



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 344 392**

② Número de solicitud: 200802653

⑤ Int. Cl.:
A61K 36/074 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **18.09.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
25.08.2010

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Alcalá
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Calviño Vanegas, Eva;
Díez Ballesteros, José Carlos y
García Manjón, José Luis**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Fracción semipurificada de *Ganoderma lucidum* con actividad antitumoral.**

⑤ Resumen:

Fracción semipurificada de *Ganoderma lucidum* con actividad antitumoral.

Se ha desarrollado un procedimiento de obtención de una fracción semipurificada de *Ganoderma lucidum*. Esta fracción se extrae por disgregación de cuerpos fructíferos, re-suspensión en metanol 10%, evaporación del extracto soluble y disolución en methanol absoluto. La muestra se adsorbió en silicagel y se aplicó en columna (1x15,5 cm), cromatografiándose con fase móvil de fase móvil de butanol:ácido acético:agua (3:1:1). Las fracciones de interés presentando un Rf de 0,74 se mezclaron, se evaporó el solvente y la muestra final se resuspendió en DMSO (Dimetilsulfóxido) para obtener la Fracción Semipurificada Activa de *Ganoderma lucidum* (FSAGL). Esta fracción es potencialmente aplicable al tratamiento antitumoral de procesos cancerosos de tipo linfoma y leucemia.

ES 2 344 392 A1

DESCRIPCIÓN

Fracción semipurificada de *Ganoderma lucidum* con actividad antitumoral.

5 **Sector de la técnica**

La invención se encuadra en el sector de la obtención de productos naturales de baja toxicidad tradicionalmente utilizados en Medicinas Orientales. Por tanto, puede considerarse que la invención puede ser de utilidad para el desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas en el tratamiento de la actividad tumoral de células cancerosas. La invención muestra una preparación de compuestos de *Ganoderma lucidum* que pueden ser utilizados para tratamiento antitumorales, como leucemias humanas, linfomas, etc. Por tanto, la invención presenta aplicabilidad en el sector de productos farmacéuticos con actividad farmacológica antitumoral.

15 **Estado de la técnica**

15 Biotecnológicamente los hongos filamentosos y las levaduras son más conocidos que otros parientes microscópicos filamentosos que, además, se reproducen macroscópicamente de manera sexual mediante “setas” o cualquier otro tipo de fructificación de menor o mayor tamaño como el género *Ganoderma*.

20 Como fuentes de sustancias con actividad biológica, los hongos son de utilidad en medicina así como en bioindustria, y constituyen la base de varios procesos biotecnológicos para la producción comercial de muchos compuestos químicos: fármacos como, por ejemplo, la ergometrina, preparados vitamínicos y varios antibióticos, principalmente penicilina y griseofulvina [1]. Por otro lado, los hongos presentan aplicaciones en la industria químico-farmacéutica, medio-ambiental, en silvicultura, etc.

25 De las 14.000 especies de hongos conocidas, se considera que el 50% posee grados de comestibilidad variables, más de 2.000 son seguros y se conoce que alrededor de 700 especies poseen propiedades farmacológicas significativas 2-5. Los hongos poseen principios activos que permiten bajar el colesterol en sangre, reducir la hiperlipidemia, como antitrombóticos, moduladores de la presión arterial en la sangre. De ellos, se han aislado e identificado sustancias con efectos antivirales, inmunomoduladores, antioxidantes, cardiovasculares, antihiper-colesterolémicos, antibacteriales, antiparasitarios, hepato-protectores y antidiabéticos.

35 *Ganoderma lucidum*, “Lingzhi” en la terminología china y “Reishi” en la japonesa, se ha usado durante mucho tiempo en China para prevenir y tratar varias enfermedades humanas. Los efectos de immuno-modulación de los polisacáridos *G. lucidum* son extensos. Los efectos antitumorales de *G. lucidum* están siendo activamente investigados. Diferentes compuestos químicos [6] como triterpenos, polisacáridos, proteínas, aminoácidos, nucleósidos, esteroides, alcaloides, ácidos grasos y enzimas, se han aislado del micelio y cuerpo fructífero de diferentes especies de *Ganoderma* [7-10] Los constituyentes más importantes desde el punto de vista farmacológico son triterpenos y polisacáridos. Se han encontrado cerca de 150 triterpenos en especies de *Ganoderma* (entre ellos el ácido ganodérico C1 y el ganodermantriol). Los polisacáridos de *G. lucidum* se obtienen a partir de extractos acuosos como el Ganopoly®, extracto acuoso patentado (fracción polisacárida) que se encuentra en fase clínica y eficaz contra la diabetes mellitus tipo II [11]. Recientemente, se han encontrado compuestos activos en *Ganoderma* con numerosos efectos farmacológicos tales como antialérgico, antiviral, antihepatotóxico, cardiovascular, anti-VIH, inmunomodulador, antitumoral, entre otros.

45 *Efectos cardiovasculares e anti-hipercolesterolémicos*

Así, se evaluó la actividad cardiovascular de un extracto acuoso del micelio de *G. lucidum* en conejos y ratas observándose que el extracto disminuyó la tensión arterial sistólica y diastólica [12].

50 *Efectos antibacterianos y antimicóticos*

55 Varias especies de *Ganoderma* (*G. lucidum*, *G. applanatum* y *G. oregonense*) poseen un alto grado de actividad anti-estafilococos, estreptococos y con *Bacillus pneumoniae*, aumentando la actividad del sistema inmune y su efecto antiviral [13]. También se ha estudiado el efecto de extractos de *G. lucidum* con cuatro clases de antibióticos (ampicilina, cefazolina, oxytetraciclina y cloranfenicol) y se observándose un efecto sinérgico al combinarlo con cefazolin contra el *Bacillus subtilis* y *Klebsiella oxytoca* [14].

Efectos Antivirales

60 Ganoderiol F y ganodermanontriol, triterpenos aislados de extractos metanólicos de cuerpos fructíferos de *G. lucidum*, poseen actividad anti-VIH-1 [15].

Efectos Antitumorales

65 Muchos trabajos revelan que extractos de *G. lucidum* poseen efectos anti-proliferativos en células tumorales de leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colonrectal, cáncer de vejiga y el cáncer de próstata. Resultados obtenidos con un extracto acuoso del medio de cultivo de *G. lucidum* indican que la suplementación dietética con el mismo inhibe el desarrollo de tumores pulmonares, [16].

También se ha señalado que extractos acuosos de cuerpos fructíferos de *G. lucidum*, *G. sinense*, y *G. tsugae* tienen actividad antitumoral en células de cáncer de mama humanas y actividad immuno-moduladora en linfocitos murinos [17].

5 Investigando los efectos de un extracto *G. lucidum* en una línea celular humana de cáncer colonrectal se ha encontrado que dicho extracto inhibía la proliferación de células de cáncer humanas colonrectales y posee propiedades antioxidantes [18]. *G. lucidum* inhibe la proliferación celular de manera dosis y tiempo dependientes, además, induce apoptosis con una disminución en los niveles de expresión de NF- κ B, Bcl-2 y Bcl-x1, aumento en la expresión de Bax causando el aumento de la proporción de Bax/Bcl-2 y Bax/Bcl-x1 [19]. Estudiando el efecto de *G. lucidum* sobre
10 angiogénesis relacionada con el cáncer de próstata se ha encontrado que *G. lucidum* inhibe eventos tempranos de la angiogénesis, en concreto la morfogénesis capilar de las células endoteliales aórticas humanas [20].

Las esporas y los cuerpos fructíferos de *G. lucidum* inhiben la invasión de células de cáncer de mama y próstata por un mecanismo común y pueden tener potencial terapéutico para el tratamiento de cáncer [21-23].

15 Apoptosis

La muerte apoptótica da lugar a una serie de cambios morfológicos muy bien definidos [24]. Tanto el núcleo como el citoplasma se condensan, el ADN se rompe, la membrana nuclear se degrada, y la célula se deforma. Por último,
20 se forman cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por macrófagos y células adyacentes sin que se produzca una respuesta inflamatoria.

La apoptosis se da a través de una secuencia muy bien determinada de cascadas de señalización. Se han descrito dos vías principales de señalización intracelular que dan lugar a la muerte apoptótica: la vía intrínseca y la vía extrínseca.
25

La vía intrínseca está regulada por los miembros de la familia de la Bcl-2 [25]. El primer miembro que se descubrió fue el protooncogen *Bcl-2*, observándose que su expresión no promovía la proliferación celular como otros oncogenes, sino que bloqueaba la muerte celular ante múltiples estímulos fisiológicos y patológicos [26-27].

30 Dentro de la familia de la Bcl-2, existen miembros anti-apoptóticos que promueven la supervivencia, y miembros pro-apoptóticos con función opuesta. El primer homólogo pro-apoptótico de la Bcl-2 descubierto fue la proteína Bax, identificada por su interacción con la Bcl-2 [28]. Todas estas proteínas presentan, como mínimo, una de las cuatro regiones o dominios homólogos a Bcl-2 (BH1-BH4, del inglés *Bcl-2 homology*), lo cual les permite interactuar entre ellos formando homodímeros o heterodímeros, regulando así su función [29].

