



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 132**

51 Int. Cl.:
A61K 36/074 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)
A61Q 11/00 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02800257 .4**
96 Fecha de presentación : **27.09.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1449534**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2004**

54 Título: **Extracto de *Ganoderma atrum* como inhibidor de metaloproteasa de la matriz.**

30 Prioridad: **27.09.2001 JP 2001-297672**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.09.2011

73 Titular/es: **NIPPON MENARD COSMETIC Co., Ltd.**
130, Torimi-cho
Nishi-ku, Nagoya-shi, Aichi, JP

72 Inventor/es: **Hattori, Koji;**
Mizutani, Hiroshi y
Osumi, Kazuhisa

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 132 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Extracto de *Ganoderma atrum* como inhibidor de metaloproteasa de la matriz

5 Campo técnico

10 La presente invención se refiere a un extracto en disolvente de *Ganoderma atrum* que tiene actividad inhibidora de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP por sus siglas en inglés), según la reivindicación 1. Más específicamente, la invención tiene que ver con un inhibidor de las MMP de alta seguridad, que se espera que tenga efectos sobre la prevención, supresión y alivio sintomático de diversos trastornos y enfermedades que provocan las MMP activadas, tal como las metástasis de cánceres, la ulceración, la artritis reumatoide, la osteoporosis, la periodontitis y en el tratamiento cosmético del envejecimiento de la piel.

15 Técnica anterior

20 El cáncer es una de las principales causas de muerte en la mayoría de los países avanzados. En Japón, el cáncer supone casi el 30 % de las causas de muerte. Con frecuencia, los avances en los tratamientos quirúrgicos y en la radioterapia permiten la eliminación del foco primario de un cáncer. La todavía alta morbilidad se atribuye a las propiedades metastásicas de los cánceres. En el estado actual de los conocimientos, es sumamente difícil curar un cáncer con metástasis múltiples. En consecuencia, uno de los objetivos importantes en el tratamiento del cáncer es establecer un método para suprimir las metástasis del cáncer, además del tratamiento convencional del foco primario. En este estado de cosas, se está elucidando gradualmente el mecanismo de la metástasis del cáncer a nivel molecular. Se ha observado que el sistema de descomposición de las matrices extracelulares constituye uno de los procesos metastásicos.

25 La metástasis de un cáncer representa el estado en el cual las células cancerosas liberadas de un sitio primario se distribuyen por todo el cuerpo mediante el torrente sanguíneo, se entregan vivas en otro órgano y comienzan su multiplicación en el tejido del órgano. En general, el tejido tumoral está rodeado de una matriz extracelular densa. Para la distribución de las células cancerosas a partir del sitio primario se necesita la enzimólisis de la matriz extracelular. La matriz extracelular está compuesta por varias macromoléculas, entre las que se incluyen colágeno, elastina, fibronectina, laminina y proteoglicano. Las MMP constituyen un grupo de enzimas primarias que están implicadas en la enzimólisis de las matrices extracelulares. Las MMP se activan y tienen una expresión enzimática realzada en el proceso de vascularización del tejido canceroso o en el proceso de metástasis del cáncer, como se describe en la referencia 1 citada a continuación. Por lo tanto, se espera que una disminución de la expresión enzimática y la inhibición de la actividad enzimática eliminen la invasión de células cancerosas y, por lo tanto, la metástasis de los cánceres.

Referencia 1

40 « Supresión de la invasión de tumores y de la síntesis de metaloproteinasas de la matriz mediada por retinoides », Shoenemark M. P. *et al*, Annals New York Academy of Sciences, vol. 878, páginas 466-486, 1999

45 En el proceso de invasión de las células cancerosas en las macromoléculas, la colagenólisis es una etapa especialmente crítica. La descomposición del colágeno de tipo IV presente en la membrana basilar de los vasos sanguíneos es necesaria para que las células cancerosas puedan invadir los vasos sanguíneos o para que puedan ser liberadas por los mismos. Liotta *et al* han encontrado que la acción de la enzima colagenolítica de tipo IV segregada por las células cancerosas es un factor importante para determinar la potencia metastásica del cáncer. La gelatinasa incluida en las MMP es una enzima producida por los fibroblastos, las células endoteliales y las células cancerosas y descompone las matrices de colágeno de tipo IV, de gelatina y de elastina. Se espera que una sustancia que tenga actividad inhibidora, por ejemplo, de la gelatinasa, tenga los efectos de suprimir la vascularización de los tejidos cancerosos y la metástasis de los cánceres y de ser eficaz para la prevención y el tratamiento de cánceres y carcinomas.

Referencia 2

55 « El potencial metastásico está en correlación con la degradación enzimática del colágeno de la membrana basilar », Liotta *et al*, Nature, vol. 284, páginas 67-68, 1980

60 La referencia 3 que se cita a continuación ha informado que las MMP desempeñan un papel importante en la descomposición de las matrices extracelulares en diversas patologías entre las que se incluyen cánceres, ulceración, artritis reumatoide, osteoporosis y periodontitis. Las MMP activadas debido a estímulos externos como la radiación ultravioleta descomponen componentes esenciales para mantener la estructura de la piel. En consecuencia, recientemente se ha apuntado de manera específica que las MMP constituyen un factor de aceleración del envejecimiento activado por la radiación ultravioleta.

Referencia 3

"Metaloproteinasas de la matriz como proteinasas destructoras de tejidos", Mitsutoshi Nakata, Yasunori Okada, KOKYU (Respiratory), vol. 18, número 4, páginas 365-371, 1999.

