase Receptors for a study performed on three women with newly diagnosed breast cancer.

[0022] FIG. 13 shows:

Control DAPI

Seaweed plus *Spirulina* DAPI stain

Control stained for urokinase

Seaweed plus *Spirulina* stained for urokinase

[0023] FIG. 14 shows peak intensity in a SELDI study over a number of weeks.

#### DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION

[0024] It is to be understood by one of ordinary skill in the art that the present discussion is a description of exemplary embodiments only, and is not intended as limiting the broader aspects of the present invention.

[0025] The following experiments are provided to illustrate the present invention and are not intended to limit the scope of the invention. This invention claims compositions containing cyanobacteria and seaweed. It also claims a method of treating or preventing cancer in a subject, comprising administering the composition to the subject.

#### Methods

[0026] Subjects with newly diagnosed needle biopsy proven breast cancer are recruited for a study of dietary algae. The study is conducted during the three week period between needle biopsy diagnosis and surgery. Subjects are given a baseline PET/CT scan, given algae (seaweed and *spirulina*), and return for a follow-up PET/CT scan one week later. Subjects continue to take the algae until 48 hours before their surgery.

[0027] On average, seaweed intake in Japan is estimated between 4 and 7 g/d dry weight<sup>29</sup>. In Chad, *spirulina* comprises 9-12 g/d dry weight. Although there are only a few studies that address the appropriate therapeutic dose of algae in humans, a study by Sekiya extrapolated from the dose of seaweed needed to induce apoptosis of breast cancer cells to the human body and estimated that 5 g/d of seaweed would be sufficient<sup>30</sup>. In the study by Mathew, the dose of 1 g of *spirulina*/d was sufficient to cause the complete regression of precancerous oral cancer lesions.<sup>23</sup> In this study, subjects are given 5 capsules of *Undaria* and 5 capsules of *Spirulina* per day. Each capsule contains 500 mg of the algae for a total of 2.5 grams of *Undaria* and 2.5 grams of *spirulina* per day.

[0028] PET scans are an imaging technique that uses radioactive labeled sugar to plot areas within the body that have abnormally high glucose uptake, indicating active cancer. It is ideal for assessing primary tumors, metastases, monitoring therapeutic changes associated with treatment and detecting tumor growth, as it measures reductions in glucose uptake by tumor cells within hours of administration of a therapy. The use of PET scans to determine response to chemotherapy and extent of cancer dissemination within the body has high specificity (88%-93%) and sensitivity (84-87%)<sup>31</sup>, and has accurately identified response to chemotherapy (between 88% and 91%)<sup>32</sup> an average of 7 days after commencement of treatment.

[0029] Biological response is measured by histologic changes. A correlation is made between PET/CT scan results with changes seen in subsequent histology measures determined from breast cancer surgical specimens and changes between pre algae and post algae, and for a dose response as measured by duration of algal intake. Changes are measured in cancer cell morphology, immunochemistry staining, including estrogen receptor status (positive and negative), progesterone status (positive and negative), Ki-67 labeling index as a measure of cancer cell proliferation, Epstein Bar Virus, CXCR4, CCR5, Toll like receptors 2 and 4, p53 expression, MAP kinase pathway modulation (ERK phosphorylation), and expression of HER2, a cytoplasmic transmembrane receptor protein. In addition, analysis of urine for urokinase receptor levels was done pre and post the algae intervention.

[0030] In a similar dietary study using a flaxseed intervention for newly diagnosed breast cancer patients conducted during the time between breast cancer biopsy and surgery, Thompson reported significant reduction in cancer cell proliferation (Ki-67 labeling index) (18.1% controls vs. 12.6% flaxseed;  $p < 0.001$ ), increased cancer cell death (apoptosis index) (0.89% controls vs. 1.15% flaxseed;  $p < 0.007$ ), and decreased HER2 expression (0.47 pre vs. 0.34 post;  $p < 0.003$ ). Slight but not statistically significant increases in estrogen receptor (0.78 pre vs. 0.81 post) and progesterone receptor status (0.11 pre vs. 0.14 post) were seen in the flaxseed treatment, compared to non-significant decreases in these scores for the placebo arm (ER receptor status (0.72 pre vs. 0.65 post) and PR score (0.19 pre vs. 0.17 post))<sup>8</sup>. PET/CT scan confirmation of changes in cancer cell activity was not included in the Thompson study.

[0031] To further delineate the activity of seaweed, a pilot study of the impact of healthy postmenopausal women who consume 5 g/d of *Undaria* has been conducted. Profiling of serum and urinary proteins using surface enhanced laser desorption/ionization time of flight (SLEDI-TOF) mass spectrometry has become increasingly specific and can now identify with high sensitivity and specificity cancer types,

including breast cancer status based on the specific changes in proteomic biomarkers. In this study, Recent studies (reviewed by Laronga<sup>33</sup> have shown that using SELDI-TOF can differentiate between BrCa1 carriers and healthy controls. These studies include the following: 1)  $1\frac{1}{2}$ s women with BrCa1 compared to one of the 15 non-carriers; 2)  $1\frac{1}{4}$ s patients with breast cancer even 6-9 months following treatment for breast cancer, compared to healthy controls; and 3) sentinel lymph node positive ( $2\frac{2}{2}$ ) patients from sentinel lymph node negative ( $3\frac{5}{7}$ ) patients. Array technology used for the discovery, validation, identification, and characteristics of disease-associated proteins from biological samples, such as SELDI ProteinChip® technology, is the primary proteomic platform technology for the NCI Early Detection Research Network (EDRN) study of early detection biomarkers of cancers (e.g., reviews by Grizzle et al.<sup>34, 35</sup>. In addition, array technology such as SELDI ProteinChip® technology has been used to identify changes in protein expression associated with the addition of novel foods, like green tea, to the diet<sup>36</sup>. A seaweed urine SELDI study is shown in FIG. 14.

#### Compositions

[0032] Disclosed are compositions comprising cyanobacteria and one or more types of seaweed. Both algae, a category that includes cyanobacteria (such as *Spirulina*) and brown seaweed, are nontoxic and safe. *Spirulina* has a long history of use by humans, both as food as a dietary supplement. Toxicity studies have shown it to be safe and to meet or exceed all national foods standards<sup>37</sup>. The Food and Drug Administration classify brown seaweeds as "Generally Regarded As Safe" (GRAS)<sup>38</sup>. It is eaten daily by millions of people around the world.

[0033] 1. Cyanobacteria

[0034] The term "cyanobacteria," as used herein, refers to prokaryotic organisms formerly classified as the blue-green algae. Cyanobacteria are a large and diverse group of photosynthetic bacteria which comprise the largest subgroup of Gram-negative bacteria. Cyanobacteria were classified as algae for many years due to their ability to perform oxygen-evolving photosynthesis<sup>39</sup>. The cyanobacterium *Arthrospira* ("*Spirulina*") has long been valued as a food source; it is high in protein, and can be cultivated easily. In tropical countries, it is a very important part of the diet, and was eaten regularly by the Aztecs; it is also served in several Oriental dishes. In the US, the popularity of *Spirulina* is primarily as a "health food," being sold in stores as a dried powder or in tablet form.

[0035] 2. Algae

[0036] Algae represent a large, heterogeneous group of primitive photosynthetic organisms which occur throughout all types of aquatic habitats and moist terrestrial environments. The term "algae," as used herein, refers to Phaeophyta (brown algae) and *Arthrospira* (blue green algae known as "*spirulina*"). "Kelp" and "seaweed" are used interchangeably throughout. The kelps generally include the many large brown seaweeds and are among the most familiar forms found on North American coasts. Some have fronds up to 200 ft (61 m) long, e.g., the Pacific coast *Nereocystis* and *Macrocystis*. Common American species of kelp include *Laminaria* (kelp), *Alaria* (American wakame), *Postelsia* (sea palm), *Ecklonia* (paddleweed) *Sargassum* (gulfweed), *Fucus* (rockweed), *Pelvetia* (bladder wrack), *Macrocystis* (giant bull kelp), *Analipus* (far needle), *Nereocystis* (giant kelp), and *Ascophyllum* (knotted wrack). In addition to its use as food, seaweeds are also commercial sources of potash, fertilizer,

and medicines made from its vitamin and mineral content. Kelps are especially abundant in Japan, and many are included in the diet, including kombu (*Laminaria*), chigaiso (*Alaria*), hibamata (*Fucus*), kajime (*Ecklonia*), matsumo (*Analipus/Heterochordaria*), arame (*Eisenia*), hondawara (*Sargassum*), wakame (*Undaria*).

[0037] The safety of brown seaweeds depends on their iodine content 29. The popular *Undaria* ("wakame"), *Alaria* (American "wakame") and the less commonly eaten *Sargassum*, have safe levels of iodine (40-100 µg/g). Other common brown seaweeds contain high iodine levels which could cause iodine sensitive individuals to develop transient thyrotoxicosis. The maximum tolerated dose of iodine is 1,000 µg/day, and the background level of iodine intake is about 250 µg/day. Iodine can be lowered by simple processing and storage techniques. In this invention, 5 grams of *Undaria* provides an additional 150-250 µg/day. *Spirulina* contains no iodine.

[0038] Algae, unlike narrowly targeted drugs, have been shown to exert a variety of health effects, including antiviral, antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, immune enhancing, probiotic, and cholesterol-lowering effects. As whole foods, rather than isolated fractions, the full spectrum of possible biochemical pathways for modulating health in diverse ways, are available to reduce breast, colon or other types of cancer. In addition to direct effects on cancer cells in culture, dietary algal extracts have shown a broad spectrum of immune enhancement in vivo and in vitro. These include increased production of interleukin-12 and interferon-1β in the presence of viral infection<sup>22</sup>, stimulated natural killer cell stimulation<sup>22</sup>, and B cell stimulation<sup>40</sup>.

#### Extracts, Derivatives, Lysates, and Fractions

[0039] Disclosed herein are compositions comprising fractions of cyanobacteria and one or more types of brown seaweed. Also disclosed are extracts, lysates, or derivatives of algae (*Arthrospira* and one or more types of brown seaweed). The extracts, lysates, and derivatives can be active or inactive.

[0040] The principal overall objective disclosed herein is to provide anti-tumorogenesis compositions, peptides and derivatives thereof, and broad medical uses thereof, including prophylactic and/or therapeutic applications against cancer.

[0041] In the practice of the present invention, the preferred composition is a mixture of *spirulina* and dietary brown seaweed, the brown seaweed being selected from the group consisting of: *Laminaria*, *Alaria*, *Postelsia*, *Ecklonia*, *Sargassum*, *Fucus*, *Pelvetia*, *Macrocystis*, *Analipus*, *Nereocystis*, *Ascophyllum*, *Undaria* and mixtures thereof.

[0042] The *spirulina* and the brown seaweed are preferably deployed as a powder. They are powdered by methods well known in the art, such as by milling, crushing or the like. They may be ingested serially, taken together, compounded into a tablet, pill, gelcap or added to a diluent to form a liquid version thereof either as a mixture of the two components or can be ingested individually.

#### Supplements

[0043] Also disclosed herein are nutritional (also referred to as dietary throughout the application) supplements. A nutritional supplement is any compound or composition that can be administered to or taken by a subject to provide, supply, or increase an effect, such as an antiviral property. In one aspect, disclosed herein are nutritional supplements comprising any of the compositions disclosed herein. For

example, a nutritional supplement can comprise a cyanobacteria (*Arthrospira*, or "*spirulina*") and one or more types of brown seaweed, or fractions, extracts, lysates, or derivatives thereof. The nutritional supplement can comprise any amount of the compositions disclosed herein, but will typically contain an amount determined to supply a subject with a desired dose of the composition. The exact amount of composition required in the nutritional supplement will vary from subject to subject, depending on the species, age, weight and general condition of the subject, the severity of the dietary deficiency being treated, the particular mode of administration, and the like. Thus, it is not possible to specify an exact amount for every nutritional supplement. However, an appropriate amount can be determined by one of ordinary skill in the art using only routine experimentation given the teachings herein.

[0044] In one specific example, a nutritional supplement can comprise from about 1 to about 20 grams of brown seaweed, and 1 to about 20 grams of *Arthrospira* ("*spirulina*"), or fractions, extracts, lysates, or derivatives thereof where any of the stated values can form an upper or lower endpoint when appropriate. Furthermore, the brown seaweed and cyanobacteria (*Arthrospira* or "*spirulina*") or fractions, extracts, lysates, or derivatives thereof can be given in the same supplement, or simultaneously in different supplements, or in adjacent supplements taken near the same time, such as within about 10, 20, 30, 40, or 50 seconds, or within about 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, or 30 minutes, or within about 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 or 12 hours, or within 24 hours. Also, different types of algae can be administered simultaneously. Any types of algae known to those of skill in the art can be administered according to the methods disclosed herein.

[0045] The nutritional supplement can also comprise other nutrient(s) such as vitamins other trace elements, minerals, and the like. Further, the nutritional supplement can comprise other components such as preservatives, antimicrobials, antioxidants, chelating agents, thickeners, flavorings, diluents, emulsifiers, dispersing aids, or binders.

[0046] The nutritional supplements are generally taken orally and can be in any form suitable for oral administration. For example, a nutritional supplement can typically be in a tablet, gel-cap, capsule, liquid, sachets, or syrup form. Taking such nutritional supplements is beneficial to treat or prevent cancer.

## Results

[0047] The effects of the combination of *Undaria* and *spirulina* on two receptor sites for the innate immune system, TLR-2 and TLR-4 are examined. Additional studies of the associated expression of urokinase receptor are also presented. This study demonstrates that these receptors are on both MDA-MB-231 breast cancer cells and on human breast cancer tissue removed during biopsy and surgery, and changes in urinary excretion of urokinase receptor can be seen if the patient had initial high levels of urokinase receptors. Differences in cell architecture is demonstrated through a comparison of the "sterotactic biopsy" with the "surgical specimen" in the tissue samples from a newly diagnosed breast cancer patient who took seaweed plus *spirulina* for a week between biopsy and surgery.

[0048] To illustrate, and as shown in FIGS. 4-7, colon and breast cancer cell cultures, from the American Type Culture

Collection, were stained for two of the receptors, TLR-2 and TLR-4, important in the innate immune system.

[0049] Cell line: The MDA-MB-231 cell line was purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, Va.) and was maintained in RPMI-1640 media (Sigma-Aldrich), containing 10% FBS with 100 u/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>.