35 Las proteínas de la familia de la Bcl-2 se pueden regular a nivel transcripcional y post-traduccional (mediante cambios conformacionales o por fosforilación). En condiciones normales, las proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 o Bcl-xL están ancladas en determinadas membranas intracelulares como la mitocondria, el retículo endoplásmico o la membrana nuclear [30]. Ambas proteínas actúan inhibiendo a los miembros pro-apoptóticos a través de la heterodimerización con éstos [31].
40

En cambio, Bax se localiza en el citosol y después de un estímulo apoptótico es translocada a la membrana mitocondrial externa donde se integra y forma oligómeros o multímeros [32-37].

45 Varios estudios demuestran la regulación a nivel transcripcional de miembros de la familia de la Bcl-2 en respuesta a diversos estímulos apoptóticos o citotóxicos, observándose una disminución de la expresión de Bcl-2 y/o Bcl-xL [38-39] y un aumento de la expresión de Bax [40-42]

La vía extrínseca se inicia por la activación de receptores de muerte de la familia del TNF (del inglés, *Tumor necrosis factor*) anclados a la membrana plasmática. La familia del TNF está constituida por varios grupos de receptores, entre los cuales destacan el TNFR1 (del inglés, *TNF-receptor 1*), el APO1/FAS/CD95 (del inglés, *Apoptosis antigen-1*) y el TRAILR1 (del inglés, *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1*). La activación del receptor se inicia a través de ligandos específicos. Cuando el ligando se une a su receptor, los dominios de muerte se asocian con las proteínas adaptadoras que contienen los dominios efectores de muerte [43].
50
55

Cascadas de señalización

La vía de las MAPK es una de las más conservadas a lo largo de la evolución y está formada por tres subfamilias: la vía de las Erks (del inglés, *Ras/extracelular signal regulated kinase*), la vía de la p38 y finalmente, la vía de la SAPK/JNK (del inglés, *Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase* [44]). Hasta el momento se han identificado aproximadamente unos 20 miembros de la familia de las MAPK [45]. La vía de las MAPK se caracteriza por ser activada en respuesta a una amplia variedad de estímulos extracelulares, aparte de los factores de crecimiento, como son el suero, las citoquinas, el calcio, las hormonas y los neurotransmisores [46]. En general, se asocia la vía de la Erk con la diferenciación/supervivencia, y las otras dos vías son inductoras de apoptosis [47].
60
65

AKT

La activación de Akt/PKB juega un papel fundamental en prevenir la muerte celular por apoptosis, ya que fosforila e inactiva muchas proteínas implicadas en apoptosis. Una de sus dianas es el miembro de la familia Bcl-2, Bad.
 5 La actividad de Akt/PKB aumenta los niveles de proteínas anti-apoptóticas incluidas Bcl-2 y Bcl-x y un número de moléculas de adhesión a matriz. La actividad inducida por Akt/PKB también se ha visto unida a la expresión del factor de transcripción anti-apoptótico NF- κ B [48].

Relación con otras patentes

10 Los siguientes documentos hacen referencia a las patentes más relacionadas con la extracción de principios activos de *G. lucidum*:

- En el documento de patente US20080112967 (Process for Refining *Ganoderma* Spore Polysacchoride), se describe un método de extracción en agua a 70-90°C de polisacáridos a partir de esporas de *Ganoderma*.

- En los documentos de patente US7323176 y US20070104729 [Immuno-modulating antitumor activities of *G. lucidum* (reishi) polysaccharides], se describen un método de extracción (alcalino), a partir de basidiocarpos de *G. lucidum*, con respuesta inmunomoduladora antitumoral.

- En el documento de patente US20070105814 (Methods and compositions associated with administration of an extract of *G. lucidum*), se describe la utilización de un lipopolisacárido con actividad estimuladora en macrófagos, mediante un método de extracción en solución alcalina de *G. lucidum*.

25 - En el documento de patente US20080112966 (Extracts and methods comprising *Ganoderma species*), se describen diferentes métodos de extracción basados en nieve carbónica, para la obtención, entre otros compuestos, de ácidos ganodéricos.

- En el documento de patente US7258862 (Mushroom extracts having anticancer activity), se describen una serie de métodos de extracción en una mezcla de disolventes orgánicos (metanol, etanol, diclorometanol y acetato de etilo), para el tratamiento de leucemias, a partir de micelio de *Trametes zonata* y de otros hongos, como *Ganoderma adpersum*.

30 - En el documento de patente US20070231339 (Fungal immunostimulatory compositions), se describe, un método de extracción alcalino (0.1 N de NaOH) de basidiocarpos de *G. lucidum*, trabajando con una determinada fracción glicoproteica con actividad inmunomestimuladora.

Explicación de la invención

40 *Procedimiento de obtención de una Fracción Semipurificada Activa de Ganoderma lucidum (FSAGL)*

El procedimiento comprende varias etapas:

Cultivo del hongo

45 La cepa del hongo patógeno facultativo *G. lucidum*, que se conserva en la Micoteca del Dpto. de Biología Vegetal de la Universidad de Alcalá, se aisló a partir de un carpóforo que fructificaba en raíces de *Quercus ilex* (encina) en Cáceres (España), en medio de cultivo Agar-Malta (MA). La expansión miceliar se realiza en sustratos sólidos de tipo lignocelulósicos [49]. El bloque miceliar origina fructificaciones, al cabo de 1 -2 meses, en condiciones controladas
 50 ambientales.

Extracción metanólica

55 El procedimiento implica disgregación de los cuerpos fructíferos obtenidos en nitrógeno líquido resuspendiendo posteriormente el material en metanol 10% para extraer principios activos con agitación a 4°C por 24 horas.

Cromatografía en Columna de Silicagel

60 El procedimiento de obtención de una fracción activa de *Ganoderma lucidum* se diseñó evaporando extracto metanólico y aplicándolo en una columna de silicagel. Las fracciones cuyo Rf corresponde a 0,74 en elución con 3:1:1 butanol: ácido acético: agua se consideran como portadoras de principios activos con posible actividad antitumoral. A partir de ellas se recoge la muestra final en Dimetilsulfóxido (FSAGL) de la que mostramos actividad antitumoral y
 65 posible uso como medicamento.

ES 2 344 392 A1

La FSAGL de Ganoderma lucidum reduce la viabilidad de células DA-1 de linfoma murino

La FSAGL produce disminución de la viabilidad en células DA-1 de linfoma murino en tratamientos a diferentes tiempos con potencial aplicación en tratamientos terapéuticos de linfomas.

5

La FSAGL de Ganoderma lucidum actúa como citotóxico en células DA-1 de linfoma murino

La FSAGL produce toxicidad fragmentando el ADN al aplicarse en células de linfoma murino.

10

La FSAGL de Ganoderma lucidum produce cambios en la expresión de factores apoptóticos y quinasas intracelulares en DA-1

15 La FSAGL modifica los niveles de factores implicados (p53, Bax, Bcl2) en el proceso de apoptosis en células de linfoma murino lo que indica que está actuando sobre el proceso de muerte celular programada (apoptosis) en las células DA-1.

20 La FSAGL también produce cambios en factores como la quinasa Akt y cambios de fosforilación de Akt lo que indica que está alterando la cascada de señalización celular.

La FSAGL tiene potencial aplicación terapéutica como medicamento antitumoral en células de linfoma.

25 *La FSAGL de Ganoderma lucidum reduce la viabilidad de células leucémicas humanas NB4*

La FSAGL produce una disminución de la viabilidad celular del cultivo de células leucémicas humanas resultando citotóxica. Esta fracción podría ser potencialmente aplicada para tratamientos terapéuticos como medicamento antitumoral en células leucémicas humanas.

30

La FSAGL de Ganoderma lucidum induce apoptosis en células leucémicas humanas NB4

35 La FSAGL produce la muerte celular induciendo fragmentación de ADN en células leucémicas humanas. Dicha fracción produce inducción de apoptosis con exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular por el método anexina V-FITC (Isotiocianato de Fluoresceína). La aparición de células anexina-V positivas representa las células apoptóticas. La FSAGL tiene potencial aplicación terapéutica como medicamento antitumoral en células de leucemia humana.

40

La FSAGL cambia los patrones de expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en células leucémicas humanas NB4

45 El tratamiento de las células NB4 durante 19 horas con la FSAGL disminuye significativamente los niveles de p53, los niveles de Bcl-2 mientras que Bax aumenta ligeramente en todos los casos respecto al control. Esto indica que la FSAGL altera la señalización de la apoptosis. Se ha estudiado el efecto de este tratamiento sobre quinasas intracelulares. Después del tratamiento respecto al control Akt, Erk y sus formas fosforiladas disminuyen su intensidad respecto al control. Esta disminución no es tan marcada en el caso de Erk y p-Erk. Estos resultados indican que la cascada de transducción de señales dentro de la célula está alterada por la FSAGL.

50

Análisis elemental

55 La FSAGL presenta una composición elemental definida. Se realizó el análisis elemental obteniéndose la proporción de carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno y azufre.

Descripción de los dibujos

60 Figura 1. Viabilidad de células DA-1 tratadas con la FSAGL. Se representa el porcentaje de viabilidad celular medido como impermeabilidad a yoduro de propidio tras tratamiento con la FSAGL durante 13, 19 y 24 horas. Los resultados representan la media de tres experimentos diferentes \pm el error estándar de la media. Diferencia significativa * ($p < 0,05$) prueba t-Student.

65 Figura 2. Fragmentación de ADN medida como cantidad de ADN subdiploide en células DA-1 tratadas con la FSAGL. Las barras representan el porcentaje de ADN subdiploide en células control (sin tratamiento) y tratadas con la FSAGL durante 13, 19 y 24 horas. Los resultados representan la media de tres experimentos \pm error estándar de la media Diferencia significativa * ($p < 0,05$) prueba t-Student.