[0050] As far as it is known in the art, this is the first time any effect of algae has been shown on breast cancer cells. The comparison of these cell cultures confirms that seaweed (*Undaria*) blocks or down regulates or causes to internalize the TLR-2 receptors, while *spirulina* blocks or down regulates or causes to internalize TLR-4 receptors. The combination of seaweed and *spirulina* blocks both receptors making them unavailable for bacteria and viruses and having a profound effect on inflammatory responses. When these receptors are not blocked, the cancer cells subvert the normal inflammatory receptors (TLR-2 and TLR-4) (FIGS. 1-3, 10,11), and use these receptors to create inflammation in the tumor microenvironment. This innate immune inflammatory response is sufficient to promote immunotolerance for tumor cells, allowing them to progress. The inflammation surrounding the cancer cells sends a signal to the lymphocytes to tolerate the inflammation, rather than to attack the cells. This absence of lymphocytic response increases the tumorigenesis in the tissue. In addition, a downstream receptor to the TLR activation pathway (the urokinase receptor) is also directly affected by algae. In the three women who took the algae supplement, one had high urokinase receptor levels. High urokinase receptor levels are associated with faster progression of breast cancer. In published studies, urokinase levels do not change from time of diagnosis to death. However, for the woman in the study who had high urokinase levels, there was more than a third decrease with seaweed supplementation. No effects were noted for the women with normal levels of urinary urokinase. Therefore, altered cell-surface receptor responses through the administration of algae have important implications for treating and/or preventing breast cancer. This is graphically shown in FIG. 12.

[0051] The four slides in FIG. 13 show 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) forms fluorescent complexes with natural double-stranded DNA. It is used here to indicate the presence of cancer cells. The cells were treated with either control (normal cell media) or algae. The same microscopic field of cancer cells is seen in each horizontal line. The lack of fluorescent complexes when treated with algae (seaweed plus *spirulina*) (#2) but not when treated with control media (#1) supports the idea that algae competitively binds to the urokinase receptor.

[0052] In addition, results from the histological studies from the breast cancer subjects show the algae mix increased estrogen receptor positivity in the cancer cells (FIGS. 8,9). Estrogen receptor positive cancer is treatable with reasonable success by chemotherapy. Estrogen receptor negative cancer is not as responsive to chemotherapy or hormonal therapy. Giving the seaweed/*spirulina* combination to patients may make drugs like Tamoxifen more effective. Tamoxifen is an estrogen inhibitor. The worst prognosis is for women with estrogen independent (ER-) breast cancer, because estrogen inhibitors do not work. By way of illustration, three subjects with newly diagnosed breast cancer underwent a PET/CT scan and were administered seaweed+*spirulina* for a week, and then underwent a repeat PET/CT scan. Comparing the

tissue samples from the breast tumor biopsy and the breast tumor excised during surgery shows a change in ER and PR positivity. (FIGS. 8,9) The results from CXCR4, Her2neu TLR2 and TLR4 (FIGS. 8-11), and Ki67 (indicative of cell proliferation) are shown as well.

Significance

[0053] Breast cancer is a leading cause of death for women. Administration of a seaweed/*spirulina* combination to patients makes drugs like Tamoxifen more effective. Tamoxifen is an estrogen inhibitor, and the worst prognosis is for women with estrogen independent (ER-) breast cancer, because estrogen inhibitors do not work. Further, the seaweed/*spirulina* combination blocks receptors of the innate immune system and alters CXCR4 and CCR5 receptors. By preventing the innate immune inflammatory response, the likelihood of tumor formation is decreased and escape from immunosurveillance is reduced. CXCR4 and CCR5 receptors are key to metastatic cancer cell, and the combination of *spirulina* and seaweed is likely to inhibit cancer metastases by decreasing the number of receptors available on the cancer cell surface for adhesion. The clinical importance of decreasing urokinase in women who have high urokinase levels is highly significant in preventing breast cancer progression.

REFERENCES

[0054] 1. Teas J. The dietary intake of *Laminaria*, a brown seaweed, and breast cancer prevention. *Nutr Cancer* 1983; 4: 217-22.  
 [0055] 2. Reddy B S, Cohen L A, McCoy G D, Hill P, Weisburger J H, Wynder E L. Nutrition and its relationship to cancer. *Adv Cancer Res* 1980; 32: 237-345.  
 [0056] 3. Wynder E L, Kajitani T, Kuno J, Lucas J C J, Depalo A, Farrow J. A comparison of survival rates between American and Japanese patients with breast cancer. *Surg Gynecol Obstet* 1963; 117:196-200.  
 [0057] 4. Morrison A S, Black M M, Lowe C R, MacMahon B, Yuasa S. Some international differences in histology and survival in breast cancer. *International Journal of Cancer* 1973; 11:261-7.  
 [0058] 5. Kanemori M, Prygrocki M. Results of breast conservation therapy from a single-institution community hospital in Hawaii with a predominantly Japanese population. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62(1):193-7.  
 [0059] 6. Pineda M D, White E, Kristal A R, Taylor V. Asian breast cancer survival in the US: a comparison between Asian immigrants, US-born Asian Americans and Caucasians. *Int J Epidemiol* 2001; 30(5):976-82.  
 [0060] 7. Ziegler R G, Hoover R N, Pike M C, et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1819-27.  
 [0061] 8. Thompson L U, Chen J M, Li T, Strasser-Weippi K, Goss P E. Dietary flaxseed alters tumor biological markers in postmenopausal breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(10):3828-35.  
 [0062] 9. Belay A. The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J Am Nutraceut Assoc* 2002; 5(2): 27-48.  
 [0063] 10. Abdalqader G, Barsanti L, Tredici M R. Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. *JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY* 2000; 12(3-5):493-8.

[0064] 11. Wu L C, Ho J A, Shieh M C, Lu I W. Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts. *J Agric Food Chem* 2005; 53(10):4207-12.  
 [0065] 12. Subhashini J, Mahipal S V, Reddy M C, Mallikarjuna Reddy M, Rachamalla A, Reddanna P. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(3):453-62.  
 [0066] 13. Reddy M C, Subhashini J, Mahipal S V, et al. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304(2):385-92.  
 [0067] 14. Liu X M, Zhang H Q. [Effect of polysaccharide from *Spirulina platensis* on hematopoietic cells proliferation, apoptosis and Bcl-2 expression in mice bearing tumor treated with chemotherapy]. *Chinese. Yao Xue Xue Bao* 2002; 37(8):616-20.  
 [0068] 15. Chen F, Zhang Q. [Inhibitive effects of *spirulina* on aberrant crypts in colon induced by dimethylhydrazine] *Chinese. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 1995; 29(1): 13-7.  
 [0069] 16. Dasgupta T, Banejee S, Yadav P K, Rao A R. Chemomodulation of carcinogen metabolising enzymes, antioxidant profiles and skin and forestomach papillomagenesis by *Spirulina platensis*. *Mol Cell Biochem* 2001; 226 (1-2):27-38.  
 [0070] 17. Mittal A, Kumar P V, Banerjee S, Rao A R, Kumar A. Modulatory potential of *Spirulina fusiformis* on carcinogen metabolizing enzymes in Swiss albino mice. *Phytother Res* 1999; 13(2):111-4.  
 [0071] 18. Mishima T, Murata J, Toyoshima M, et al. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clin Exp Metastasis* 1998; 16(6):541-50.  
 [0072] 19. Shklar G, Schwartz J. Tumor necrosis factor in experimental cancer regression with alphatocopherol, beta-carotene, canthaxanthin and algae extract. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24(5):839-50.  
 [0073] 20. Pugh N, Ross S A, ElSohly H N, ElSohly M A, Pasco D S. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta Med* 2001; 67(8):737-42.  
 [0074] 21. Guan Y, Guo B. [Inhibition activity of *spirulina platensis* proteins photo-immobilization biomaterial on proliferation of cancer cells] *Chinese. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2002; 19(1):1-3.  
 [0075] 22. Hirahashi T, Matsumoto M, Hazeki K, Saeki Y, Ui M, Seya T. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *Int Immunopharmacol* 2002; 2(4):423-34.  
 [0076] 23. Mathew B, Sankaranarayanan R, Nair P P, et al. Evaluation of chemoprevention of oral cancer with *Spirulina fusiformis*. *Nutr Cancer* 1995; 24(2):197-202.  
 [0077] 24. Pardhasaradhi B V, Ali A M, Kumari A L, Reddanna P, Khar A. Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(11):1165-70.

[0078] 25. Teas J, Harbison M L, Gelman R S. Dietary seaweed (*Laminaria*) and mammary carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 1984; 44(7):2758-61.

[0079] 26. Yamamoto I, Maruyama H, Moriguchi M. The effect of dietary seaweeds on 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Lett* 1987; 35(2):109-18.

[0080] 27. Maruyama H, Watanabe K, Yamamoto I. Effect of dietary kelp on lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in livers of rats given breast carcinogen DMBA. *Nutr Cancer* 1991; 15(3-4):221-8.

[0081] 28. Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, et al. Wakame seaweed suppresses the proliferation of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced mammary tumors in rats. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90(9):922-7.

[0082] 29. Teas J, Pino S, Critchley A, Braverman L E. Variability of Iodine Content in Common Commercially Available Edible Seaweeds. *Thyroid* 2004; 14(10):836-41.

[0083] 30. Sekiya M, Funahashi H, Tsukamura K, et al. Intracellular signaling in the induction of apoptosis cancer cell line by water extract of Mekabu. *Int J Clin Oncol* 2005; 10:122-6.

[0084] 31. Gambhir S S, Czernin J, Schwimmer J, Silverman D H S, Coleman R E, Phelps M E. A tabulated summary of the FDG PET literature. *J Nucl Med* 2001; 42:1S-93S.

[0085] 32. Schelling M, Avril N, Nahrig J, et al. Positron Emission Tomography Using [18F]Fluorodeoxyglucose for Monitoring Primary Chemotherapy in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2000; 18(8): 1689-95.

[0086] 33. Laronga C, Becker S, Watson P, et al. SELDI-TOF serum profiling for prognostic and diagnostic classification of breast cancers. *Dis Markers* 2003; 19(4-5):229-38.

[0087] 34. Grizzle W E, Semmes O J, Basler J, et al. The early detection research network surface-enhanced laser desorption and ionization prostate cancer detection study: A study in biomarker validation in genitourinary oncology. *Urol Oncol* 2004; 22(4):337-43.

[0088] 35. Zhang Z, Bast R C J, Yu Y, et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004; 64(16):5882-90.

[0089] 36. Tsuneki H, Ishizuka M, Terasawa M, Wu J-B, Sasaoka T, Kimura I. Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in health humans. *BMC Pharmacology* 2004; 4(18):1-18.

[0090] 37. Food and Drug Administration F. GRAS Notice No. GRN 000127. In: Office of Food Additive Safety C/F-SaAN, ed.; 2003.

[0091] 38. Food and Drug Administration F. GRAS status of certain red and brown algae and their extractives. *Federal Register* 1982; 47(207):47373-6.

[0092] 39. Vonshak A, ed. *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology. Bristol: Taylor & Francis Lts.; 1997.

[0093] 40. Shan B E, Yoshida Y, Kuroda E, Yamashita U. Immunomodulating activity of seaweed extract on human lymphocytes in vitro. *Int J Immunopharmacol* 1999; 21(1): 59-70.

Having, thus, described the invention, what is claimed is:  
1. A composition for use in the treatment of cancer comprising:

- (a) an effective amount of a blue-green algae, and
- (b) an effective amount of a brown algae having safe levels of iodine.

- 2. The composition of claim 1 wherein: the blue-green algae is a cyanobacteria.
- 3. The composition of claim 1 wherein the brown algae is selected from the group consisting of *Agarum*, *Sargassum*, *Undaria*, *Alaria* and mixtures thereof.
- 4. The composition of claim 1 wherein:
  - (a) the blue-green algae is a cyanobacteria, and
  - (b) the brown algae is selected from the group consisting of *Agarum*, *Sargassum*, *Laminaria*, *Undaria*, *Alaria* and mixtures thereof.
- 5. The composition of claim 4 wherein:
  - (a) the blue-green algae is present in an amount ranging from about one to about three thousand parts thereof based on the total weight of the composition, and
  - (b) the brown algae is present in an amount ranging from about one to about three thousand parts thereof based on the total weight of the composition.
- 6. The composition of claim 5 wherein the composition comprises a nutritional supplement, the supplement including at least one of a vitamin, a mineral, a preservative, an antimicrobial agent, an anti-oxidant, a chelant, a thickener, a flavoring and mixtures thereof.
- 7. The composition of claim 6 which further includes a diluent, an emulsifier, a dispersant, a binder and mixtures thereof.
- 8. The composition of claim 7 wherein the composition is either a tablet, a gel-cap, a capsule, a liquid, a sachet or a syrup.
- 9. The composition of claim 4 wherein:
  - (a) the blue-green algae is present as either the cyanobacteria, a fraction, an extract, a lysate or a derivative thereof, and
  - (b) the brown algae is present as either the brown algae, a fraction, an extract, a lysate or a derivative thereof.
- 10. A nutritional supplement, comprising the composition of claim 1.
- 11. The nutritional supplement of claim 10 which further includes at least one adjuvant selected from the group consisting of a vitamin, a mineral, a preservative, an antimicrobial agent, an anti-oxidant, a chelant, a thickener, a flavoring and mixtures thereof.
- 12. The nutritional supplement of claim 11 wherein:
  - (a) the blue-green algae is present in an amount ranging from about one to about three thousand parts thereof based on the total weight of the composition, and
  - (b) the brown algae is present in an amount ranging from about one to about three thousand parts thereof based on the total weight of the composition.
- 13. The nutritional supplement of claim 12 wherein the supplement is present as either a tablet, gel cap, emulsion, syrup,
- 14. A method for treating cancer, comprising: orally ingesting the composition of claim 1.
- 15. The method of claim 14 which further comprises formulating the composition as a nutritional supplement.
- 16. The method of claim 15 wherein the components of the composition are ingested serially in a time period of from about one to about 24 hours between ingestion of the first component and the second component.
- 17. The composition of claim 1 wherein: the blue-green algae is *Arthrospira*.