Figura 3. Niveles de expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas en células DA-1 tratadas durante 13, 19 y 24 horas con la *FSAGL*. Resultados de un experimento representativo de “Western-blot”. Los valores mostrados están corregidos con la intensidad de la banda de actina y el porcentaje de expresión de proteína está también corregido respecto a su intensidad en el control de células sin tratamiento considerado el 100%.

Figura 4. Viabilidad de células NB4 de leucemia humana tratadas con la *FSAGL* (sin diluir y diluido al 15% y 40% de concentración, respectivamente) durante 19 horas. Se representa el porcentaje de viabilidad celular medido como impermeabilidad celular a yoduro de propidio (IP) y el conteo de células con bajo nivel de fluorescencia intracelular de IP y baja unión a anexina V-FITC (dobles negativas a IP y anexina V-FITC). Los valores representan las medias de tres experimentos diferentes \pm el error estándar de la media. Diferencia significativa * ($p < 0,05$) prueba t-Student.

Figura 5. Inducción de apoptosis en células NB4 leucémicas humanas después de tratamiento con la *FSAGL* (sin diluir y diluido al 15% y 40% de concentración, respectivamente) durante 19 horas. La apoptosis celular se midió como inducción de fragmentación de ADN (porcentaje de ADN subdiploide) y el conteo de células con alta unión de anexina V-FITC (células anexina positivas) de cultivos control (sin tratamiento) y tratadas con la *FSAGL* sin diluir y diluida al 15% y 40% durante 19 horas. Estos valores representan las medias de tres experimentos diferentes \pm el error estándar de la media. Diferencia significativa * ($p < 0,05$) prueba t-Student.

Figura 6. Niveles de expresión de proteínas de apoptosis en células leucémicas humanas después del tratamiento con la *FSAGL* diluido al 15% durante 19 horas. Tras el tratamiento, se realizó “Western-blot”. Las autorradiografías se escanearon. Las intensidades de las bandas correspondientes a p53, Bcl2 y Bax se corrigieron respecto a la intensidad de la banda de actina como un control de expresión constitutiva. Los valores obtenidos se corrigieron a la intensidad de la banda de cada proteína (p53, Bcl2 y Bax) en células control sin tratamiento considerada ésta como 100%.

Figura 7. Niveles de expresión de proteínas quinasas intracelulares en células leucémicas humanas después del tratamiento con la *FSAGL* diluido al 15% durante 19 horas. Tras el tratamiento, se realizó “Western-blot”. Las autorradiografías se escanearon. Las intensidades de las bandas correspondientes a Akt, pAkt, Erk, p-Erk se corrigieron respecto a la intensidad de la banda de actina como un control de expresión constitutiva. Los valores obtenidos se corrigieron a la intensidad de la banda de cada proteína (p53, Bcl2 y Bax) en células control sin tratamiento considerada ésta como 100%.

Tabla 1. Resultados del análisis elemental de la *FSAGL*. Contenido porcentual de cada elemento presente en la *FSAGL* del cuerpo fructífero de *G. lucidum* analizado enunLECO “CHNS-932”.

Modo de realización

Métodos

Cultivo de *Ganoderma lucidum*

La cepa del hongo patógeno facultativo filamentoso *G. lucidum*, se aisló a partir de un carpóforo que fructificaba en raíces de *Quercus ilex* (encina) en Cáceres (España). El cultivo se realizó a partir de un pequeño fragmento del contexto del carpóforo, en medio sólido Agar-Malta (MA) 33,6 g/l, que generó el micelio para más tarde cultivarlo y repicarlo, tanto en medio sólido como en medio líquido (malta, 10%).

Para generar las fructificaciones de *G. lucidum*, se deben utilizar sustratos sólidos lignocelulósicos [49], adecuadamente hidratados y esterilizados, para después inocularlos *in vitro* con micelio de *G. lucidum* e incubarlos hasta la total colonización miceliar. Con posterioridad, el bloque miceliar origina las fructificaciones *ex vitro*, en 1-2 meses, en condiciones controladas ambientales.

Células DA-1 de linfoma de ratón

DA-1 es una línea celular dependiente de IL-3 originada de un linfoma de ratón [50]. Diferentes estudios realizados sobre estas células indican que mueren por apoptosis en ausencia del factor de crecimiento IL-3 en un mecanismo dependiente de p53. Sin embargo no requiere aumento en la expresión de esta proteína pro-apoptótica ya que el no estar sobreexpresada sólo repercute en un retraso de la muerte celular [51]. Constituye un buen modelo de estudio en células tumorales que sufren apoptosis bajo determinados agentes antitumorales, como etopósido e hidroxiurea [52] permitiéndonos profundizar en el conocimiento de las rutas que intervienen en estos mecanismos. Estas células se mantuvieron en cultivo a 37°C con 5% CO₂, en medio IMDM (Gibco-Life Technologies) con 10% SFB, 2 mM L-glutamina, 0,025 mM β -mercaptoetanol y 5% de medio condicionado de WEHI-3B como fuente de interleuquina 3. La línea celular WEHI-3B se empleó como fuente productora de medio condicionado con IL-3, necesario para la supervivencia de las células DA-1. Se extrajo su medio sobrenadante por centrifugación a 1200 rpm, 5 minutos y posterior filtración. A las células DA-1 se añadió 5% de este medio condicionado.

Células de leucemia promielocítica aguda humana NB4

Línea celular humana NB4 de leucemia promielocítica aguda se mantuvieron en cultivo a 37°C y 5% CO₂ en medio RPMI (Gibco-Life Technologies) con suero fetal bovino (SFB) al 10%, penicilina y estreptomycinina 1% y 0,02 mg/ml gentamicina.

ES 2 344 392 A1

Fracción Semipurificada Activa de Ganoderma lucidum (FSAGL)

Se realizó un extracto metanólico de diferentes cultivos de *G. lucidum*. El cuerpo fructífero obtenido de cultivo en medio sólido se disgregó con nitrógeno líquido, y resuspendió a una concentración 50 mg/ml en metanol 10%, permitiendo la extracción con agitación a 4°C por 24 horas. Posteriormente se filtró, se guardó el sobrenadante, y el precipitado se extrajo 2 veces más. Se unieron los sobrenadantes en un matraz y se evaporó el solvente en un rotavapor a 30°C. La muestra o el respectivo extracto metanólico se recuperó resuspendiendo en 9 ml de metanol absoluto.

Cromatografía en Columna de Silicagel

El extracto metanólico obtenido en el apartado anterior se evaporó (4.5 ml) en 0,2 g de silicagel, y se colocó en una columna de silicagel (1x15,5 cm). La columna se eluyó con 3:1:1 butanol: ácido acético: agua, recogiendo fracciones de 0,2 ml, y mediante comparación con el patrón que se obtiene en cromatografía en capa fina (TLC), se seleccionaron las fracciones de interés (aquellas cuyo Rf corresponde a 0,7). Posteriormente, se evaporó el solvente con una bala de nitrógeno, se resuspendió la muestra final (1,6 mg) en 0,01 ml de DMSO y se unieron todas las muestras obtenidas para obtener la FSAGL.

Tratamiento de células DAI

Para el tratamiento de estas células, se incubó 1 ml de células a una concentración $0,5 \times 10^6$ células/ml en placas de 12 pocillos durante 13, 19 y 24 horas con 13 μ l de la FSAGL. Se utilizó un cultivo de células sin tratamiento como control negativo y células tratadas con 13 μ l de DMSO como control de la acción del solvente utilizado para la FSAGL.

Tratamiento de células NB4

Se incubó 1 ml de células a una concentración $0,5 \times 10^6$ células/ml en placas de 12 pocillos durante un período de 19 horas, con 5 μ l o 2 μ l de la FSAGL (cuando se estudió el efecto de dosis) utilizando como control negativo células sin tratamiento y tratadas con 5 μ l de DMSO como control del solvente utilizado para la FSAGL.

Viabilidad celular. Tinción con Ioduro de Propidio

La integridad de la membrana plasmática se ve comprometida en las células necróticas, de manera que al teñirlas con ioduro de propidio (IP), éste puede acceder al núcleo celular y unirse al DNA, permitiendo de esta manera cuantificar la viabilidad celular por su impermeabilidad a ioduro de propidio. Para este ensayo se tomaron $0,3 \times 10^6$ células tratadas en diferentes condiciones, se lavaron con PBS, y se resuspendieron en 500 μ l de PBS y antes de observar en el citómetro de flujo se agregó ioduro de propidio a una concentración final 5 μ g/ml. La fluorescencia emitida fue analizada en un FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA) y para procesar los datos en el laboratorio se utilizó el programa WinMDI 2.8 (Trotter Josep).

Cuantificación de ADN subdiploide

La tinción con IP proporciona información sobre el contenido de ADN, dado que es un agente intercalante de ADN que permite distinguir y cuantificar, mediante la utilización de un citómetro de flujo, la distribución de las células a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular, y contabilizar las células apoptóticas según la aparición de ADN de bajo peso molecular, característico de las células apoptóticas. Así realizamos tinciones con ioduro de propidio sobre células tratadas, para determinar si los tratamientos inducían apoptosis. Para ello, se lavaron $0,3 \times 10^6$ células tratadas con PBS y se resuspendieron en 500 μ l de PBS con 0,1% v/v Nonidet P-40 y 0,5 mg/mL de ribonucleasa A. Se incubaron durante 30 minutos para permeabilizar la membrana celular y se teñieron con ioduro de propidio a una concentración final 50 μ g/ml. Se analizó la fluorescencia emitida por el ioduro de propidio, mediante citometría de flujo utilizando un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA) y para el análisis de los datos se utilizó el programa WinMDI 2.8.

Ensayos de anexina V-FITC. Exposición de Fosfatidil serina

Durante las fases iniciales de la apoptosis se producen cambios en la superficie celular, uno de éstos es la alteración de la membrana plasmática, donde se produce una translocación de la fosfatidilserina de la cara interna a la cara externa de la membrana. La anexina-V es una proteína con alta afinidad a la fosfatidilserina que se utiliza para diferenciar las células apoptóticas de las células viables donde la fosfatidilserina se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática. La tinción simultánea con IP y anexina-V permite discriminar las células apoptóticas de las células viables y cuantificarlas mediante citometría de flujo [53]. La determinación de la exposición de fosfatidil serina en células tratadas se determinó utilizando el test de Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit de Calbiochem. Para este ensayo se tomaron $0,3 \times 10^6$ células tratadas, se centrifugaron a 1500 rpm por 3 minutos, e incubaron 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente en 500 μ l de PBS, con 10 ml de "Reactivo de unión" y 1,25 μ l de anexina V-FITC. Se centrifugó nuevamente a 2.300 rpm durante 5 minutos para retirar el sobrenadante y resuspender en 500 μ l de tampón de unión en PBS (Tampón de unión 5X diluido en PBS). Se añadieron 10 μ l de IP e inmediatamente se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA) y los datos se analizaron con el programa WinMDI 2.8.

ES 2 344 392 A1

Preparación de extractos de proteínas para análisis de “Western-blot”

Para el tratamiento de células DA1 se incubaron 10 ml de células a una concentración $0,5 \times 10^6$ células/ml durante 13, 19 y 24 horas en botellas pequeñas de 40 ml con 130 μ l de FSAGL utilizando células sin tratamiento como control negativo.

Para el tratamiento de células NB4 se incubaron 10 ml de células a una concentración $0,5 \times 10^6$ células/ml en placas P-100 durante 19 horas. Se trataron con 20 μ l de la FSAGL utilizándose células sin tratamiento como control negativo.

10 *Extracción de proteínas*

Después de su respectivo tratamiento se levantaron de $10-5 \times 10^6$ de células tratadas y células control sin tratamiento de la placa y se Usaron incubando durante 30 minutos a 4°C en 100 μ l de tampón de lisis (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Nonidet-P40 0,5%, 1 mM PMSF, 50 mM Tris pH 8,0). Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se sonicaron durante 20 segundos a un ciclo del 50% y, posteriormente, se centrifugaron a 14.000 rpm, 5 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante que contienen las proteínas para su posterior análisis.

Cuantificación de proteínas

20 La concentración de proteínas en los extractos se determinó mediante el método de Bradford [54] de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Bio-Rad Protein Assay). Para ello se realizó una curva patrón con concentraciones crecientes de BSA. A 1 μ l de muestra y a las soluciones patrón se añadió 200 μ l de solución Bradford 1X y fueron incubadas con el reactivo por 5 minutos a temperatura ambiente, se midió la densidad óptica a 595 nm, utilizando un espectrofotómetro Elx800 Bio-Tek Instruments, INC y las concentraciones de proteína de cada muestra fueron determinadas por la comparación con la curva estándar de BSA.

Electroforesis

30 Se aplicaron 40 μ g de proteínas por muestra en la electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida [55]. Las muestras de proteínas se prepararon con tampón de carga 5X (Tris/HCl 300 mM pH 6,8; Glicerol 50%, SDS 10% y Azul bromofenol 10%). Se llevaron las muestras a ebullición a 95°C durante 5 minutos. Las proteínas presentes en cada muestra se resolvieron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12.5% en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE). La electroforesis se realizó en tampón Tris 25 mM pH 8,3, Glicina 192 mM y SDS 0,1%. Las proteínas se identificaron utilizando marcadores estándar preteñidos de bajo peso molecular “Precisión Plus Protein™ Standards” (BioRad).

“Western Blot”

40 Tras la electroforesis, el gel se equilibró en tampón de transferencia (Tris 20 mM, Glicina 150 mM y Metanol 20%) durante 5 minutos y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por transferencia en húmedo durante 2 horas a 100 V. Después de la transferencia la membrana se lavó en tampón TBS-T (50 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,06% Tween pH 7,2) una vez lavada se bloqueó con una solución de leche desnatada al 5% en TBS-T durante 1 hora. Posteriormente se incubó la membrana toda la noche a 4°C con diferentes anticuerpos primarios. Se utilizó según corresponda un policlonal anti-ratón o anti-conejo ambos conjugados a peroxidasa (Promega), como anticuerpo secundario diluido 1:4.000 en 1% leche TBS-T. Para el control de carga se realizó un “Stripping” con el sistema Re-Blot Plus (Chemicon) a las membranas y después de bloqueo se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-actina 1:4.000 (Sigma).

Los anticuerpos primarios empleados fueron:

50 Quinasas:

Akt1/2/3 (H-136) 1:400 (Santa Cruz Biotechnology) cat.: sc-8312

55 p-Akt 1/2/3 (Ser 437) 1:400 (Santa Cruz Biotechnology) cat.: sc-7985-R

Erk1/2 1:3000 (Santa Cruz Biotechnology) cat.: sc-154

60 p-Erk (Tyr204) 1:200 (Santa Cruz Biotechnology) cat.: sc-7383

Proteínas pro y antiapoptóticas:

P53 (Ab-1) 1:50 (Calbiochem) cat.: OP03

65 Bcl-2 (C-2) 1:200 (Santa Cruz Biotechnology) cat.: sc-7382

Bax (B-9) 1:100 (Santa Cruz Biotechnology) cat.: sc-7480

ES 2 344 392 A1

El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia con el sistema de análisis de “Western-blot” ECL (Amersham), exponiendo una película fotográfica o colocando las membranas directamente en equipo Lumi-Imager F1 (Roche) y tomando la foto con el programa Lumia32 Analyst 3.1. La intensidad de la señal emitida por las proteínas se determinó utilizando el programa UN-SCAN-IT gel 6.1.

5

Análisis elemental

El análisis elemental de un producto orgánico consiste en la determinación de la composición atómica. La determinación se basa en la combustión completa de la muestra, en condiciones óptimas (950 a 1300°C y atmósfera de oxígeno puro), para convertir los elementos antes mencionados en gases simples (anhídrido carbónico, nitrógeno, agua y anhídrido sulfuroso). Estos gases, después de ser separados con distintas técnicas (columna cromatográfica, infrarrojos) según el equipo utilizado, son medidos y procesados teniendo en consideración el peso de la muestra y los datos proporcionados por una muestra patrón obteniéndose de este modo el contenido porcentual de cada elemento en la muestra. El análisis elemental de la *FSAGL* fue realizado en un analizador elemental LECO “CHNS-932” del Servicio de espectrometría de masas, análisis elemental y técnicas complementarias de la Universidad de Alcalá. La cantidad de muestra utilizada fue de 1 mg aproximadamente.

15

Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron repetidos tres o cuatro veces, se representó gráficamente las medias y el error estándar de la media. Para determinar las diferencias estadísticas entre el control y el experimento se usó la prueba de T de Student considerando significativo $P < 0.01$. Para todos los cálculos se usó el programa Microsoft Excel (Office 97).

20

Ejemplo 1

25

Fracción Semipurificada Activa de Ganoderma lucidum (FSAGL)

Se obtuvo un extracto metanólico de basidiocarpos de *G. lucidum*. Los cuerpos fructíferos cultivados se disgregaron en N_2 extrayéndose en metanol 10% a 4°C durante 24 horas. Tras recoger el sobrenadante, el sedimento se reextrajo evaporando la fracción obtenida. Esta se cromatografió en columna de gel de sílice utilizando como eluyente 3:1:1 butanol: ácido acético: agua recogiendo las fracciones correspondiente a un R_f de 0,74. De éstas se evaporó el solvente resuspendiéndose en DMSO para obtener la fracción semipurificada activa de *G. lucidum*.

35

Ejemplo 2

Viabilidad de células DA-1 tratadas con la FSAGL

Se ha estudiado la viabilidad de las células de linfoma de ratón DA-1, cuantificando por citometría de flujo la impermeabilidad de las células a yoduro de propidio (IP), un fluoróforo intercalante de ADN capaz de incorporarse en las células con la membrana dañada marcando así los núcleos de las células y emitiendo fluorescencia tras ser excitados con la longitud de onda adecuada.

40

Se determinó la viabilidad en células DA-1 tratadas con la *FSAGL* (sin diluir) durante períodos de 13, 19 y 24 horas. La figura 1 muestra el porcentaje de viabilidad celular medido como impermeabilidad a yoduro de propidio tras tratamiento con la *FSAGL* durante 13, 19 y 24 horas (Los resultados representan la media de tres experimentos diferentes \pm el error estándar de la media. Diferencia significativa * ($p < 0,05$) prueba t-Student). En esta figura 1 se observa como de tratamiento con la *FSAGL* disminuye la viabilidad de las células DA-1 respecto al control negativo y este efecto es dependiente del tiempo de tratamiento. En el tratamiento durante 24 horas la viabilidad es de 40%.