\* \* \* \* \*



US 20110052718A1

(19) **United States**

(12) **Patent Application Publication**  
**Rangel**

(10) **Pub. No.: US 2011/0052718 A1**  
 (43) **Pub. Date: Mar. 3, 2011**

(54) **SYNERGISTIC PHYTOCEUTICAL COMPOSITIONS**

(76) Inventor: **José Angel Olalde Rangel, Caracas (VE)**

(21) Appl. No.: **12/942,766**

(22) Filed: **Nov. 9, 2010**

*A61K 36/41* (2006.01)  
*A61K 36/71* (2006.01)  
*A61K 36/74* (2006.01)  
*A61K 36/734* (2006.01)  
*A61K 36/45* (2006.01)  
*A61K 35/32* (2006.01)  
*A61P 9/00* (2006.01)  
*A61P 5/00* (2006.01)  
*A61P 17/00* (2006.01)

**Related U.S. Application Data**

(60) Division of application No. 11/271,940, filed on Nov. 10, 2005, now Pat. No. 7,303,772, Continuation of application No. 12/705,525, filed on Feb. 12, 2010.

(52) U.S. Cl. .... 424/549; 424/195.15

**Publication Classification**

(51) **Int. Cl.**  
*A61K 36/074* (2006.01)  
*A61K 36/258* (2006.01)  
*A61K 36/28* (2006.01)

(57) **ABSTRACT**

Phytoceutical compositions for the prevention and treatment of circulatory disorders, feminine endocrine disorders, and dermal disorders. A specific combination of extracts of plants is taught, as well as principles for varying the formulations based on categorizing plants into one of three groups, Energy, Bio-Intelligence, and Organization and selecting several plants from each group. Such combinations have synergistic effects, with minimal side effects.

*Photographic evidence of Diabetic Foot remissions, including length of treatment between photos.*

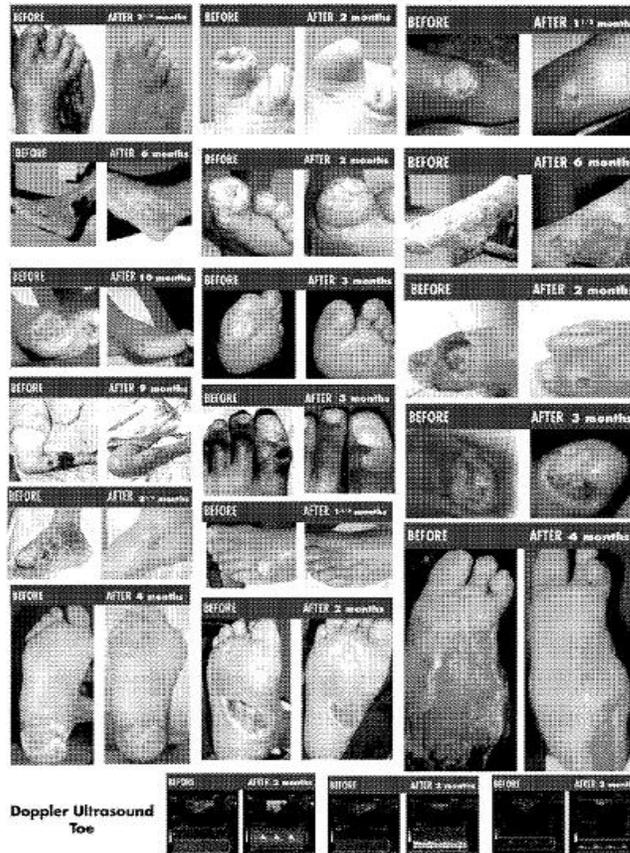


Figure 1: Photographic evidence of Diabetic Foot remissions, including length of treatment between photos.

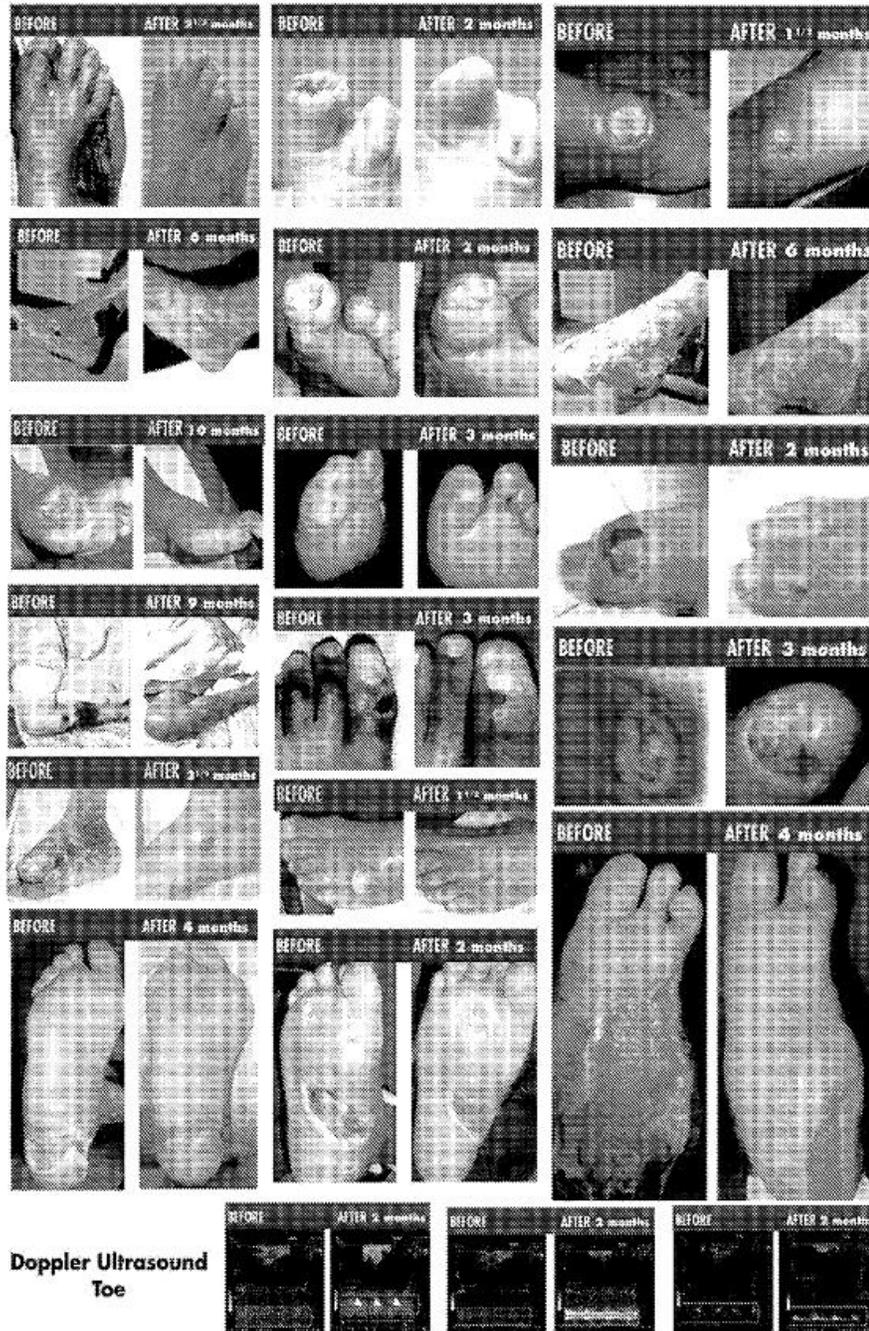


Figure 2: PCOS -before / after- echosonographic comparison. Interval between echosonograms: two months

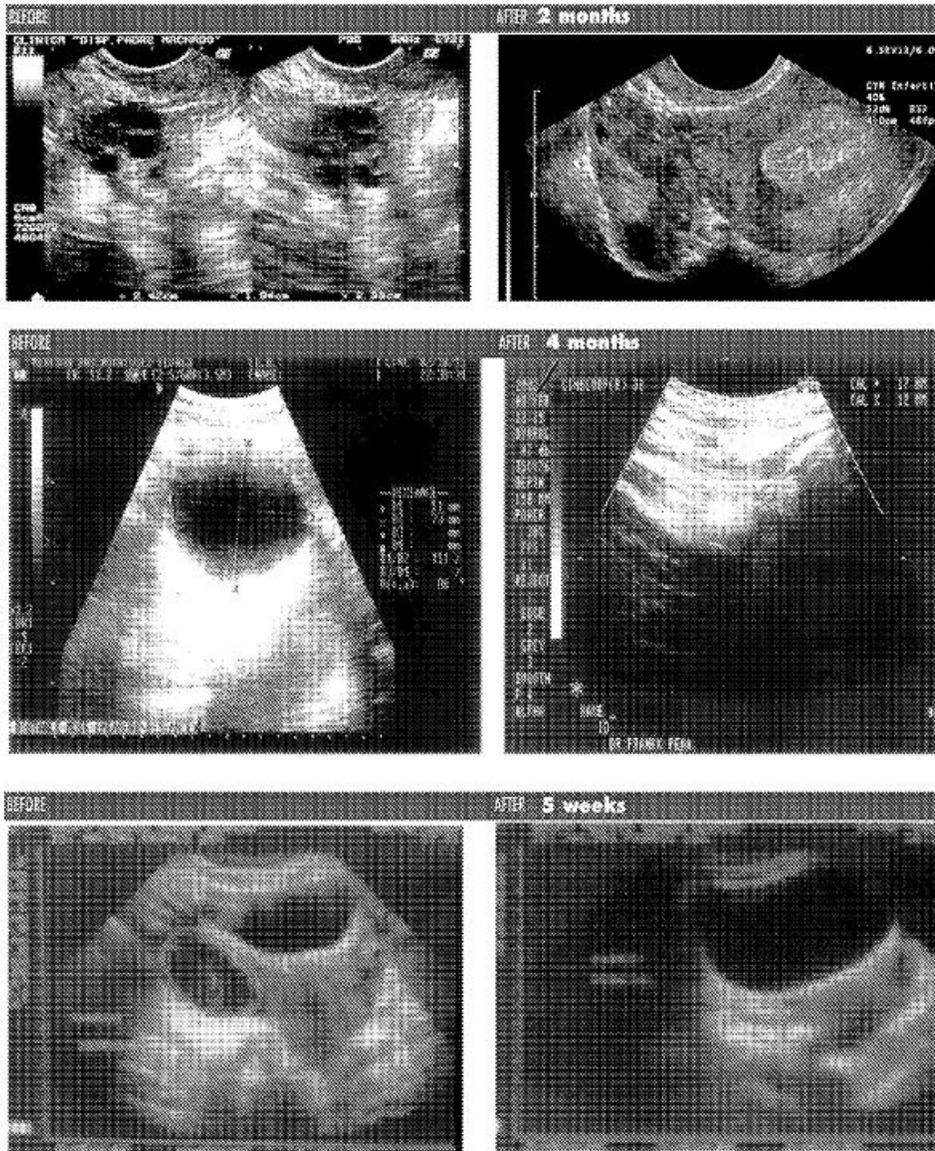
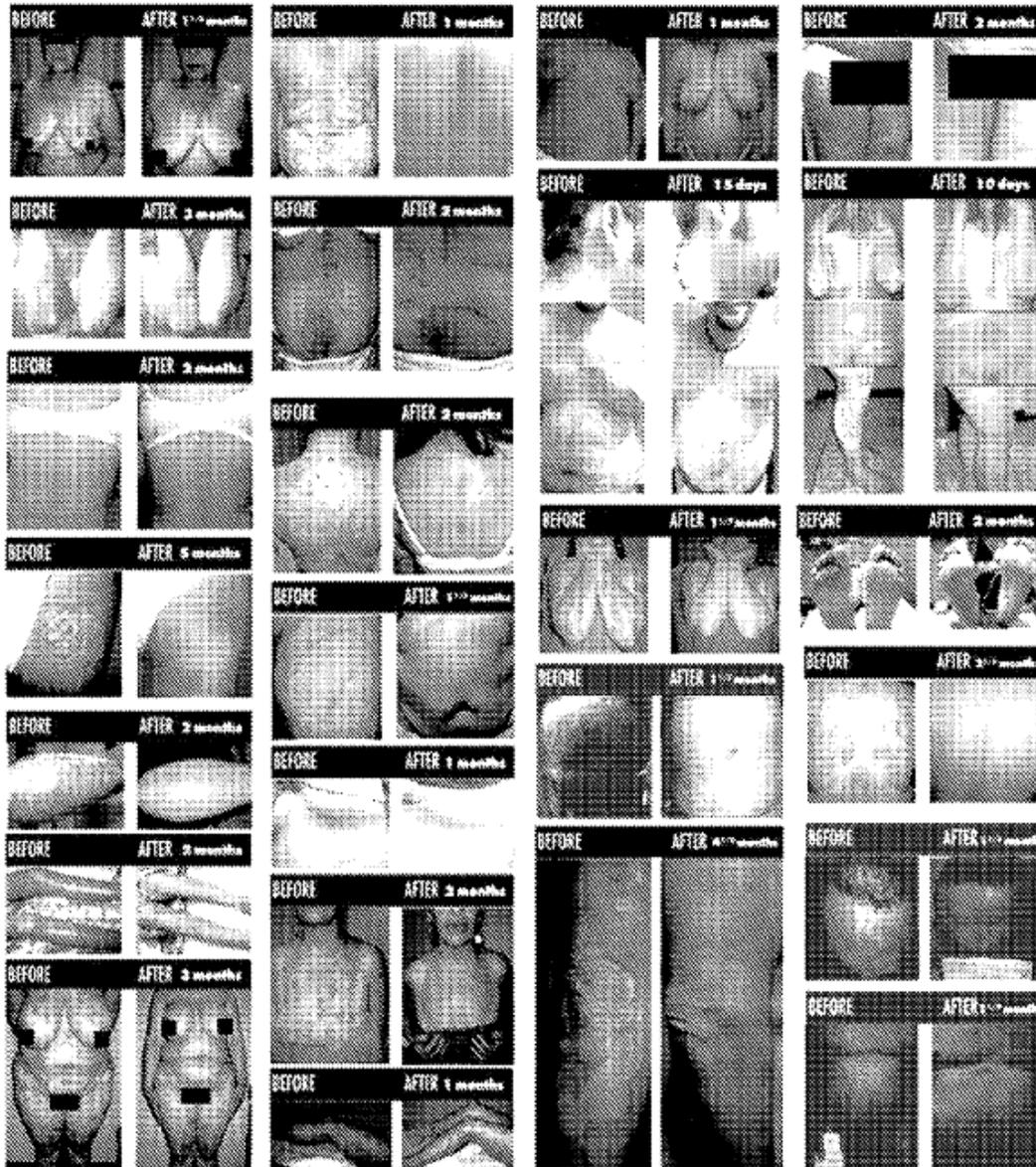


Figure 3: Photographic evidence of severe Psoriasis remissions, including length of treatment between photos



**SYNERGISTIC PHYTOCEUTICAL COMPOSITIONS**

**PRIOR RELATED APPLICATIONS**

[0001] Not applicable.