45

50

Ejemplo 3

Fragmentación de ADN inducida por la FSAGL en células DA-1

55

Una característica presente frecuentemente en las células en apoptosis es la ruptura o fragmentación del ADN. Cuando esto ocurre el contenido en ADN disminuye y como consecuencia es detectado como células con baja tinción para el ADN en un nuevo pico sub- G_0/G_1 de contenido de ADN subdiploide ($< 2n$). La Figura 2. Fragmentación de ADN medida como cantidad de ADN subdiploide en células DA-1 tratadas con la *FSAGL*.

60

En la figura 2 se observa el incremento en porcentaje de ADN subdiploide de células DA-1 tratadas con la *FSAGL* durante 13, 19 y 24 horas comparado con las células control (sin tratar) representándose la media de tres experimentos \pm error estándar de la media [Diferencia significativa * ($p < 0,05$) prueba t-Student]. Los niveles de ADN subdiploide son mayores en los tratamientos durante 24 horas mostrando valores del 20% en tratamiento a 19 horas.

65

Ejemplo 4

Expresión de factores apoptóticos y quinasas intracelulares

5 Los resultados de un experimento representativo de “Western-blot” mostrando los niveles de expresión de proteína pro- y anti-apoptóticas en las células DA-1 tratadas con la *FSAGL* se muestran en la Figura 3 (Los valores están corregidos con la intensidad de la banda de actina y el porcentaje de expresión de proteína está también corregido respecto a su intensidad en el control de células sin tratamiento considerado el 100%). Después del tratamiento con la *FSAGL* se observa un aumento en la proteína p53, después de 13 y 19 horas un 148% y 308%, respectivamente
 10 (figura 3). A 24 horas de tratamiento, el nivel de p53 fue del 152% del nivel de expresión p53 en células de control (figura 3). Los niveles de Bcl2 aumentan a 19 horas de tratamiento. Los niveles de Akt permanecen casi constantes durante el tratamiento (figura 3). Este es también el caso para su forma fosforilada aunque los niveles de pAkt fueran inferiores a los de células no tratadas (el 61%, el 60% y el 65% en tratamientos con la *FSAGL* para 13, 19 y 24 horas, respectivamente).
 15

Ejemplo 5

Viabilidad en células NB4 tratadas con la FSAGL

20 Para determinar la viabilidad de células NB4 tratadas con diferentes concentraciones de la *FSAGL*, se utilizó la medida de impermeabilidad celular a IP. Se muestra el porcentaje la impermeabilidad a IP en una población de células NB4 en crecimiento (control) y tratadas con la *FSAGL* sin diluir y diluido al 15% y 40% durante 19 horas (Figura 4). El porcentaje de células vivas en el control es del 98% y éste disminuye a 92% y 68% al tratar las células con la *FSAGL*
 25 diluido al 15% y 40% respectivamente (Figura 4). La viabilidad de células NB4 tratadas con la *FSAGL* se determinó también por la fluorescencia de anexina V-FITC. La población de células vivas es negativa para anexina V-FITC y negativa para la tinción con IP. Los resultados son muy similares a los obtenidos anteriormente, en células control la viabilidad es de un 90%, ésta disminuye tras el tratamiento con la *FSAGL* diluido al 15% a 66% y al aumentar la concentración de la *FSAGL* al 40% la viabilidad disminuye aun más hasta un 51% (figura 4). La figura 4 muestra que
 30 los tratamientos disminuyen la viabilidad respecto al control y que esta disminución es dependiente de dosis ya que disminuye más al aumentar la concentración de la *FSAGL* 15% a 40%. Los valores mostrados en la figura 4 representan las medias de tres experimentos diferentes \pm el error estándar de la media. Diferencia significativa * ($p < 0,05$) prueba t-Student.
 35

Ejemplo 6

Apoptosis en células NB4 tratadas con la FSAGL de Ganoderma lucidum

40 Tras tratamiento de células NB4 leucémicas humanas con la *FSAGL* (sin diluir y diluido al 15% y 40% de concentración, respectivamente) durante 19 horas se observa que el porcentaje de ADN subdiploide aumenta tras el tratamiento con la *FSAGL* diluido al 15% de 4% en células control a 35% y al tratar con la *FSAGL* más concentrado (40% de la concentración de la fracción inicial) aumentó el porcentaje de ADN subdiploide a 50% (figura 5).

45 Para corroborar que estos valores representan muerte celular por apoptosis, se procedió a estudiar la exposición de fosfatidilserina en la membrana externa celular por el método anexina V-FITC que determina cuantitativamente el porcentaje de células que están destinadas a apoptosis. La apoptosis celular se midió como inducción de fragmentación de ADN (porcentaje de ADN subdiploide) y el conteo de células con alta unión de anexina V-FITC (células anexina positivas) de cultivos control (sin tratamiento) y tratadas con la *FSAGL* sin diluir y diluida al 15% y 40% durante 19
 50 horas (Figura 5).

En la figura 5 se muestra que en las células control hay un 6% de células anexina positivas, mientras que después del tratamiento con la *FSAGL* diluido al 15% este aumenta a 31% y al aumentar la concentración del tratamiento con la *FSAGL* diluido a 40% se llega a obtener un 45% de células anexina positivas. Con lo que se muestra que al igual
 55 que ocurre en la viabilidad, el efecto del tratamiento de células NB4 con la *FSAGL* es dependiente de la dosis. Los valores mostrados representan las medias de tres experimentos diferentes \pm el error estándar de la media. Diferencia significativa * ($p < 0,05$) prueba t-Student.

60 Ejemplo 7

Expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en células NB4 tratadas con 15% de la FSAGL

65 La apoptosis es un tipo de muerte celular genéticamente programada. La expresión de oncogenes y de factores apoptóticos como el bcl-2, y la inactivación del gen supresor tumoral p53, reducen la susceptibilidad de las células para entrar en un programa de apoptosis, mientras que la expresión de Bax la aumenta.

Todas estas proteínas están relacionadas con el proceso de apoptosis, por lo que se estudió su expresión en la apoptosis inducida en las células NB4 por la *FSAGL*. Los cambios en los niveles de expresión de estas proteínas como consecuencia del tratamiento se determinaron por Western-blot de proteínas obtenidas de células NB4 tratadas con la *FSAGL* diluido al 15% durante 19 horas.

5 Para ello se utilizaron los anticuerpos primarios descritos en el apartado correspondiente a Materiales y Métodos. Los valores se corrigieron con la expresión de actina y el porcentaje de expresión de la proteína se relacionó con el nivel del control (intensidad de la banda de la proteína en células sin tratamiento) considerado como el 100%. Las intensidades de las bandas del “Western-blot” correspondientes a p53, Bcl2 y Bax se escanearon, cuantificaron y
10 corrigieron respecto a la intensidad de la banda de actina como un control de expresión constitutiva. Los valores obtenidos se corrigieron a la intensidad de la banda de cada proteína (p53, Bcl2 y Bax) en células control sin tratamiento considerada ésta como 100%.

15 La figura 6 muestra que los niveles de p53 a un 41% disminuyen significativamente, los niveles de Bcl-2 también bajan a un 85% mientras que Bax aumenta ligeramente (112%), en todos los casos respecto al control después del tratamiento de las células NB4 durante 19 horas con la *FSAGL* diluido al 15%.

Ejemplo 8

20 La activación de Akt juega un papel fundamental en prevenir la muerte celular por apoptosis, ya que fosforila e inactiva muchas proteínas implicadas en apoptosis [56]. Y su actividad se ha visto unida a la expresión del factor de transcripción anti-apoptótico NFκB. Otra vía de señalización que conduce a la supervivencia celular es la vía de las Ras/Raf/MAPK. En esta vía Erk puede fosforilar varios factores de transcripción, explicando su capacidad de activar
25 la transcripción de ciertos genes y varias proteínas quinasas con efecto inhibitor de la apoptosis.

El efecto del tratamiento con la *FSAGL* sobre las quinasas, se observa en la figura 7. Tras el tratamiento, se realizó “Western-blot”. Las autorradiografías se escanearon. Las intensidades de las bandas correspondientes a Akt, pAkt, Erk, p-Erk se corrigieron respecto a la intensidad de la banda de actina como un control de expresión constitutiva.
30 Los valores obtenidos se corrigieron a la intensidad de la banda de cada proteína (p53, Bcl2 y Bax) en células control sin tratamiento considerada ésta como 100%. Después del tratamiento Akt, Erk y sus formas fosforiladas disminuyen su intensidad respecto al control. Los niveles de Akt disminuyen en torno a 69%, mientras que su forma fosforilada alcanza el 50% quizás como consecuencia de la falta de Akt. Esta disminución no es tan marcada en el caso de Erk y p-Erk que disminuyen a un 86% y 79% respectivamente (figura 7).

35

Ejemplo 9

40 Para determinar la composición elemental de la *FSAGL* del cuerpo fructífero de *G. lucidum* tanto cualitativa como cuantitativamente; se realizó el análisis de contenido porcentual de elementos en un analizador en un LECO analizador “CHNS-932” (Tabla 1). Los resultados del análisis de los elementos que componen la *FSAGL* del cuerpo fructífero muestran que ésta está constituida principalmente por carbono (en torno a 50%), seguido de oxígeno (32,3%) y, en menor proporción, hidrógeno y nitrógeno como se muestra en la tabla 1.

45

Bibliografía

- 1.- **Bigby M.** (2003). “Newer antifungal agents”. *J. Am. Acad. Dermatol.* 49:357-358.
- 50 2.- **Chang S.T.** (1999). “Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21 st century: nongreen revolution”. *Int. J. Med. Mushrooms* 1:1-8.
- 3.- **Wasser S.P. & Weis A.L.** (1999). “Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective”. *Crit. Rev. Immunol.* 19(1):65-96. Review.
- 55 4.- **Reshetnikov S.V., Wasser S.P. & Tan K.K.** (2001). “Higher basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides”. *Int. J. Med. Mushr.* :61-394.
- 5.- **Waser S.P.** (2002). “Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides”.
60 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60(3):258-74.
- 6.- **Boh B., Berovic M., Wraber B., Hodzar D., Habijan J., Pohleven F. & Zore I.** (2004). “*Ganoderma lucidum* and *Ganoderma applanatum* from slovenian habitats: Cultivation, Isolation, and Testing of active compounds”. *Int. J. Med. Mushrooms* 6:15-32.
- 65 7.- **Wasser S. P.** (2002). “Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:258-274.

ES 2 344 392 A1

- 8.- **Wasser S. P. & Weis A. L.** (1999). "Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective" *Crit. Rev. Immunol.* 19:65-96.
- 9.- **Oh H., Swenson D.C., Gloer J.B. & Shearer C.A.** (2003). "New bioactive rosigenin analogues and aromatic polyketide metabolites from the freshwater aquatic fungus *Massarina tunicata*". *J. Nat. Prod.* 66(1):73-79.
- 10.- **Reina M., Orihuela J.C., González-Coloma A., de Inés C., de la Cruz M., González del Val A., Torno J.R. & Fraga B.M.** (2004). "Four illudane sesquiterpenes from *Coprinopsis episcopales*". *Phytochemistry* 65(4):381-385.
- 11.- **Gao, Y., Lan, J., Dai, X., Ye, J. & Zhou, S.** (2004). "A phase I/II study of ling zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.:Fr.) Lloyd (*Aphyllphoromycetidae*) Extract in patients with type II diabetes mellitus". *Int. J. Med. Mushrooms* 6:33-39.
- 12.- **Lee S.Y. & Rhee H. M.** 1990 "Cardiovascular effects of mycelium extract of *Ganoderma lucidum*: Inhibition of sympathetic outflow as a mechanism of its hypotensive action" *Chem. Pharm. Bull* (Tokyo) 38(5): 1359-64.
- 13.- **Yoon S.Y., Eo S.K., Kim Y.S., Lee C.K. & Han S.S.** (1994). "Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics". *Arch. Pharm. Res.* 17(6):438-442.
- 14.- **Yoon S.Y., Eo S.K., Kim Y.S., Lee C.K. & Han S.S.** (1994). "Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics". *Arch. Pharm. Res.* 17(6):438-442.
- 15.- **El-Mekkawy S., Meselhy M.R. & Nakamura N.** (1998). "Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*". *Phytochemistry* 49:1651-1657.
- 16.- **Kashimoto N., Hayama M., Kamiya K. & Watanabe H.** (2006). "Inhibitory effect of a water-soluble extract from the culture medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia on the development of pulmonary adenocarcinoma induced by N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine in Wistar rats". *Oncol Rep.* 16(6): 1181-1187.
- 17.- **Yue G.G., Fung K.P., Tse G.M., Leung P.C. & Lau C.B.** (2006). "Comparative studies of various *Ganoderma* species and their different parts with regard to their antitumor and immunomodulating activities *in vitro*". *J. Altern. Complement. Med.* 12(8):777-789.
- 18.- **Xie J.T., Wang C.Z., Wicks S., Yin J.J., Kong J., Li J., Li Y.C. & Yuan C.S.** (2006). "*Ganoderma lucidum* extract inhibits proliferation of SW 480 human colorectal cancer cells". *Exp. Oncol.* 28(1):25-29.
- 19.- **Jiang J., Slivova V., Valachovicova T., Harvey K. & Sliva D.** (2004). "*Ganoderma lucidum* inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostate cancer cells PC-3". *Int. J. Oncol.* 24(5): 1093-1099.
- 20.- **Stanley G., Harvey K., Slivova V., Jiang J. & Sliva D.** (2005). "*Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-beta1 from prostate cancer cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330(1):46-52.
- 21.- **Sliva D., Labarrere C., Slivova V., Sedlak M., Lloyd F.P. Jr & Ho N.W.** (2002). "*Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells". *Biochem. Biophys Res. Commun.* 298(4):603-612.
- 22.- **Sliva D., Sedlak M., Slivova V., Valachovicova T., Lloyd F.P. Jr & Ho N.W.** (2003). "Biologic activity of spores and dried powder from *Ganoderma lucidum* for the inhibition of highly invasive human breast and prostate cancer cells". *J. Altern. Complement. Med.* 9(4):491-497.
- 23.- **Sliva D.** (2003). "*Ganoderma lucidum* (Reishi) in cancer treatment". *Integr. Cancer Ther.* 2(4):358-364.
- 24.- **Kerr J.F., Wyllie A.H. & Currie A.R.** (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". *Br. J. Cancer* 26(4):239-527. Review.
- 25.- **Cory S. & Adams J. M.** (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch". *Nat. Rev. Cancer* 2:647-656.
- 26.- **Vaux D.L., Cory S. & Adams J.M.** (1988). "bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells". *Nature* 335(6189):440-442.
- 27.- **McDonnell T.J., Deane N., Platt F.M., Nunez G., Jaeger U., McKearn J.P. & Korsmeyer S.J.** (1989). "Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation". *Cell* 57 (1):79-88.
- 28.- **Z.N. Oltvai, C.L. Milliman & S.J. Korsmeyer** (1993), Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death, *Cell* 74 pp. 609-619.

ES 2 344 392 A1

- 29.- **Oltvai Z.N., Milliman C.L. & Korsmeyer S.J.** (1993). "Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death". *Cell* 74(4):609-619.
- 30.- **Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W & Reed JC.** (1993). "Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes". *Cancer Res.* 53(19):4701-4714.
- 31.- **Merry D.E. & Korsmeyer S.J.** (1997). "Bcl-2 gene family in the nervous system". *Ann. Rev. Neurosci.* 20:245-267.
- 32.- **Hsu Y.T., Wolter K.G. & Youle R.J.** (1997). "Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(8):3668-3672.
- 33.- **Gross A., Jockel J., Wei M.C. & Korsmeyer S.J.** (1998). "Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis". *EMBO J.* 17(14):3878-3885.
- 34.- **Zhang H., Heim J. & Meyhack B.** (1998). "Redistribution of Bax from cytosol to membranes is induced by apoptotic stimuli and is an early step in the apoptotic pathway". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251(2):454-459.
- 35.- **Antonsson B., Montessuit S., Sánchez B. & Martinou J.C.** (2001). "Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells". *J. Biol. Chem.* 276(15): 11615-11623.
- 36.- **Nechushtan A., Smith C.L., Lamensdorf I., Yoon S.H. & Youle R.J.** (2001). "Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis". *J Cell Biol.* 153(6): 1265-1276.
- 37.- **Mikhailov V., Mikhailova M., Pulkrabek D. J., Dong Z., Venkatachalam M. A. & Saikumar P.** (2001). "Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane". *J. Biol. Chem.* 276:18361-18374.
- 38.- **Krajewski S., Mai J. K., Krajewska M., Sikorska M., Mossakowski M. J. & Reed J. C.** (1995). "Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia". *J. Neurosci.* 15:6364-6376.
- 39.- **Ghribi O., Hermán M. M., Spaulding N. K. & Savory J.** (2002). "Lithium inhibits aluminum-induced apoptosis in rabbit hippocampus, by preventing cytochrome c translocation, Bcl-2 decrease, Bax elevation and caspase-3 activation". *J. Neurochem* 82:137-145.
- 40.- **Krajewski S., Mai J. K., Krajewska M., Sikorska M., Mossakowski M. J. & Reed J. C.** (1995). "Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia". *J. Neurosci.* 15:6364-6376
- 41.- **Ghribi O., Hermán M. M., Spaulding N. K. & Savory J.** (2002). "Lithium inhibits aluminum-induced apoptosis in rabbit hippocampus, by preventing cytochrome c translocation, Bcl-2 decrease, Bax elevation and caspase-3 activation". *J. Neurochem* 82:137-145.
- 42.- **Korhonen L., Belluardo, N., Mudo, G. & Lindholm, D.** (2003). "Increase in Bcl-2 phosphorylation and reduced levels of BH3-only Bcl-2 family proteins in kainic acid-mediated neuronal death in the rat brain". *Eur. J. Neurosc.* 18:1121-1134.
- 43.- **Vila M. & Przedborski S.** (2003). "Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases". *Nat. Rev. Neurosci.* 4:365-375; **Danial N. N. & Korsmeyer S. J.** (2004). "Cell death: critical control points". *Cell* 116, 205-219.
- 44.- **Schaeffer & Weber** (1999). "Mitogen-Activated Protein Kinases Specific Messages from ubiquitous messengers" *Mol. Cell. Biology* 2435-2444.
- 45.- **Pearson, G, Robinson, F, Gibson, T. B., Xu, B-E X. Karandikar, M, Berman, K & Cobb, M. H.** (2001). *Endocrine Rev* 22(2), 153-183.
- 46.- **Peyssonnaud, C. & Eychene, A.** (2001) "The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation". *Biol. Cell* 93 (1-2):53-62.
- 47.- **Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., & Greenberg, M.E.** (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270(5240): 1326-31.
- 48.- **Soong, G., Ouyang, G. & Bao, S.** (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell Mol. Med.* 9(1):59-71.
- 49.- **Chang, S.-T. & Miles, P.** (2004). Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. *CRC Press.*

ES 2 344 392 A1

50.- **Ihle J.N.** (1985) "Biochemical and biological properties of interleukin-3: a lymphokine mediating the differentiation of a lineage of cells that includes prothymocytes and mastlike cells" *Contemp. Top. Mol. Immunol.* 10:93-119.