**FEDERALLY SPONSORED RESEARCH STATEMENT**

[0002] Not applicable.

**REFERENCE TO MICROFICHE APPENDIX**

[0003] Not applicable.

**FIELD OF THE INVENTION**

[0004] The invention relates to phytoceutical formulations used to treat a variety of diseases. The formulations are particular combinations of plants and have synergistic effect in combination. Principles for selecting beneficial formulations are provided.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

[0005] The academic study of medicinal plants for the treatment of diverse diseases has been nearly as pervasive as the study of Western medicines—The active principles from many traditional medicines have been extracted from plants, the curative agents identified and their mechanisms of action determined. Plant based medicines are typically well tolerated, with less severe side effects as well as a smaller range of side effects. However, despite the excellent medicinal qualities of many plants, they are individually insufficient to take chronic degenerative diseases into remission. In contrast, while synthetic drugs can be highly effective, their use is often hampered by severe side effects. What is needed in the art are better treatment regimes with improved patient tolerance, while providing sufficient efficacy.

**SUMMARY OF THE INVENTION**

[0006] A number of known beneficial plants were classified according to their capacity to enhance the three main elements that support overall health: Energy (E), Bio-intelligence (I) and Organization (O). A synergistic effect is expected when all three categories of herbs (E, I, O) are included in a formulation, preferably at least two or three or four plants from each category. Thus, one embodiment of the invention provides a method of selecting additional disease treating formulations according to these principles. Three examples of formulations prepared in this way are provided and additional formulations are being prepared and tested.

[0007] Another embodiment of the invention provides an effective, natural composition for treating circulatory diseases. The composition can be used alone, or can be combined with simultaneous use of one or more pharmaceutical compositions. It can be used for the treatment of diabetic lesions, obliterative arteriosclerosis, Leriche syndrome (aorto-iliac obliteration), Buerger's disease (thromboangiitis obliterans), thrombophlebitis, chronic venous insufficiency, varicose veins, varicose ulcers, hemorrhoids, and the like.

[0008] Another embodiment of the invention provides a composition for the treatment of feminine endocrine diseases that can be used alone or combined with pharmaceuticals. It provides an effective medicine for diseases such as Polycystic Ovary Syndrome, ovarian cysts, fibrocystic breast condition, uterine fibroids, dysfunctional uterine hemorrhage, female infertility, premenstrual syndrome, amenorrhea, and the like.

[0009] Another embodiment of the invention provides a composition for chronic skin disorders. It can be used alone or combined with pharmaceuticals, and can be used to treat diseases such as psoriasis, dermatitis, skin infections, shingles (herpes zoster), boils, eczema, rash, acne or burn, and the like.

**DETAILED DESCRIPTION OF THE FIGURES**

[0010] FIG. 1 shows representative examples of diabetic foot lesions treated with the herbaria of Table 1.

[0011] FIG. 2 shows representative examples of PCOS treated with the herbaria of Table 2.

[0012] FIG. 3 shows representative examples of psoriasis treated with the herbaria of Table 3.

**DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

[0013] "Pharmaceutically acceptable excipients" is used herein according to art accepted meanings, and includes those ingredients needed to formulate a medicine for mammalian use, including the use of gelatin capsules.

[0014] "Synergistic" or "synergy" is used herein to mean that the effect is more than its additive property. In preferred embodiments, the synergy is at least 1.5, 2, 5, or 10 fold.

[0015] By use of "plants," what is meant herein is that the plant (or that portion with medicinal activity) is used whole, ground, or as an extract. Also included are purified active ingredients and derivatives thereof. However, it is believed that the best efficacy of plants used herein is achieved with the use of the entire plant or its extracts, rather than with the use of isolated active ingredients.

[0016] Further, although plants are named here according to commonly used nomenclature, with improving taxonomy plants are often reclassified. Whenever a plant is referenced, it includes related species with similar active ingredients.

[0017] The following examples are illustrative only and should not serve to unduly limit the invention.

**Example 1**

**Plant Characteristics—Circulatory Disorders**

[0018] *Angelica sinensis* (Dong Quai or *Angelica*, also *Angelica Archangelica*, *Angelica Pubescens* and *Angelica Sylvestris*) contains terpenes (terpenes, mainly  $\beta$ -phellandrene, with  $\beta$ -bisabolene,  $\beta$ -caryophyllene,  $\beta$ -phellandrene,  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene, limonene, linalool, borneol, acetaldehyde, menthadienes, and nitromenthadienes), macrocyclic lactones (including tridecanolide, 12-methyl tridecanolide, pentadecanolide), phthalates (such as hexamethylphthalate), coumarins (especially furocoumarin glycosides such as marmesin and apterin), angelicin and byakangelicin derivatives (osthol, umbelliferone, psoralen, bergapten, imperatoren, xanthotoxol, xanthotoxin, oxypeucedanin and more), as well as various sugars, plant acids, flavonoids, and sterols.

[0019] *Acanthopanax senticosus* (Russian Ginseng, Siberian Ginseng, Eleuthero, Devil's Shrub, Touch-me-not, Wild Pepper, Shigoka, *Acanthopanax senticosus*) contains terpenoids (oleanolic acid), glycosides (Eleutheroside A (daucosterin), B1, C-G, I, K, L, M), phytosterols ( $\beta$ -sitosterol), coumarins (Eleutheroside B1 and B3, isofraxidine), polysaccharides (eleutherans), volatile oils, caffeic acid, coniferyl aldehyde, and sugars. Eleuthero has been shown to bind to estrogen, progestin, and mineralocorticoid receptors, and stimulate T-lymphocyte and natural killer cell produc-

tion. It has activity anti-platelet aggregation activity similar to aspirin, as well as antioxidant activity. Russian Ginseng contains at least 40 active ingredients.

[0020] *Rhaponticum carthamoides* (Leuzea, or Maral Root) contains a mixture of compounds called, "levseins." Levseins represents a complex of more than 10 ecdysterones including 20-beta-ecdysterone, makisterone C, 24-dehydromakisterone A, carthamosterone, polypodyne B and ajugasterone C. Researchers extracted and purified various ecdysteroids from *Rhaponticum* and found that the ecdysteroids increased the mass of the developing quails in a dose-dependent manner, with the rate of increase proportional to the ecdysteroids content. The Soviets manufactured a synthetic version of this powerful substance for their athletes with great success. Soon after, the U.S. version called Mesobolin circulated on the underground market for a long time. Incorporation of this phytomedicine in a composition provides at least 10 active principles in a single therapeutic.

[0021] *Panax ginseng* (Chinese ginseng, panax, ren shen, jintsam, ninjin, Asiatic ginseng, Japanese ginseng, Oriental ginseng, Korean red ginseng) main active components are ginsenosides (Ra1, Ra2, Rb1, Rg1, Rd, Re, Rh1, Rh2, Rh3, F1, F2, F3) and panoxosides, which have been shown to have a variety of beneficial effects, including anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer effects. Results of clinical research studies demonstrate that *Panax ginseng* may improve psychological function, immune function, and conditions associated with diabetes. Studies indicate that *Panax ginseng* enhances phagocytosis, natural killer cell activity, and the production of interferon; improves physical and mental performance in mice and rats; causes vasodilation; increases resistance to exogenous stress factors; and affects hypoglycemic activity. It stimulates hepatic glutathione peroxidase, and the phytosterols inhibit prostaglandin synthesis. Also it displays vascular activity because the saponins act like calcium antagonists in the vasculature. The incorporation of this phytomedicine provides at least 86 active principles in a single therapeutic.

[0022] *Panax quinquefolius* (American Ginseng, Anchi, Canadian Ginseng, Five Fingers, Ginseng, American, North American Ginseng, Red Berry, Ren Shen, Tienchi) is related to *Panax ginseng*, but is a distinct species with higher levels of ginsenoside Rb1 and without ginsenoside Rf. Ginsenoside Rb1 is believed to limit or prevent the growth of new blood vessels, making it useful to treat tumors. Research suggests that several of ginseng's active ingredients also have a beneficial influence on platelet aggregation. It also demonstrates an anti-atherosclerotic action, apparently mediated by a correction in the imbalance between prostacyclin and thromboxane. Other studies that have found panaxynol or the lipophilic fraction to be the most potent anti-platelet agent in ginseng, chiefly due to an inhibition of thromboxane formation. This possibly occurs via regulation of cGMP and cAMP levels and prolongation of the time interval between the conversion of fibrinogen to fibrin. Ginsenosides have also been shown to be relatively potent platelet activating factor antagonists. It has antioxidant, anti-inflammatory, and hypolipidemic effects. The incorporation of this phytomedicine into a composition provides at least 206 active principles in a single therapeutic.

[0023] *Pfaffia paniculata* (Suma, Brazilian Ginseng, Pfaffia, Para Toda, Corango-acu; also *Hebanthe paniculata*, *Gomphrena paniculata*, *G. eriantha*, *Iresine eriantha*, *I. paniculata*, *I. tenuis*, *P. eriantha*, *Xeraea paniculata*) contains active glycosides (beta-ecdysone and three ecdysteroids),

pfaffic acids, phytosterols (sitosterol and estimasterol). It also contains saponins. Its germanium content probably accounts for its properties as an oxygenator at the cellular level, and its high iron content may account for its traditional use for anemia. This herb increases oxygenation at the cellular level, and it also has anabolic activity at the muscular and cardiac levels by improving the contraction of the myocardia and diminishing arrhythmias and stabilizing the membranes of cardiac cells. The incorporation of this phytomedicine provides 44 active principles in a single therapeutic.

[0024] *Rhodiola rosea* (Golden Root, Roseroot) consists mainly of phenylpropanoids (rosavin, rosin, rosarin (specific to *R. rosea*), phenylethanol derivatives (salidroside, rhodiolside, tyrosol), flavanoids (catechins, proanthocyanidins, rodiolin, rodionin, rodiosin, acetylrodalgin, triclin), monoterpenes (rosiridol, rosaridin), triterpenes (daucosterol, beta-sitosterol), and phenolic acids (chlorogenic and hydroxycinnamic, gallic acids). It also contains organic acids (gallic, caffeic, and chlorogenic acids) and p-Tyrosol. There are many species of *Rhodiola*, but it appears that the rosavins are unique to *R. Rosea*, and it is the preferred species. Its therapeutic properties include a strong estrogen binding property. It also has properties of vasodilatation by activation of mu-opiate receptors in heart muscle, and it is a hypolipidemic, diminishing cholesterol and triglyceride levels. The incorporation of this phytomedicine provides at least 20 active principles in a single therapeutic.

[0025] *Echinacea angustifolia* or *purpurea* (Black Sampson, Purple Coneflower, Rudbeckia, Missouri Snakeroot, Red Sunflower) contains alkaloids (Isotussilagine, tussilagine), amides (echinacein, isobutylamides), carbohydrates (echinacin, polysaccharides (heteroxylan and arabinogalactan), inulin, fructose, glucose, pentose), glycosides (echinacoside), terpenoids (Germaacran), Cichoric acid, betaine, methylpara-hydroxycinnamate, vanillin, phytosterols, and volatile oils. *Echinacea* has been the subject of hundreds of clinical and scientific studies which have primarily used an extract of the root and aerial portions of the botanical. The rich content of polysaccharides and phytosterols in *Echinacea* are what make it a strong immune system stimulant. The sesquiterpene esters also have immuno-stimulatory effects. Echinacin has also been found to possess anti-fungal and antibiotic properties. This component of *Echinacea* also has cortisone-like actions which can help promote the healing of wounds and helps to control the inflammatory reactions. The incorporation of this phytomedicine into compositions provides at least 70 active principles in a single therapeutic.

[0026] *Ganoderma lucidum* (Reishi, also *G. tsugae*, *G. valesiacum*, *G. oregonense*, *G. resinaceum*, *G. pfezferi*, *G. oerstedii*, and *G. ahmadii*) is an edible fungus containing bitter triterpenoids (ganoderic acid),  $\beta$ -D-glucan, coumarins, alkaloids and ergosterols. It has vasodilator effect and is useful in the treatment of angina. It is hypolipidemic and anti-atherotic. It contains at least 32 active principles.

[0027] *Grifola frondosa* (Maitake, Dancing Mushroom; also *G. sordulenta*, *Polyporus umbellatus* and *Meripilus giganteus*) contains the primary polysaccharide,  $\beta$ -D-glucan in the 1.3 and 1.6 forms. It also contains alpha glucan, lipids, phospholipids, and ergosterol. Animal studies suggest maitake may lower serum cholesterol and triglycerides. Beta-D-glucan is also recognized as an effective immuno-stimulator. This substance increases the activity of macrophages and other immunocompetent cells that destroy tumor cells. The substance also improves the immunological efficiency of

these cells by increasing production of cytokines IL-1, IL-2 and lymphokines. The final result is an increase of the defenses against infectious diseases. The incorporation of this phytomedicine provides at least 6 active ingredients for therapeutic use.

**[0028]** *Hydrastis canadensis* (golden seal, yellow root, turmeric root) contains mainly isoquinoline alkaloids (xanthopuccine, berberine, hydrastine, hydrastanine, beta-hydrastine, canadine and canadine). These confer anti-inflammatory, bacteriostatic, bacteriocidal, and vasodilator effects. In general, its antibacterial action is directed to metabolic inhibition, inhibition of the formation of enterotoxins, and inhibition of bacterial adhesion. It produces vasodilatation by inhibiting smooth muscle contraction, and inhibiting platelet aggregation. This plant provides at least 34 active principles for therapeutic use.