5 51.- **Gotlieb E., Haffner, R., von Rüden, T., Wagner, E.F. & Oren, M.** (1994) "Down-regulation of wild-type p53 activity interferes with apoptosis of IL-3-dependent hematopoietic cells following IL-3 withdrawal" *EMBO J.* 13(6): 1368-74.

10 52.- **Olmos G., Prieto, A., Herráez, A., Tejedor, M.C., Alvarez-Mon, M. & Diez, J.C.** (2005) "Involvement of Bax, Bcl-2 and caspase 3 in hydroxyurea- or etoposide-induced apoptosis of mouse interleukin-3-dependent lymphoma cells". *Anticancer Res.* 25(2A):999-1007.

15 53.- **Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutenlingsperger, C.** (1995) "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V". *J. Immunol. Methods* 184:39-51.

54.- **Bradford M.M.** (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding" *Anal. Biochem.* 72:248-254.

20 55.- **Laemmli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:658-85.

56.- **Vincent A.M. & Feldman E. L.** 2002 "Control of cell survival by IGF signaling pathways" *Growth Horm. IGF Res.* 12(4): 193-7.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de obtención de una Fracción Semipurificada Activa de *Ganoderma lucidum* (FSAGL) que se compone de dos etapas de extracción y aislamiento partiendo de un extracto de cuerpos fructíferos cultivados de *G. lucidum*:

10 - Una primera etapa de extracción con metanol de cultivos de *G. lucidum* que consiste en disgregación del cuerpo fructífero, resuspensión del material disgregado a una concentración 50 mg/ml en metanol 10%, extracción durante 24 horas, evaporación del solvente, resuspensión del extracto metanólico en 9 ml de metanol absoluto.

15 - Una segunda etapa de aislamiento de la FSAGL metanol de cultivos de *G. lucidum* que consiste en evaporación del extracto metanólico en silicagel, aplicación en columna, elución con 3:1:1 butanol: ácido acético: agua, selección de fracciones con Rf correspondiendo a 0,74, evaporación del solvente, resuspensión de la muestra de cada fracción en 0,01 ml de DMSO, mezcla de las muestras de fracciones de Rf 0,74 para obtener la FSAGL.

20 2. La FSAGL obtenida según la reivindicación 1 **caracterizada** por presentar una composición elemental con un contenido en Carbono, Oxígeno, Hidrógeno y Nitrógeno de 49,6%, 32,3%, 7,1% y 2,9% no conteniendo Azufre y por un Rf de 0.74 en cromatografía en columna de silicagel eluyendo con 3:1:1 butanol: ácido acético: agua.

3. Uso de la FSAGL obtenida según la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

25 4. Uso de la FSAGL obtenida según la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de linfomas.