**[0029]** *Petiveria alliacea* (Anamú, Apacin, Apacina, Apazote De Zorro, Aposin, Ave, Aveterinaryte, Calauchin, Chasser Vermine, Congo Root, Douvant-douvan, Emeruaima, Garlic Guinea Henweed, Guine, Guine, Guinea, Guinea hen leaf, Gully Root, Herbe Aux Poules, Hierba De Las Gallinitas, Huevo De Gato, Kojo Root, Kuan, Kudjuruk, Lemtewei, Lemuru, Mal Pouri, Mapurit, Mapurite, Mucura-caa, Mucura, Mucuraca, Ocano, Payche, Pipi, Tipi, Verbena Hedionda, Verveine Puante, Zorrillo) contains Allantoin, Arborinol, Arborinoliso Astilbin, Benzaldehyde, Benzoic acid Benzyl-2-hydroxy-5-ethyl-trisulfide, Coumarin, Dibenzyl Trisulfide, Engeletin, alpha Friedelinol, Isoarborinol, Isoarborinol-acetate, Isoarborinol-cinnamate, Isothiocyanates, Kno3, Leridal, Leridol, Leridol-5-methyl Ether, Lignoceric Acid, Lignoceryl Alcohol, Lignoceryl Lignocerate, Linoleic Acid Myricitrin, Nonadecanoic Acid, Oleic Acid, Palmitic Acid, Pinitol, Polyphenols, Proline, trans-n-methyl-4-methoxy, Senfol,  $\beta$ -Sitosterol, Stearic Acid, Tannins, and Trithiolaniacine. Its therapeutic activities include anti-inflammatory, immune-stimulant and antimicrobial effects. This phytomedicine provides about 25 active principles.

**[0030]** *Sutherlandia frutescens* (Cancer Bush, also *Sutherlandia Microphylla*) contains L-canavanine, pinitol, GABA (gamma aminobutyric acid), and asparagine. In addition, novel triterpenoid glucoside known as "SU1" has been isolated and characterized. The therapeutic indications include anti-inflammatory, antioxidant, immuno-modulator, and vasodilator effects. This phytomedicine provide at least 5 active principles.

**[0031]** *Tabebuia avellanedae* (Pau d'arco, Ipê, Lapacho, Tahuari, Tahebo, Trumpet Tree, *Tabebuia Ipê*, Tajy; also *T. ipe*, *T. nicaraguensis*, *T. schunkeuigoi*, *T. serratifolia*, *T. altissima*, *T. palmeri*, *T. impetiginosa*, *T. heptaphylla*, *Gelseminum avellanedae*, *Handroanthus avellanedae*, *H. impetiginosus*, *Tecoma adenophylla*, *Tec. avellanedae*, *Tec. eximia*, *Tec. impetiginosa*, *Tec. integra*, *Tec. ipe*) extracts contain diverse quinone derivatives and a small quantity of benzoids and flavonoids, including beta-lapachone, xyloidone, tabebuin, quercetin, tecomine, and steroidal saponins. One important ingredient is lapachol, a derivative of which was patented in 1975. It has anti-inflammatory and antibacterial effects. The incorporation of this phytomedicine into a composition provides at least 32 active principles in a single therapeutic.

**[0032]** *Uncaria tomentosa* (Cat's Claw, Peruvian Cat's Claw, Samento, Saventaro, Uña de Gato, also *Uncaria guianensis*) has several alkaloids including pentacyclic oxindole alkaloids (POA) (isomitraphylline, isopteropodine, mitra-

phylline, pteropodine, speciophylline, uncarine F), tetracyclic oxindole alkaloids (TOA) (isorynchophylline, rynchophylline), glycosides (triterpenic quinovic acid glycosides), hirsutine, tannins, catechins, phytosterols (beta-sitosterol, campesterol, stigmasterol), triterpenes, polyphenols, flavanols and oligomeric proanthocyanidins (OPC). It is an immune-stimulant, an anti-inflammatory, vasodilator, and antioxidant. In laboratory testing, rynchophylline displays an ability to inhibit platelet aggregation and thrombosis, suggesting that cat's claw may be useful in preventing strokes and reducing the risk of heart attack by lowering blood pressure, increasing circulation, inhibiting formation of plaque on arterial walls and formation of blood clots in the brain, heart and arteries. This phytomedicine provides at least 10 active ingredients.

**[0033]** *Petiveria Alliacea* (Anamú, Apacin, Apacina, Apazote De Zorro, Aposin, Ave, Aveterinaryte, Calauchin, Chasser Vermine, Congo Root, Douvant-douvan, Emeruaima, Garlic Guinea Henweed, Guine, Guine, Guinea, Guinea hen leaf, Gully Root, Herbe Aux Poules, Hierba De Las Gallinitas, Huevo De Gato, Kojo Root, Kuan, Kudjuruk, Lemtewei, Lemuru, Mal Pouri, Mapurit, Mapurite, Mucura-caa, Mucura, Mucuraca, Ocano, Payche, Pipi, Tipi, Verbena Hedionda, Verveine Puante, Zorrillo) contains Allantoin, Arborinol, Arborinoliso Astilbin, Benzaldehyde, Benzoic acid Benzyl-2-hydroxy-5-ethyl-trisulfide, Coumarin, Dibenzyl Trisulfide, Engeletin, alpha Friedelinol, Isoarborinol, Isoarborinol-acetate, Isoarborinol-cinnamate, Isothiocyanates, Kno3, Leridal, Leridol, Leridol-5-methyl Ether, Lignoceric Acid, Lignoceryl Alcohol, Lignoceryl Lignocerate, Linoleic Acid Myricitrin, Nonadecanoic Acid, Oleic Acid, Palmitic Acid, Pinitol, Polyphenols, Proline, trans-n-methyl-4-methoxy, Senfol,  $\beta$ -Sitosterol, Stearic Acid, Tannins, and Trithiolaniacine. Its therapeutic activities include anti-inflammatory, immuno-stimulant and antimicrobial. This phytomedicine provides about 25 active principles.

**[0034]** *Angelica sinensis* (Dong quai or *Angelica*, also *Angelica archangelica*, *Angelica pubescens* and *Angelica sylvestris*) contains terpenes (terpenes, mainly  $\beta$ -phellandrene, with  $\beta$ -bisabolene,  $\beta$ -caryophyllene,  $\beta$ -phellandrene,  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene, limonene, linalool, borneol, acetaldehyde, menthadienes and nitromenthadienes), macrocyclic lactones (including tridecanolide, 12-methyl tridecanolide, pentadecanolide), phthalates (such as hexamethylphthalate), coumarins (especially furocoumarin glycosides such as marmesin and apterin), angelicin and byakangelicin derivatives (osthol, umbelliferone, psoralen, bergapten, imperatoren, xanthotoxol, xanthotoxin, oxypeucedanin and more), as well as various sugars, plant acids, flavonoids, and sterols. These components have vasodilator activity, increase coronary flow and are antithrombotic. The incorporation of this phytomedicine into compositions provides at least 70 active principles in a single therapeutic.

**[0035]** *Crataegus oxyacantha* (Hawthorn, see also *C. monogyna*) contains mainly flavonoids (such as flavonoglycosyls, hyperoside, rutin, flavonol, kaempferol, quercetin) and oligomeric procyanadins (1-epicatechol), which relax arterial expansion to decrease peripheral vascular resistance. Also contains amines (phenylethylamine, tyramine, O-methoxyphenethylamine), flavone (apigenin, luteolin) derivatives, vitexin glycosides, tannins, saponins, and cyanogenetic glycosides. The incorporation of this phytomedicine into a composition provides at least 52 active principles in a single therapeutic plant.

**[0036]** *Croton lechleri* (Dragon's blood, Sangre de Grado, Sangre de Agua; also *C. draconoides*, *C. palanostigma*, *C. erythrochilus*, *C. salutaris*, and *C. gossypifolius*) produces a distinctive red exudate from its trunk containing a considerable amount of secondary plant metabolites, the majority of which are hydrolyzing flavonoids, proanthocyanidins (mainly catechin, epicatechin, galocatechin and/or galloepicatechin), as well as taspine. Other components include the dihydrobenzofuran lignan, six simple phenols and their derivatives, three steroids, non-saturated fatty acids, diterpenoids (hardwickiic acid, bincatriol, crolechlinol, crolechlinic acid, coberine A, coberine B), and diterpenoids. It heals wounds and ulcers of vascular origin. Incorporation of this phytomedicine into a composition provides at least 23 active principles in a single therapeutic.

**[0037]** *Ginkgo biloba* (*Ginkgo*) contains ginkgolides, bilobalides, bioflavones and flavone glycosides. Flavone glycosides include quercetin, 3-methylquercetin and kaempferol. Quercetin, myrcetin and the rest of the flavonoid fraction of the extract have antioxidant and free radical scavenger effects. The flavonoids diminish infiltration by neutrophils and increase blood flow. Their antioxidant properties and membrane stabilizing activity increase the tolerance to hypoxia. They improve cellular metabolism and protect against the damage caused by ischemia. Ginkgolide B is a powerful inhibitor of platelet activating factor (PAF), binding to its membrane receptors, and antagonizing platelet aggregation. Similarly, it has anti-inflammatory effect by decreasing vascular permeability, and has vasodilator activity by inhibiting the liberation of thromboxane B2 and prostaglandins. Controlled double blind clinical studies conclusively demonstrate the effectiveness of *Ginkgo biloba* in treating peripheral arterial insufficiency. The incorporation of this phytomedicine into a composition provides at least 59 active principles in a single therapeutic.

**[0038]** *Hydrocotyle asiatica* (Gotu Kola, Bramhi, Pennywort, Marsh Penny, Pennywort; also *Hydrocotyle asiatica asiatica*) contain terpenoids (triterpenes, asiaticoside, brahmoside and brahminosidea, (saponin glycosides) aglycones, asiaticoic acid, centellic acid, centoic acid and macedassic acid), sesquiterpenes (caryophyllene, trans-B-farnesene), volatile oils (Germacrene D), alkaloids (hydrocotylin), flavones (Quercetin, kaempferol, sesquiterpenes, stigmaterol, and sitosterol), and vallerine, fatty acids, resin, and tannins. It is used to treat chronic venous insufficiency, varicose veins, and venous hypertension. Incorporation of this phytomedicine in a composition provides at least 59 active principles in a single therapeutic.

**[0039]** *Ruscus aculeatus* (Butcher's Broom, Box Holly, Jew's Myrtle, Knee Holly, Kneeohlm, Pettigree, Sweet Broom) contains as primary active ingredients the steroidal saponins (ruscogenin and neoruscogenin), but other constituents have been isolated, including flavonoids, tetracosanoic acid, chrysophanic acid, sitosterol, campesterol, stigmaterol, triterpenes, coumarins, sparteine, tyramine, and glycolic acid. Its ingredients reduce vascular permeability, have anti-elastic properties and are vasoconstrictors. The incorporation of this phytomedicine in a composition provides at least 28 active agents.

**[0040]** *Vaccinium myrtillus* (European blueberry or bilberry, closely related to American blueberry, cranberry, and huckleberry) contains anthocyanosides such as: cyanadins, malvidins, petunidins and peonidins. Other ingredients include arbutin, asperuloside, astragalín, beta-amyrin, caffeic-acid, catechin, chlorogenic-acid, cyanadin-3-O-arabino-side, dihydroxycinnamic-acid, epicatechin, epigallocatechin, epimyrtiline, ferulic-acid, gallic-acid, galocatechin, hydro-

quinone, hyperoside, isoquercitrin, lutein, coumaric-acids, m-hydroxybenzoic-acid, monotropein, myrtillin, myrtillol, myrtine, neomyrtillin, protocatechuic-acid, quercetins, quinic-acid, resinic-acid, syringic-acid, ursolic-acid, and vanillic-acid. Evidence suggests that anthocyanosides may benefit the retina, as well as strengthen the walls of blood vessels, reduce inflammation, and stabilize collagen containing tissues. The anthocyanosides improve the activity of enzymes lactic dehydrogenase, glucose-6-phosphatase and phosphoglucomutase, each involved in processes of vascular damage. They reduce the arterial deposits and stimulate the production of vasodilators, like prostaglandin (PG12), thus protecting the vascular wall. Anthocyanosides have strong antioxidant properties, as well. The incorporation of this phytomedicine into a composition provides at least 63 active principles in a single therapeutic.

Example 2

Composition—Circulatory Disorders

**[0041]** A particularly preferred composition is shown in Table 1. Ratios reflect the concentration of active ingredient over the natural state, and the amounts provided are mg of extract. Obviously, the amount should be increased where the strength is reduced, and vice versa.

TABLE 1

Herbaria		
Active Agent	Ratio	Amount (mg)
<b>Energy enhancers</b>		
<i>Eleutherococcus senticosus</i> root extract	5:1	53.53
<i>Rhaponticum carthamoides</i> root extract	12:1	3.85
<i>Panax ginseng</i> root extract	5:1	10.71
<i>Panax quinquefolius</i> root extract	5:1	32.12
<i>Pfafia paniculata</i> (Suma) root extract	4:1	21.41
<i>Rhodiola rosea</i> root extract	5:1	9.64
<b>Bio-Intelligence modulators</b>		
<i>Echinacea angustifolia</i> root extract	6:1	1.34
<i>Echinacea purpurea</i> root extract	6:1	1.34
<i>Ganoderma lucidum</i> extract	6:1	32.12
<i>Grifola frondosa</i> extract	10:1	12.85
<i>Hydrastis canadensis</i> root extract	5:1	38.54
<i>Petiveria alliacea</i>	1:1	64.24
<i>Sutherlandia frutescens</i>	1:1	64.24
<i>Tabebuia avellaneda</i> bark extract	4:1	40.15
<i>Uncaria tomentosa</i> root extract	10:1	16.06
<b>Organization improvers</b>		
<i>Angelica sinensis</i> root extract	5:1	64.24
<i>Crataegus oxyacantha</i> fruit extract	5:1	42.83
<i>Croton lechleri</i> bark resin extract	10:1	10.71
<i>Ginkgo biloba</i> leaf extract	50:1	19.49
<i>Hydrocotyle asiatica</i> plant extract	5:1	64.24
<i>Ruscus aculeatus</i> root extract	5:1	57.82
<i>Vaccinium myrtillus</i> fruit extract	5:1	38.54
Total		700 mg

Example 3

Plant Characteristics—Female Endocrine Disorders

**[0042]** *Panax quinquefolius* The active principles responsible for its therapeutic effects are triterpensaponides, of which more than 25 different types have been identified. These are denominated protopanaxadiols (ginsenosides Rc, Rd, Rb1, Rb2) and protopanaxatriols (ginsenosides-Re, -Rf,

-Rg 1, etc.). Panax also contains hydrosoluble polysaccharides (panaxans A-U) and polyacetylenes (ginsenosides A-K, panaxynol and panaxatriol). These substances confer energizing properties because they increase ATP synthesis. On the other hand they reduce the secretion of prolactin by increasing dopaminergic activity or by activating dopamine receptors at the anterior hypophysis level. Prolactin is a hormone involved in the appearance of anovulatory cycles and dysfunctional uterine hemorrhages, menorrhagia, mammary fibrocystic condition, and cyclic mastalgia. The reduction of this hormone explains the recovery in the treatment of uterine dysfunctional hemorrhages, Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), Ovary Cysts, fibromyomatous uteri, and infertility.

**[0043]** *Pfafia paniculata* Its most important active principles are: Beta-ecdysone and three glycoside ecdysteroids, six different pfallic acids, phytosterols and nortriterpenic glycosides. These substances are energizing through an increase in ATP synthesis and oxygenation at the cellular level. Also, its phytosterols act as hormone originators, and have demonstrated effectiveness in the management of diverse conditions associated with hormone imbalance, such as: premenstrual syndrome, dysmenorrhagia, infertility, dysfunctional uterine hemorrhages, and menopause.

**[0044]** *Rhodiola rosea* See above.

**[0045]** *Astragalus membranaceus* (Huang-Qi) This plant contains three main types of active principles. Isoflavones, which act as anti-oxidants; astragalans which act as immunostimulants and anti-inflammatory by stimulating the phagocytic activity of macrophages, of the cytotoxic response of T and NK lymphocytes and of the production and activity of interferon; and astragalans which act as modulators of the hypothalamus-hypophysis-adrenal axis response.

**[0046]** *Echinacea* See above.

**[0047]** *Dioscorea villosa* (Rheumatism root, huesos del dialo, Yuma, Yam, Wild Yam, Chinese Yam, Mexican Yam, raiz china, and colic root) contains steroid saponin (dioscine, dioscorin and diosgenine) as the main active principles. Diosgenine can change into ecdysone, pregnenolone, and progesterone, thus, diosgenine is a hormonal precursor, which contributes to the neuroendocrine system's modulation. On the other hand, diosgenine has demonstrated its important pro-apoptotic effects, in the therapy of benign and malign tumors, including mammary and ovarian cysts, and uterine fibroids.

**[0048]** *Ganoderma lucidum* and *Grifola frondosa* The main active principles of these mushrooms are sterols and beta-proteoglycans which bestow anti-inflammatory and immune-modulating properties, because they increase the phagocytotic capacity of macrophages and increase the production and lifespan of CD4 lymphocytes.

**[0049]** *Tabebuia avellanedae* contains diverse substances derived from quinones, such as Alfa and Beta lapachone [2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona] and cyclopentane dialdehydes. These confer important anti-inflammatory, pro-apoptotic, antimitotic and cytostatic effects, in treating benign and malign tumors including mammary and ovarian cysts as well as uterine fibroids.

**[0050]** *Uncaria tomentosa* See above.

**[0051]** *Vitex agnus castus* (Chaste Tree or chaste berry) An essential oil is extracted from the fruit of this plant, two iridoid glycosides (aucubine and agnuside); a flavone (casticine, which seems to be the primary active principle) and 3 minor flavonoids derived from kaempferol and quercetin. These active principles act on the anterior hypophysis dopam-

inergic-D2 receptors, modulating prolactin secretion. This hormone is implicated in the appearance of anovulatory cycles and dysfunctional uterine hemorrhages, menorrhagia, mammary fibrocystic condition, and cyclic mastalgia. *Vitex agnus castus* modulates the secretion of LH from the hypophysis, which act on the ovary, starting up the luteal phase and progesterone secretion. Therefore, *Vitex* benefits dysfunctional uterine hemorrhages, premenstrual syndrome, PCOS, infertility, ovary cysts, menopause, and fibromyomatous uteri.

**[0052]** *Hydrocotyle asiatica* See above. Also, the active principles include pentacyclic triterpene saponins. The major active principles are asiaticosides and madecassosides. Other minor saponins are the centelloside, brahmiosides, brahminosides and *Hydrocotyle asiatica* saponins B, C and D. Mucopolysaccharides are the core components of the cellular matrix. The biochemical action of these active principles reduce the levels of lysosomal enzymes associated with the degradation of mucopolysaccharides. On the other hand, the active agents act on the fibroblasts of the connective tissue, modulating collagen synthesis and inhibiting inflammatory processes. This diminishes the fibrosis processes important to fibrocystic mammary and uterine conditions.

Example 4

Composition—Female Endocrine Disorders

**[0053]** A particularly preferred composition is shown in Table 2.

TABLE 2

Herbaria II		
Active Agent	Ratio	Amount (mg)
<b>Energy enhancers</b>		
<i>Rhodiola rosea</i> root extract	5:1	8.16
<i>Panax quinquefolius</i> root extract	4:1	67.97
<i>Pfafia paniculata</i> (Suma)	4:1	54.37
<b>Bio-Intelligence modulators</b>		
<i>Astragalus membranaceus</i> root extract	5:1	73.41
<i>Echinacea angustifolia</i>	6:1	20.39
<i>Echinacea angustifolia</i> radix	6:1	3.40
<i>Echinacea purpurea</i>	6:1	20.39
<i>Echinacea purpurea</i> radix	6:1	3.40
<i>Dioscorea villosa</i>	4:1	125.74
<i>Ganoderma lucidum</i> extract	6:1	36.25
<i>Grifola frondosa</i> mushroom extract	10:1	21.75
<i>Tabebuia avellanedae</i>	4:1	67.97
<i>Uncaria tomentosa</i>	10:1	24.47
<i>Vitex agnus castus</i>	5:1	57.09
<b>Organization improvers</b>		
<i>Hydrocotyle asiatica asiatica</i>	5:1	65.25
Total		650

Example 5

Plant Characteristics—Dermal Disorders

**[0054]** *Lepidium meyenii* (Maca) Its major active principles are: alkaloids (Macaridina, Lepidiline A and B); benzyl-isothiocyanate and glucosinolates; macamides; Beta-ecdysone and phytosterols. These substances activate ATP synthesis which confers energizing properties.

**[0055]** *Rhaponticum carthamoides* See above.

[0056] *Panax ginseng* The active principles responsible for its therapeutic effects are triterpensaponides of which more than 25 different types have been identified. These include protopanaxadiols (ginsenosides Rc, Rd, Rb1, Rb2) and protopanaxatriols (ginsenosides-Re, -Rf, -Rg 1, etc.). Panax also contains hydrosoluble polysaccharides (panaxans A-U) and polyacetylenes (ginsenosides A-K, panaxynol and panaxatriol). These substances confer energizing properties because they increase ATP synthesis.

[0057] *Rhodiola rosea* See above. Also, the active principles in this plant (phenylpropanoids, phenylethanol derivatives, flavonoids, monoterpenes and phenolic acids) activate the synthesis of ATP in mitochondria and stimulate reparative energy processes.

[0058] *Andrographis paniculata* (King of Bitters, Chiretta, Kalmegh and Kiryat) Primary active principles associated with *Andrographis* are: flavonoids, glucosides and diterpenic lactones (andrographolides). These substances offer immuno-modulator and anti-inflammatory properties. Even though their precise mechanism of action is not known, studies suggest that they stimulate the immune systems and activate macrophages.

[0059] *Angelica sinensis* contains alkyl phthalides (Ligustilide); terpenes, phenylpropanoids (ferulic acid) and benzenoids. These substances stimulate the immune system's actions, through diverse lymphokines and have an anti-inflammatory effect by inhibiting 5-lipoxygenase and elastase, as well as selectively inhibiting 12-(S)-HHTRE production, a marker of cyclo-oxygenase activity.

[0060] *Astragalus membranaceus* See above. Also, *Astragalus membranaceus* inhibits 5-lipoxygenase and elastase, which indicates that it is valuable in the management of skin pathologies involving chronic inflammation, such as psoriasis.

[0061] *Echinacea* See above.

[0062] *Hydrastis canadensis* The most important active principles of *Hydrastis* are isoquinoline alkaloids (Berberina, hydrastina, Hidrastanina, Canadina, Canadalina) which award anti-inflammatory, and immuno-modulating properties. Berberine inhibits activating protein 1 (AP-1), a key factor in transcription the inflammation. It also exerts a significant inhibitory effect on lymphocyte transformation, so its anti-inflammatory action seems to be due to the inhibition of DNA synthesis in the activated lymphocytes or to the inhibition of the liberation of arachidonic acid from the phospholipids of the cellular membrane. It also has immuno-modulating properties by increasing the production of immunoglobulins G and M and stimulating the phagocytotic capacity of macrophages.

[0063] *Ganoderma lucidum* The main active principles of this mushroom are sterols and beta-proteoglycans that bestow anti-inflammatory and immune-modulating properties by increasing the phagocytotic capacity of macrophages and raising production and lifespan of CD4 lymphocytes.

[0064] *Uncaria tomentosa* see above.

[0065] *Equisetum arvense* (Horse tail) This plant contains abundant mineral salts particularly silicic acids and silicates. It also contains phytosterols, phenolic acids, flavonoids (mainly quercetin glycosides and apigenine) and saponins (equisetonin). These active principles block the liberation of arachidonic acid, which diminishes inflammation and reduces the proliferation of keratinocytes, as well as inducing G2/M arrest in keratinocytes. The action mechanism is in part due to the inhibition of mitotic kinase activity of p34cd2 and perturbation of cyclin B1 levels.

[0066] *Hydrocotyle asiatica* See above.

[0067] *Tabebuia avellaneda* contains diverse quinone derivatives such as alpha and beta-lapachone, cyclopentane dialdehydes and a small quantity of benzenoids and flavonoids, including, xyloidone, tabebuina, quercetin, tecomine, and steroidal saponins. These compounds inhibit keratinocyte growth and offer anti-inflammatory and antibacterial effects, which are of great importance in the treatment of psoriasis.

[0068] Shilajit (Mumiyo) Mumiyo is a natural complex substance, whose active principles are carboxylic acids: (hydroxylated derivatives of Benzoic, Phenylacetic and Hippuric acids), fulvic and humic acids, minerals and amino acids. Of Mumiyo's known properties, the most important ones are its ability to reduce excessive inflammatory reactions and stimulate tissue regeneration. Oral intake of Mumiyo has been used to treat burns, trophic non-healing wounds, eczema, and other skin diseases, such as psoriasis. It has been established that fulvic/humic acids stimulate respiration and oxidative phosphorylation in liver mitochondria, increase mechanical resistance of collagen fibers, activate human leucocytes, reduce excessive inflammatory reactions, and stimulate tissue regeneration.

[0069] Shark cartilage This natural compound reduces psoriatic plaque vascularization. It inhibits the proliferation of endothelial cells, competitively blocking the Endothelial Growth Factor at the receptor level. It also inhibits tyrosine EGF and EGF-2 dependant phosphorylation as well as the increase of FCE induced permeability. Shark cartilage also induces endothelial cell apoptosis, by inducing caspase 3, 8 and 9 activation, and the liberation of cytochrome c from the mitochondria to the cytoplasm. Shark cartilage also induces fibrinolytic activity by increasing the secretion, activity and affinity of Tissue Plasminogen Activator (tPA) for endothelial cells. It also inhibits extracellular matrix degradation, by inhibiting matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12 and MMP-13. It also stimulates production of angiostatin.

[0070] *Schizandra chinensis* The major active principles of *Schizandra* (also known as Wuweizi and Wurenchum) are lignans called schizandrines. These substances have known hepato-protective and hepato-regenerative properties. It maintains the integrity of hepatocyte cellular membranes; increases hepatic levels of ascorbic acid; inhibits NADPH oxidation; inhibits lipid peroxidation at the hepatic microsomal level as well as formation of hepatic malondialdehyde; diminishes production of carbon monoxide at the hepatic level; has an inductor effect in the enzymatic anti-toxic microsomal hepatic cytochrome P-450; increases biliary flow and the excretion of toxic substances; promotes recovery of hepatic functions; induces mRNA formation for the Hepatocyte Growth Factor (HGF); encourages the proliferation of the hepatocyte's endoplasmic smooth reticula, and accelerates the proliferation of hepatocytes; increases ornithine decarboxylase activity as well as the mitotic index, facilitates DNA synthesis and hepatic proteins; increases levels of glutathione, glutathione reductase and glucose-6-phosphate, improving the regeneration capacity of the liver.

[0071] *Silybum marianum* (Milk Thistle) The active principles of this plant are flavonolignans, including silibine, silicristine and sildianine and isosilibinin collectively known as silymarin. This compound has the highest grade of hepato-protective, hepato-generating, and anti-inflammatory activity. The mechanisms which explain its hepato-protector characteristics are diverse and include anti-oxidation, lipid anti-peroxidation, detoxification increase through a competitive inhibition with toxic substances, as well as protection against the depletion of glutathione. One of the mechanisms that can

explain its hepato-regenerative properties is the increase in protein synthesis, obtained thanks to a significant boost in the formation of ribosomes, DNA synthesis and proteins at the hepatic level, because the active principles join a specific polymerase receptor, stimulating ribosome formation. Its anti-inflammatory effect is due to the stabilization of the mastocytes, the inhibition of neutrophils, a strong inhibition of leucotriene (LT) synthesis and formation of prostaglandins. Sylimarin inhibits intestinal beta-glucuronidase enzymes, thus improving glucuronization, which is an important step in hepatic detoxification. More corporal toxins are removed via glucuronization than through other detox pathways.

**[0072]** *Picrorrhiza kurroa* The most important active constituents are iridoid glycoside picrosides I, II, III and kutkoside, known collectively as kutkin. Though less well researched than Silybum, it appears to have similar applications and mechanisms of action. When compared with Silybum, the curative efficacy of *Picrorrhiza* was found to be similar, or in many cases superior, to the effect of Silybum. *Picrorrhiza* possesses significant antioxidant activity, by reducing lipid peroxidation and free radical damage. Like sylimarin, it has also an effect on liver regeneration. *Picrorrhiza* also offers anti-inflammatory effects, inhibiting the infiltration of pro-inflammatory cells. One of its minor components, apocynin exhibits powerful anti-inflammatory effects, without affecting beneficial activities such as phagocytosis, chemotaxis or humoral immunity.

**[0073]** *Smilax* spp. (sarsaparilla) Its main active principles are: phytosterols, Steroid Saponins, Phenolic acids, Flavonoids and minerals. These substances adhere to toxins inside the gastrointestinal tract, this way reducing their absorption by the circulatory stream. On the other hand it improves the hepatic and renal excretory functions, facilitating the removal of toxic substances and waste found in cells, blood vessels and lymphatic system. Also, phytosterols block prostaglandin synthetase action, explaining its anti-inflammatory action and use to treat psoriasis.