5. Uso de la FSAGL obtenida según la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de leucemias.

30

35

40

45

50

55

60

65

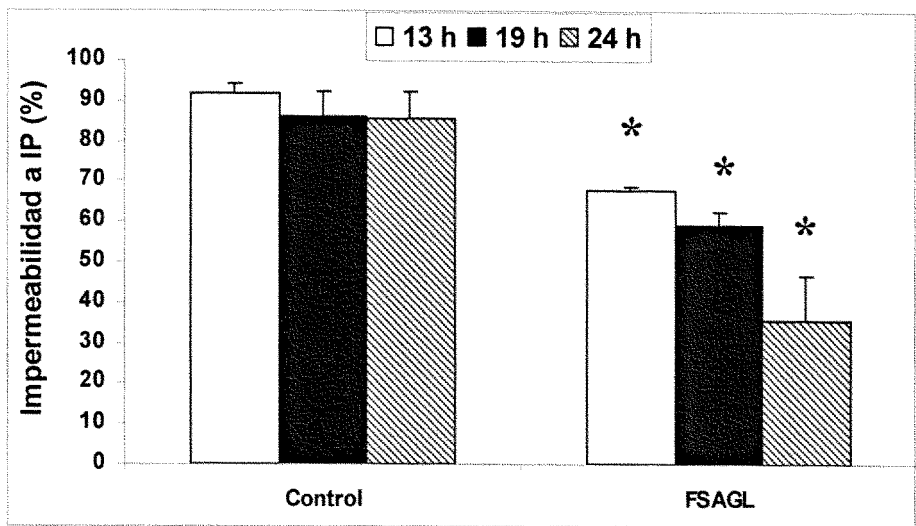


Figura 1

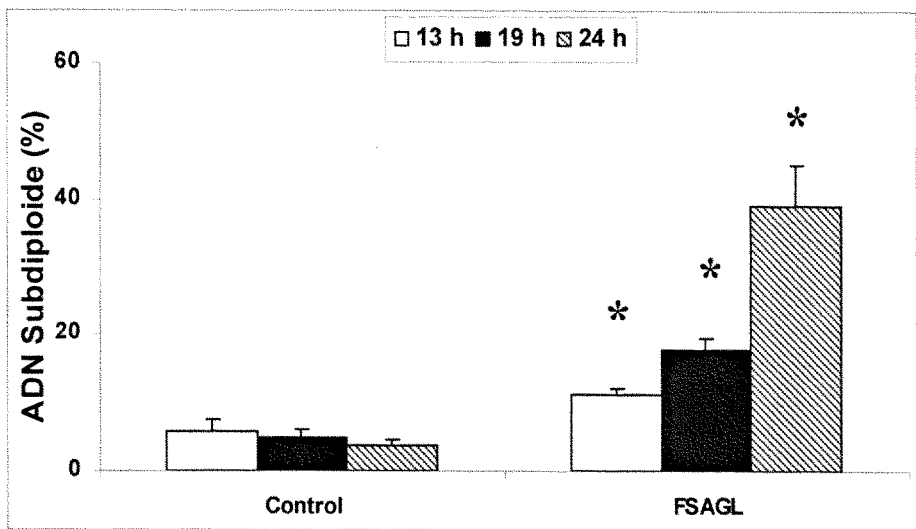


Figura 2

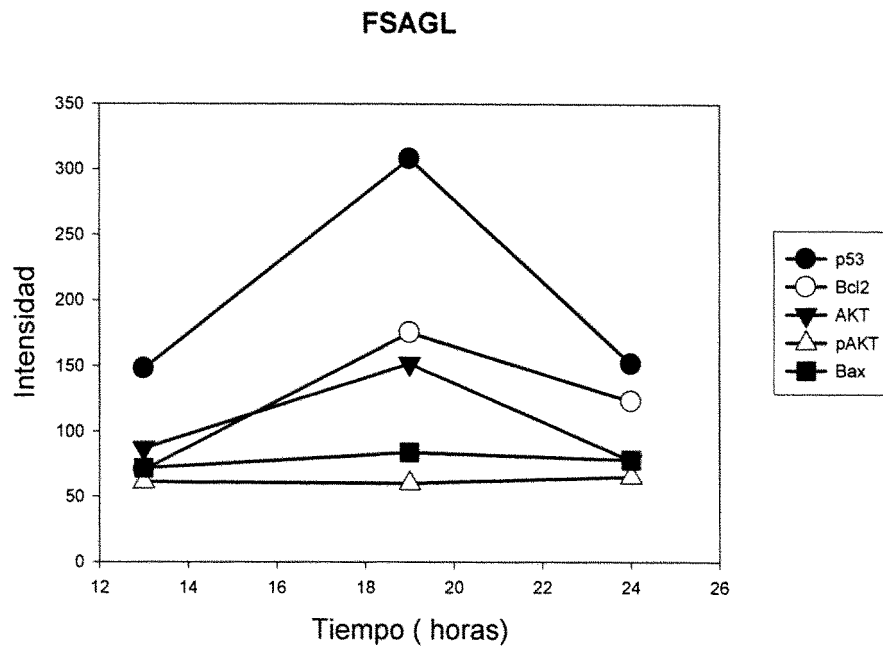


Figura 3

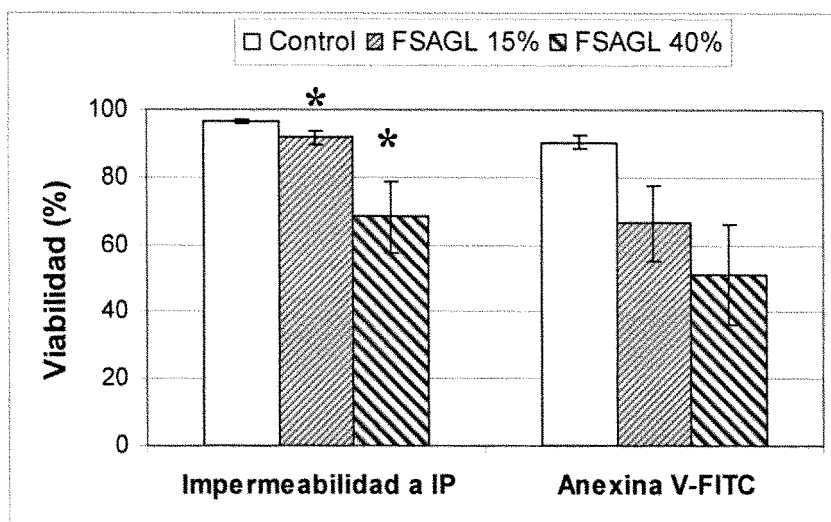


Figura 4

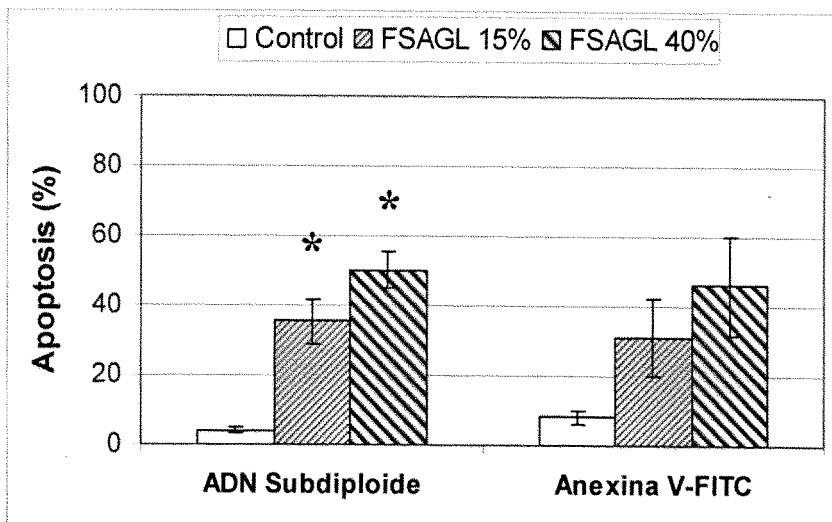


Figura 5

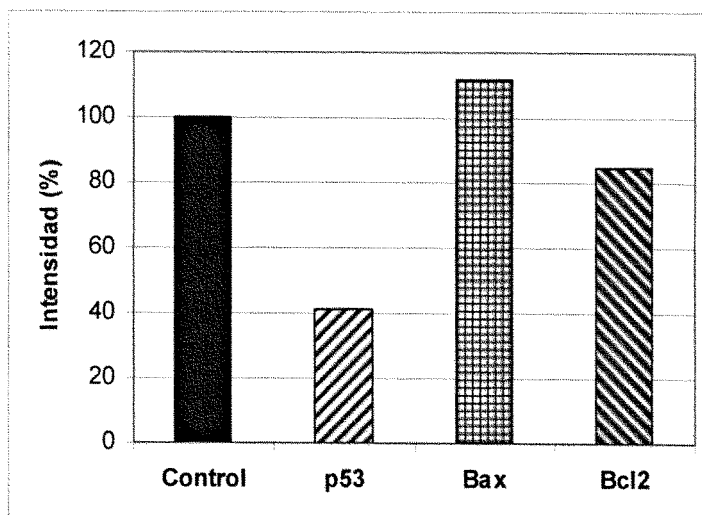


Figura 6

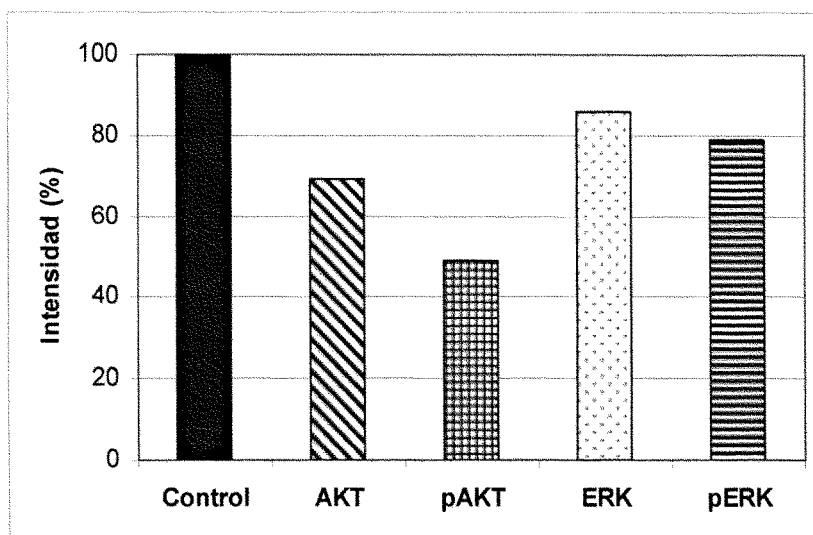


Figura 7

Elemento	Porcentaje (%)
C	49,6
O	32,3
H	7,1
N	2,9
S	No contiene

Tabla 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 344 392

② Nº de solicitud: 200802653

③ Fecha de presentación de la solicitud: 18.09.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 36/074** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MÜLLER CI et al. 'Ganoderma lucidum causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells'. Leukemia Research. 2006. Vol. 30, páginas 841-848, todo el documento.	1-5
A	SHEENA N et al. 'Antibacterial activity of three macrofungi, Ganoderma lucidum, Navesporus floccosa and Phellinus rimosus occurring in South India'. Pharmaceutical Biology. 2003. Vol. 41, páginas 564-56, especialmente página 565.	1
A	ZAIDMAN BZ et al. 'Androgen receptor-dependent and -independent mechanisms mediate Ganoderma lucidum activities in LNCaP prostate cancer cells'. International Journal of Oncology. 2007. Vol. 31, páginas 959-967, todo el documento.	1-5
A	HUIE CW et al. 'Chromatographyc and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components'. Journal of Chromatography. 2004. Vol. 812, páginas 241-257, todo el documento.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

04.08.2010

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, USPTO PATENT DATABASE, INVENES, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, SCIENCEDIRECT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.08.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-5	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-5	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MÜLLER CI et al. Leukemia Research. 2006. Vol. 30, páginas 841-848.	2006
D02	SHEENA N et al. Pharmaceutical Biology. 2003. Vol. 41, páginas 564-566, especialmente página 565.	2003
D03	ZAIDMAN BZ et al. International Journal of Oncology. 2007. Vol. 31, páginas 959-967.	2007
D04	HUIE CW et al. Journal of Chromatography. 2004. Vol. 812, páginas 241-257.	2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga un procedimiento de obtención de una fracción semipurificada activa de *Ganoderma lucidum* (FSAGL) en dos etapas: una primera etapa de extracción con metanol y otra de aislamiento de la fracción. La primera etapa consiste en una extracción por disgregación del cuerpo fructífero en metanol 10%, extrayendo durante 24 horas, evaporando el solvente y resuspendiendo el extracto metanólico en 9 ml de metanol absoluto. La etapa de aislamiento consiste en la evaporación del extracto anterior en silicagel, aplicación en columna, elución con butanol: ácido acético: agua (3:1:1) y selección de fracciones que presentan un Rf de 0,74, evaporación del solvente y resuspensión de la muestra final en DMSO (reivindicación 1); la FSAGL obtenida presenta una composición elemental de 49,6% C, 32,3% O, 7,1% H y 2,9% N (reivindicación 2). Se refiere también al uso de esta fracción para fabricación de un medicamento para tratamiento del cáncer, incluyendo linfomas y leucemias (reivindicaciones 3-5).

El documento D01 divulga la actividad antiproliferativa, frente a 26 líneas celulares tumorales humanas, de un extracto acuoso de *Ganoderma lucidum*, que contiene 0,15% de ácido ganodérico C2, obtenido por HPLC, eluyendo con ácido acético y acetonitrilo, a un tiempo de retención de 32,9 minutos (ver todo el documento).

El documento D02 divulga la actividad antibacteriana de extractos de hongos, entre los que se encuentra *Ganoderma lucidum*, en MeOH, con una extracción previa con éter de petróleo y TLC de fase móvil empleando butanol, ácido acético y agua (ver página 565, columna 2).

El documento D03 divulga la actividad antiproliferativa, frente a un cultivo de células LNCaP (cáncer de próstata humano), de un extracto de acetato de etilo de *Ganoderma lucidum*, fraccionado en columna de silicagel, eluyendo con hexano, acetato de etilo y metanol (ver todo el documento).

El documento D04 divulga procedimientos de extracción de triterpenos y polisacáridos del cuerpo fructífero y del micelio de *Ganoderma* spp, empleando métodos de cromatografía y electroforesis, así como el pretratamiento de las muestras normalmente empleado para llevar a cabo procesos de extracción y aislamiento de estos productos (ver todo el documento).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la presente invención es un procedimiento de obtención de una fracción semipurificada activa de *Ganoderma lucidum* (FSAGL) por extracción del cuerpo fructífero con metanol y aplicación en columna de silicagel, eluyendo con butanol, ácido acético y agua, seleccionando las fracciones que presentan un Rf de 0,74; así como su uso para fabricación de un medicamento para tratamiento del cáncer, incluyendo linfomas y leucemias.

Hoja adicional

1.1. REIVINDICACIONES 1-5

La actividad biológica de extractos de *Ganoderma lucidum* es conocida en el Estado de la Técnica, encontrándose en numerosos documentos, debido al contenido en principios activos de este organismo, así como su uso para fabricación de medicamentos y /o composiciones farmacéuticas para tratamiento de diferentes enfermedades. Los documentos D01-D05 anticipan la obtención de extractos activos de *Ganoderma lucidum*; sin embargo, ni el método empleado ni las características de los extractos divulgados en estos documentos, coinciden con las reivindicadas en la presente solicitud.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-5 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).