**[0074]** *Vaccinium myrtillus* Angiogenesis appears to be a fundamental inflammatory response early in the pathogenesis of psoriasis and significant abnormalities of vascular morphology and vascular endothelial growth factor (VEGF) play a crucial role in the vascularization of psoriatic plaques. During inflammatory skin diseases such as psoriasis, the skin initiates angiogenesis through VEGF and the active principles of this plant (anthocyanosides, flavonoids, quercetin, tannins, iridoids and phenolic acids) significantly inhibit VEGF expression by the human keratinocytes, reducing the psoriatic plaque's angiogenesis.

Example 6

Composition—Dermal Disorders

**[0075]** A particularly preferred composition is shown in Table 3.

TABLE 3

Herbaria		
Active Agent	Ratio	Amount (mg)
<b>Energy enhancers</b>		
<i>Rhaponticum carthamoides</i> root extract	6:1	0.72
<i>Rhodiola rosea</i> root extract	5:1	9.66
<i>Szchisandra chinensis</i>	5:1	16.10

TABLE 3-continued

Herbaria		
Active Agent	Ratio	Amount (mg)
<b>Bio-Intelligence modulators</b>		
<i>Angelica sinensis</i>	5:1	32.20
<i>Astragalus membranaceus</i> root extract	5:1	48.30
<i>Echinacea angustifolia</i>	6:1	8.05
<i>Echinacea angustifolia</i> radix	6:1	1.34
<i>Echinacea purpurea</i>	6:1	8.05
<i>Echinacea purpurea</i> radix	5:1	1.61
<i>Ganoderma lucidum</i> mushroom extract	6:1	35.78
<i>Hydrastis canadensis</i>	5:1	19.32
<i>Lepidium meyenii</i>	5:1	48.30
<i>Panax ginseng</i> root extract	5:1	16.10
<i>Silibum marianum</i>	5:1	28.98
Shark Cartilage extract	4:1	93.92
<i>Tabeutia avellanedae</i>	4:1	67.08
<i>Uncaria tomentosa</i>	10:1	14.49
<b>Organization enhancers</b>		
<i>Equisetum arvense</i>	5:1	22.54
Fulvic Acid-Shilajit 65%	1:1	13.95
<i>Hydrocotyle asiatica</i>	5:1	42.94
<i>Picrorrhiza kurroa</i> (Standardized 4% Kutkin)	5:1	32.20
<i>Smilax officinalis</i>	5:1	72.45
<i>Vaccinium myrtillus</i>	5:1	16.10
Total		650

Example 7

Tolerance Studies

**[0076]** A multicentric, retrospective study was made on 100 healthy volunteers with the intention of evaluating patient tolerance and side effects of the herbaria combination. A capsule containing 700 mg of the herbaria of Table 1 was administered to each participant three times per day for five days. During that period they were evaluated by a physician, who registered any finding or symptom reported by each subject. The average age of the participants was 37.4 years with a SD of 8.2 years. Gender was 55% female, 45% male. The average weight of the subjects was 70 kilos with a SD of 12.3 kilos. No undesirable effects were observed in 96% of the subjects. Four (4%) subjects reported minor undesirable effects.

**[0077]** The study showed that herbaria were well tolerated—only minor symptoms were reported by 4 of the 100 subjects. These results showed the non-toxicity of the herbaria, demonstrating that the formulation is safe. Similar results have been obtained for the PCOS and Psoriasis formulations.

Example 8

Clinical Studies

**[0078]** To evaluate the efficacy of the combination, 110 patients affected with diverse degrees of lesions of the diabetic foot, were studied by means of retrospective, multicentric, and descriptive study for two year duration. Of these patients, 50 had grade III-V lesions, and were diagnosed for surgical amputation of the affected area. The patients were treated as above, with ten 700 mg capsule of herbaria three times a day, but the treatment was continued on an as needed basis for times ranging from 1.5 months to 10 months. The data is summarized in Table 4.

TABLE 4

Diabetic Foot Lesion Study				
Number of Patients	Clinical Improvement	QoL* Improvement	Treatment tolerance	Other
110	80.9% (89 patients)	86.4% (95 patients)	97.3% (107 patients)	Amputation avoided in 80% of the cases diagnosed for surgery

\*QoL is Quality of Life

**[0079]** It is significant to note that the herbaria treatment prevented amputation in 40 patients (80% of the population) who were already diagnosed for surgical removal of portions of the foot. In contrast, in the usual course of standard medical treatment, almost 100% of these patients could have expected to have a partial or complete amputation. Thus, these superior results are quite unexpected and clearly demonstrate the novel and non-obvious qualities of the formulation.

**[0080]** Likewise, 129 patients with chronic varicose ulcers were evaluated. The treatment (six 700 mg capsules three times a day) improved ulcers in 79% of the population, and remission was achieved in 21% of the population in only two months (Table 5). The systemic treatment also significantly improved the most frequent symptoms (cramps 71.4%, pain 78%, and edema 88.7%). In contrast, most patients with chronic varicose ulcers do not achieve remission under existing pharmaceutical treatments and have high risk of amputation.

TABLE 5

Chronic Varicose Ulcer Study				
Number of Patients	Clinical Improvement	QoL Improvement	Treatment tolerance	Remission time
129	79% (102 patients)	81.2% (105 patients)	99.2% (128 patients)	2 months in 21% of all patients

**[0081]** In a study of 35 patients with Polycystic Ovary syndrome (PCOS), the treatment improved pelvic pain in all 20 symptomatic patients, menstrual disorder (amenorrhea, dysmenorrhea, menometrorrhea, oligomenorrhea) in all 22 symptomatic patients, asthenia and cephalgia in all 17 symptomatic patients, as well as acne and hirsutism in 8 of 9 symptomatic patients. Pelvic echo sonograms revealed that 29 patients (82.9%) experienced a total disappearance of cysts, while another 6 (17.2%) showed a decrease in cyst size. In contrast, most patients with PCOS do not achieve symptomatic relief without surgical intervention, and very few, if any, have a complete disappearance of cysts (Table 6). The dosage was six 650 mg capsules three times a day.

TABLE 6

Polycystic Ovary Syndrome Study				
Number of Patients	Clinical Improvement	Cyst Disappearance	QoL Improvement	Treatment tolerance
35	100%	82.9% (29 patients)	100%	100%

[0082] Similarly, in a study of 123 patients with severe psoriasis, clinical remission was observed in 77% of the patients, and almost two thirds of the patients achieved clinical improvement in less than 45 days (Table 7). In contrast, most patients with severe psoriasis do not achieve remission, but only symptomatic relief with existing pharmaceutical approaches. The dosage was seven 650 mg capsules three times a day.

TABLE 7

Severe Psoriasis Study				
Number of Patients	Clinical Improvement	QoL Improvement	Treatment tolerance	Remission time $\leq$ 45 days
123	77.2% (95 patients)	66.3%	100%	82.9% (102 patients)

[0083] In conclusion, these results indicate that synergistic combinations of phytochemicals, scientifically chosen from each category of herbal tonics described in the next section, is surprisingly effective!

Example 9

Principles for Selecting Synergistic Combinations

[0084] In order to expand the range of formulations encompassed by the invention, we have categorized beneficial plants into one of three groups, each of which should be present for synergistic effect. The classifications are Energy, Bio-Intelligence and Organization. Plants classified under Energy are associated with ATP synthesis (such as the Krebs cycle, oxidative phosphorylation, beta-oxidation, etc.). Plants classified under Bio-Intelligence are those that regulate the neu-

roendocrine and immunological systems and cellular processes, thus controlling the interactions between the various systems in the body. Finally, plants classified under Organization are those that relate to the structure and function of specific organs. Combinations of plants from these three classification groups have synergistic effect because they address each necessary component of cellular and organic health—in effect they provide the triangle on which healing is fully supported.

[0085] A large group of plants were classified (along with some vitamins, etc.) according to this system, based on what is known in the literature about their active ingredients and mode of action. The classification is presented in Table 8. Table 8 is representative only: based on the criterion described herein, additional plants can easily be categorized as their mode of action is elucidated.

TABLE 8

Plant Categories		
Energy	Bio-Intelligence	Organization
<i>Acanthopanax senticosus</i>	<i>Agaricus blazei</i>	<i>Angelica sinensis</i>
<i>Ajuga turkestanica</i>	<i>Aloe vera</i>	<i>Buplerum chinense</i>
<i>Codonopsis pilosula</i>	<i>Andrographis paniculata</i>	<i>Cimicifuga racemosa</i>
<i>Cordyceps sinensis</i>	<i>Ammonia muricata</i>	Chitin fiber
<i>Cornu Cervi pantotrichum</i>	<i>Aralia mandshurica</i>	<i>Chondroitin sulphate</i>
<i>Ilex paraguariensis</i>	<i>Astragalus membranaceus</i>	<i>Crataegus oxyacantha</i>
L-arginine	Beta 1.3 glucan	<i>Croton lechleri</i>
<i>Lepidium meyerii</i>	Beta 1.6 glucan	<i>Curcubita pepo</i>
<i>Ocimum sanctum</i>	<i>Camelia sinensis</i>	<i>Curcuma longa</i>
<i>Panax ginseng</i>	<i>Coriolus versicolor</i>	<i>Dioscorea villosa</i>
<i>Panax quinquefolius</i>	<i>Echinacea angustifolia</i>	<i>Equisetum arvense</i>
<i>Pfafia paniculata</i>	<i>Echinacea purpurea</i>	<i>Eucommia bark</i>
<i>Ptychopetalum olacoides</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Fructus ligustri lucidum</i>
<i>Rhaponticum carthamoides</i>	<i>Grifola frondosa</i>	<i>Fructus lycii</i>
<i>Rhodiola rosea</i>	<i>Hydrastis Canadensis</i>	Fulvic acid
<i>Schizandra chinensis</i>	<i>Lactoferrin</i>	<i>Gentiana lutea</i>
Ubiquinone (Coenzyme Q10)	<i>Lentinus edodes</i>	<i>Ginkgo biloba</i>
	<i>Lobostomon trigonus</i>	<i>Glucosamine</i>
	<i>Morinda citrifolia</i>	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
	<i>Petiveria alliacea</i>	<i>Gynostemma</i>
	<i>Polygonum multiflorum radix</i>	<i>Harpagophytum procumbens</i>
	<i>Radix aconitae alba</i>	<i>Herba epimedii</i>
	<i>Radix polygalae</i>	<i>Hydrocotyle asiatica</i>
	Shark cartilage	<i>Linum usitatissimum</i>
	<i>Sutherlandia frutescens</i>	Minerals
	<i>Tabebuia avellaneda</i>	Mumiyo
	<i>Turnera aphrodisiaca</i>	<i>Opuntia ficus indica</i>
	<i>Uncaria tomentosa</i>	<i>Picrorhiza kurroa</i>
	<i>Valeriana officinalis</i>	Plants enzymes

TABLE 8-continued

Plant Categories		
Energy	Bio-Intelligence	Organization
	<i>Vitex agnus castus</i>	<i>Ptycopetalum olacoides</i> <i>Pygeum africanum</i> <i>Rhamnus purshiana</i> <i>Ruscus aculeatus</i> <i>Salix alba</i> <i>Sargassum fusiforme</i> <i>Sena alexandrina</i> <i>Serenoa repens</i> <i>Silibum marianum</i> <i>Smilax china</i> <i>Solanum nigrum</i> <i>Tribulus terrestris</i> <i>Ulmus fulva</i> <i>Urtica dioica</i> <i>Uva ursi</i> <i>Vaccinium myrthillus</i> <i>Viburnum spp</i> Vitamins

[0086] An illustrative example of synergy in medicinal plants is an in vitro study that demonstrates how the activity of herbal Berberine alkaloids is strongly potentiated by the action of herbal 5'-methoxyhydrocarpin (5'-MHC). It shows a strong increase of accumulation of berberine in the cells in the presence of 5'-MHC, indicating that this plant compound effectively disabled the bacterial resistance mechanism against the berberine antimicrobial, thus showing the synergy of both substances. Stermitz F R, et al., Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrocarpin, a multidrug pump inhibitor. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Feb. 15; 97(4):1433-7.

[0087] We expect to further demonstrate synergistic effect on a molecular scale by studying the gene expression profile changes in response to various plant ingredients and combinations thereof. Experiments are already underway demonstrating the expression profile in response to the formulations. We will be aided in this work because researchers have already begun studying the expression profiles of various medicinal plants, thus providing a database of knowledge from which to build. E.g., Gohil, et al., mRNA Expression Profile of a Human Cancer Cell Line in Response to Ginkgo Biloba Extract: Induction of Antioxidant Response and the Golgi System, Free Radic Res. 2001 December; 33(6):831-849.

[0088] We may also test combinations of plants for synergistic effects by using the mouse model for diabetic lesions, as described in Mastropaolo, et al., Synergy in Polymicrobial Infections in a Mouse Model of Type 2 Diabetes Infection and Immunity, September 2005, p. 6055-6063, Vol. 73, No. 9. Briefly, obese diabetic mouse strain BKS.Cg-m+/+Leprdb/J are injected subcutaneously with mixed cultures containing *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, and *Clostridium perfringens*. Progression of the infection (usually abscess formation) is monitored by examining mice for bacterial populations and numbers of white blood cells at 1, 8, and 22 days post-infection. Various plant ingredients and combinations thereof can be used to show a synergistic effect. Further, the model can be used to show synergy when the formulations of the invention are combined with existing pharmaceuticals, such as antibiotics.

What is claimed is:

1. A synergistic phytoceutical composition comprising:
  - a) at least two plants or ingredients selected from the group consisting of *Acantopanax*, *Ajuga*, *Codonopsis*, *Cordyceps*, *Cornu*, *Ilex*, L-arginine, *Lepidium*, *Ocimum*, *Panax*, *Pfaffia*, *Ptychopetalum*, *Rhaponticum*, *Rhodiola*, and *Schizandra*;
  - b) plus at least two plants or ingredients selected from the group consisting of *Agaricus*, *Aloe*, *Andrographis*, *Ammonia*, *Aralia*, *Astragalus*, *Camelia*, *Coriolus*, *Echinacea*, *Ganoderma*, *Grifola*, *Hydrastis*, *Lactoferrin*, *Lentimus*, *Lobostemon*, *Morinda*, *Petiveria*, *Polygonum*, *Radix*, *Radix*, *Sutherlandia*, *Tabebuia*, *Turnera*, *Uncaria*, *Valeriana* and *Vitex*;
  - c) plus at least two plants or ingredients selected from the group consisting of *Angelica*, *Bupleurum*, *Cimicifuga*, *Chitin fiber*, *Chondroitin sulfate*, *Crataegus*, *Croton*, *Curcubita*, *Curcuma*, *Dioscorea*, *Equisetum*, *Eucommia*, *Fructus*, *Gentiana*, *Ginkgo*, *Glucosamin*, *Glycyrrhiza*, *Gynostemma*, *Harpagophytum*, *Herba*, *Hydrocotyle*, *Linum*, *Minerals*, *Mumiyo*, *Opuntia*, *Picrorrhiza*, *Plant enzymes*, *Ptycopetalum*, *Pygeum*, *Rhamnus*, *Ruscus*, *Salix*, *Sargassum*, *Sena*, *Serenoa*, *Silibum*, *Smilax*, *Solanum*, *Tribulus*, *Ulmus*, *Urtica*, *Uva ursi*, *Vaccinium*, and *Viburnum*;
  - d) together with pharmaceutically acceptable excipients or carriers.
2. The synergistic phytoceutical composition of claim 1 further comprising:
  - a) at least two plants or ingredients selected from the group consisting of *Acantopanax senticosus*, *Ajuga turkestanica*, *Codonopsis pilosula*, *Cordyceps sinensis*, *Cornu Cervi pantrotichum*, *Ilex paraguariensis*, L-arginine, *Lepidium meyenii*, *Ocimum sanctum*, *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*, *Pfaffia paniculata*, *Ptychopetalum olacoides*, *Rhaponticum carthamoides*, *Rhodiola rosea*, *Schizandra chinensis*, and *Ubiquinone* (Coenzyme Q10);
  - b) plus at least two plants or ingredients nutraceuticals selected from the group consisting of *Agaricus blazei*, *Aloe vera*, *Andrographis peniculata*, *Ammonia muricata*,

*Aralia Mandshurica*, *Astragalus membranaceus*, Beta 1.3 glucan, Beta 1.6 glucan, *Camelia sinensis*, *Coriolus versicolor*, *Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frandosa*, *Hydrastis canadensis*, *Lactoferrin*, *Lentinus edodes*, *Lobostemon trigonus*, *Morinda citrifolia*, *Petiveria alliacea*, *Polygonum multiflorum radix*, *Radix aeponiae alba*, *Radix polygalae*, Shark Cartilage, *Sutherlandia frutescens*, *Tabebuia avellanadae*, *Turnera aphrodisiaca*, *Uncaria tomentosa*, *Valeriana officinalis* and *Vitex agnus castus*;

- c) plus at least two plants or ingredients selected from the group consisting of *Angelica sinensis*, *Bupleurum chinense*, *Cimicifuga racemosa*, *Chitin fiber*, *Chondroitin sulfate*, *Crataegus oxyacantha*, *Croton lechleri*; *Curcubita pepo*, *Curcuma longa*, *Dioscorea villosa*, *Equisetum arvense*, *Eucommia bark*, *Fructus ligustri lucidum*, *Fructus lycii*, *Fulvic acid*, *Gentiana lutea*, *Ginkgo biloba*, *Glucosamin*, *Glycyrrhiza glabra*, *Gynostemma*, *Harpagophytum procumbens*, *Herba epimedii*, *Hydrocotile asiatica*, *Limum usitatissimum*, Minerals, *Mumiyo*, *Opuntia ficus indica*, *Picrorhiza kurroa*, Plant enzymes, *Prycopetalum olacoides*, *Pygeum africanum*, *Rhamnus purshiana*, *Ruscus aculeatus*, *Salix alba*, *Sargassum fusiforme*, *Sena alejandrina*, *Serenoa repens*, *Silibum marianum*, *Smilax china*, *Solanum nigrum*, *Tribulus terrestris*, *Ulmus fulva*, *Urtica dioica*, *Uva ursi*, *Vaccinium myrtillus*, *Viburnum spp* and Vitamins.

3. The phytoceutical composition of claim 1, comprising at least 6 plants or extracts or active ingredients derived from each of the following plants: *Ginkgo*, *Vaccinium*, *Angelica*, *Crataegus*, *Hydrocotyle*, *Ruscus*, *Croton*, *Echinacea*, *Eleutherococcus*, *Ganoderma*, *Grifola*, *Hydrastis*, *Panax*, *Pfaffia*, *Rhaponticum*, *Rhodiola*, *Tabebuia*, *Panax*, *Uncaria*, *Petiveria*, and *Sutherlandia*, together with pharmaceutically acceptable excipients.

4. The phytoceutical composition of claim 3, further comprising at least 6 plants selected from *Ginkgo biloba*, *Vaccinium myrtillus*, *Angelica sinensis*, *Crataegus oxyacantha*, *Hydrocotyle asiatica*, *Ruscus aculeatus*, *Croton lechleri*, *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia*, *Eleutherococcus senticosus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Hydrastis canadensis*, *Panax ginseng*, *Pfaffia paniculada*, *Rhaponticum carthamoides*, *Rhodiola rosea*, *Tabebuia avellanadae*, *Panax quinquefolius*, *Uncaria tomentosa*, *Petiveria alliacea*, and *Sutherlandia frutescens*.

5. (canceled)

6. The phytoceutical composition of claim 1, comprising at least 6 plants or extracts or active ingredients derived from each of the following plants: *Rhodiola*, *Vitex*, *Echinacea*, *Astragalus*, *Ganoderma*, *Uncaria*, *Grifola*, *Dioscorea*, *Tabebuia*, *Pfaffia*, *Panax*, *Hydrocotile asiatica*, together with pharmaceutically acceptable excipients.

7. The phytoceutical composition of claim 6 further comprising at least 6 plants selected from *Rhodiola rosea*, *Vitex agnus castus*, *Echinacea angustifolia*, *Echinacea angustifolia radix*, *Echinacea purpurea*, *Echinacea purpurea radix*, *Astragalus membranaceus*, *Uncaria tomentosa*, *Grifola fron-*

*dosa*, *Dioscorea villosa*, *Tabebuia avellanadae*, *Pfaffia paniculata*, *Panax quinquefolius*, *Hydrocotile asiatica asiatica*.

8. (canceled)

9. The phytoceutical composition of claim 1, comprising at least 6 plants or extracts or active ingredients derived from each of the following plants: *Rhaponticum*, *Rhodiola*, *Szchisandra*, *Angelica*, *Astragalus*, *Echinacea*, *Ganoderma*, *Hydrastism*, *Lepidium*, *Panax*, *Silibum*, *Tabebuia*, *Uncaria*, *Equisetum*, *Hydrocotile*, *Picrorhiza*, *Smilax*, and *Vaccinium*, plus shark cartilage and Fulvic Acid, together with pharmaceutically acceptable excipients.

10. The phytoceutical composition of claim 9, further comprising at least 6 plants selected from *Rhaponticum carthamoides*, *Rhodiola rosea*, *Szchisandra chinensis*, *Angelica sinensis*, *Astragalus membranaceus*, *Echinacea angustifolia*, *Echinacea angustifolia radix*, *Echinacea purpurea*, *Echinacea purpurea radix*, *Ganoderma lucidum*, *Hydrastis canadensis*, *Lepidium meyerii*, *Panax ginseng*, *Silibum marianum*, *Tabebuia avellanadae*, *Uncaria tomentosa*, *Equisetum arvense*, *Hydrocotile asiatica*, *Picrorhiza kurroa*, *Smilax officinalis*, and *Vaccinium myrtillus*.

11. (canceled)

12. (canceled)

13. A method of treating disease comprising: administering an effective amount of the composition of claim 1 to a patient sufficient to alleviate said disease.

14. The method of claim 13, wherein the disease is a circulatory disease, a female endocrine disorder, or a skin disorder.

15. (canceled)

16. (canceled)

17. (canceled)

18. The synergistic phytoceutical composition of claim 1, comprising at least 3 plants from the plants recited in a), b), and c).

19. The synergistic phytoceutical composition of claim 1, comprising at least 4 plants from the plants recited in a), b), and c).

20. A method of preparing a synergistic phytoceutical composition comprising:

- a) selecting at least three plants containing active ingredients associated with ATP synthesis (Energy plants);
- b) selecting at least three plants containing active ingredients that regulate the neuroendocrine system, immunological system or cellular processes (Bio-Intelligence plants);
- c) selecting at least three plants containing active ingredients that relate to the structure and function of specific organs (Organization plants); and
- d) combining said plants or plant portions or extracts thereof and adding a pharmaceutically acceptable excipient.

21. The method of claim 20, wherein the Energy plants, Bio-Intelligence plants and Organization plants are selected from those listed in Table 8.

22. A composition prepared by the method of claim 20.

\* \* \* \* \*

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Zuccherino RD, Mitelman OC. Derecho de patentes; aislamiento o armonización, la patentabilidad de los productos farmacéuticos. Buenos Aires: Ad-Hoc. 1994. P. 21-33.
2. Huerta RM, Aguilar RA, Zamilpa A y Tortoriello J. *Conocimientos básicos en Propiedad Industrial. Una guía para la presentación de solicitudes de patente para investigadores mexicanos en el área de estudio de las plantas*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2009, sin mes; 8 (1): 41-51.
3. Shiva V. Biopiratería, el saqueo de la naturaleza y el conocimiento. New York: Icaria Antrazit; 1997. P. 9-23.
4. Shiva V. ¿Proteger o expoliar? Los secretos de la propiedad intelectual. New York: Intermon Oxfan; 2003. P. 69-91.
5. Müller DL. Derecho de la ciencia y la ciencia y la tecnología del desarrollo. Mexico DF: Porrúa; 1995. P. 85-117.
6. Herrera MHJ. Iniciación al derecho de autor. Mexico DF: Limusa; 1992.p. 17-21 y 35-38.
7. Cámara de Diputados [página en internet]. Mexico DF: Ley de derechos de autor [citado 2013 marzo 4]. Disponible en: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/122.pdf>
8. Farrell CA. El sistema mexicano de derechos de autor. Mexico DF: Gráfica Panamericana; 1966. P. 75-89.
9. Cámara de Diputados [página en internet]. Mexico DF: Ley de la propiedad industrial [citado 2013 marzo 4]. Disponible en: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/50.pdf>
10. Walsh G. Biopharmaceuticals, biochemistry and biotechnology. 2 ed. London: Wiley; 2003.p. 57-64.
11. Zamudio T. protección jurídica de las innovaciones. Buenos Aires: Ad-oc; 2001.p. 100- 111.
12. Mitelman OC. Cuestiones de derecho industrial. Buenos Aires: Ad-Hoc. 1999. P. 131-133.
13. Larrea Q. Marcas & trademarks. Barcelona: Gustavo Gill; 2005. P. 22-31.
14. OCDE. Propiedad intelectual, transferencia de tecnología y recursos genéticos. París; Ocede; 1997. P. 19-27.
15. Stierlin H, Grossarth-Maticek J. ¿Es posible prevenir el cáncer? Barcelona: Herder; 2003. P. 19-21.
16. Pérez TR. El cáncer en Mexico. Mexico DF: El colegio nacional. 2003. P. 407.
17. De Ruiz AP. Cáncer cervicouterino, diagnóstico, prevención y control. Mexico DF: editorial Medica panamericana; 2000.p. 57-85.
18. De Ruiz AP, Lazcano PE, Hernández AM. Cáncer cervicouterino, diagnóstico, prevención y control. 2 ed. Mexico DF: editorial Medica panamericana; 2005.p. 57-65.
19. González AG. Trastornos médicos frecuentes en oncología. México DF: McGraw-Hill Interamericana; 2001. p. 1, 15, 24 y 37.
20. Merle J. Lewis. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Organización Panamericana de la Salud. 2004. p 40.

21. National Cancer Institute [homepage on the Internet]. New York: National Cancer Institute of EE. UU. [cited 2012 Aug 30]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/aboutnci>
22. Tiznado P., *Relación entre la ingestión de carotenoides dietarios y la incidencia de cáncer de mama*. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro. 2007. 14- 81 p.
23. Itoh H., Noda H., Amano H., Zhuang C., Mizuno T., Ito H., *Antitumor activity; immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from Sargassum thunbergii of Phaeophyceae*. Faculty of Bioresources, Mie University, Japan. 1993, 6:13: p 52.
24. Zhuang C., Itoh H., Mizuno T., Ito H., *Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, umitoranoo (Sargassum thunbergii)*. United Graduate School of Agricultural Sciences, Gifu University, Japan. 1995; 4:59.
25. Pyo Jam P., *Reactive Oxygen Scavenging Effect of Enzymatic Extracts from Sargassum thunbergii*. Department of Biotechnology and Nokyong Research Center, Korea, J. Agric. Food Chem. 2005; 17:53; pp 6666-6672.
26. Babosa Brito., *Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activity from Algae of the Genus Caulerpa*. Mar. Drugs. 2011; 9; 307—318 p.
27. De Lara I., *Propiedades antibióticas de algunas especies de algas marinas bénticas*. Universidad Autónoma Metropolitana, México. 1992; 12002; pp. 21-28.
28. Makoto I., Jun M., Xiang T., TalKayulKi M., Kyoko H., Daishi S., Haruo S., Ushio S., Toshimitsu H., *Antioxidant and Antiviral Activities of Plastoquinones from the Brown Alga Sargassum micracanthum, and a New Chromene Derivative Converted from the Plastoquinanes*. 2005. International Journal of Agriculture & Biology.
29. Sanaa M., Shanab., *Antioxidant and Antibiotic Activities of Some Seaweeds(Egyptian isolates)*. Botany Department, Faculty of Science, Cairo University, Egypt. 2001.
30. Raghavendran R., Sathivel A., Devaki T., *Protective effect of Sargassum polycystum (brown alga) against acetaminophen-induced lipid peroxidation in rats*. Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Madras India, ·2005; 2:19: 5-135 p.
31. INEGI [página en internet]. Mexico DF: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática [citado 2012 Sep 20]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/Sistemas/temasV2/Default.aspx?s=est&c=19007>
32. IMPI [página en internet]. Mexico DF: Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial [citado 2012 Sep 20]. Disponible en: [http://www.impi.gob.mx/wb/IMPI/impi\\_en\\_cifras2](http://www.impi.gob.mx/wb/IMPI/impi_en_cifras2)
33. UNAM [página en internet]. México DF: Dirección General de Evaluación Institucional [citado 2012 Sep 20]. Disponible en: <http://www.dgei.unam.mx/?q=node/61>
34. Huerta RM, Aguilar RA, Zamilpa A y Tortoriello J. *Conocimientos básicos en Propiedad Industrial. Una guía para la presentación de solicitudes de patente para investigadores mexicanos en el área de estudio de las plantas*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2009, sin mes; 8 (1): 41-51.