En consecuencia, se espera que los inhibidores de las MMP tengan efectos sobre el tratamiento y el alivio sintomático de las enfermedades y trastornos provocados por las MMP activadas y han sido estudiados de manera intensa para investigación. Tales inhibidores se describen en las siguientes referencias:

BOLETÍN OFICIAL DE PATENTES JAPONESAS ABIERTAS A INSPECCIÓN PÚBLICA número 9-40552
BOLETÍN OFICIAL DE PATENTES JAPONESAS ABIERTAS A INSPECCIÓN PÚBLICA número 11-147833
BOLETÍN OFICIAL DE PATENTES ABIERTAS A INSPECCIÓN PÚBLICA número 2000-226311

Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un inhibidor de las MMP que tiene actividad de inhibición frente a la activación de las MMP producidas por la presión de las células de carcinoma metastásicas y que es eficaz para la prevención y el alivio sintomático de diversas enfermedades y trastornos provocados por las MMP activadas, tal como las metástasis de los cánceres.

Descripción de la invención

Los inventores de la presente invención emplearon como objetivo extractos de plantas que tuvieran alta seguridad y llevaron a cabo investigación de la actividad inhibidora de las MMP de los extractos de plantas. Como fruto de los amplios estudios, los inventores han encontrado que extractos en disolventes de los hongos Ganoderma tienen excelentes efectos de inhibición de las MMP y notables efectos de supresión de metástasis de cáncer en experimentos sobre modelos animales con pulmones metastazados y han completado la presente invención. Al menos parte de los objetos previamente mencionados y otros relacionados se alcanzan de este modo mediante un inhibidor de las MMP, que incluye un extracto en disolventes del hongo Ganoderma como ingrediente activo.

La presente invención se dirige también a cualquier medicina, droga, producto farmacéutico, cuasidroga, cosmético, producto de perfumería y producto de alimentación que incluye un extracto en disolventes de hongos Ganoderma y que se aplica para la prevención, supresión o alivio sintomático de las enfermedades y trastornos provocados por las MMP activadas.

Los mejores modos de llevar a cabo la invención

A continuación se discuten realizaciones de la presente invención. Los hongos Ganoderma usados en la presente invención son basidiomicetos que se emplean en galénica y pertenecen a Ganoderma, Ganodermataceae. El hongo Ganoderma es Ganoderma atrum (según la nomenclatura en la citada referencia Acta Microbiologica Sinica, 19 (3), 265-279, 1979), aunque esta clasificación no es restrictiva. El hongo Ganoderma utilizado en la presente invención puede ser cualquiera de los disponibles comercialmente en los mercados chinos y japoneses.

Entre los ejemplos disponibles de disolventes para la extracción están los siguientes: agua, alcoholes monohídricos inferiores (por ejemplo, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol y 2-butanol), alcoholes polihídricos líquidos (por ejemplo, 1,3-butilenglicol, propilenglicol y glicerol), cetonas (por ejemplo, acetona y metiletilcetona), acetonitrilo, ésteres (por ejemplo, acetato de etilo y acetato de butilo), hidrocarburos (por ejemplo, hexano, heptano y parafina líquida) y éters (por ejemplo, etiléter, tetrahidrofurano y propiléter). Son preferibles los disolventes polares como el agua, los alcoholes inferiores y las cetonas. El extractor puede ser un disolvente o una mezcla de dos o más disolventes. En el caso de medicinas para aplicación interna, se puede escoger cualquier disolvente adecuado para aplicación interna.

El contenido en el extracto en disolvente de hongo Ganoderma no está específicamente restringido, pero se halla en el intervalo de 0,0005 a 10,0 % en peso o preferentemente en el intervalo de 0,005 a 5,0 % en peso como peso seco respecto del peso total de cualquiera de las medicinas, drogas, productos farmacéuticos, cuasi-drogas, cosméticos, artículos de perfumería y productos de alimentación que se usan para la prevención, supresión o alivio sintomático de los trastornos o enfermedades provocados por las MMP activadas. El contenido inferior a 0,0005 % en peso no asegura suficientes efectos en la presente invención. El contenido superior al 10,0 % en peso, por otro lado, no supone un aumento adicional de los efectos y resulta, en consecuencia antieconómico.

El extracto en disolvente de hongo Ganoderma se puede usar en forma de disolución extraída sin ningún tratamiento adicional o bien con cualquier tratamiento necesario, tal como concentración, dilución, filtración o decoloración o desodorización con carbón activo o similares. La disolución extraída se puede evaporar hasta sequedad, se puede secar por pulverización o se puede liofilizar, según las necesidades.

El inhibidor de las MMP de la presente invención puede ser cualquiera de las medicinas, drogas, productos farmacéuticos, cuasi-drogas, cosméticos, artículos de perfumería y productos de alimentación que contiene el extracto en disolvente descrito previamente y se aplica para la prevención, supresión o alivio sintomático de los trastornos y enfermedades provocados por las MMP activadas. El inhibidor de las MMP puede incluir diversos aditivos que son componentes añadidos generalmente a medicinas, drogas, productos farmacéuticos, cuasi-drogas, cosméticos, artículos de perfumería y productos de alimentación en un intervalo específico que no suponga la modificación de los efectos del extracto en disolvente. Entre estos aditivos se incluyen cargas o rellenos,

estabilizantes, conservantes, agentes de ligado, desintegrantes, hidrocarburos, ácidos grasos, alcoholes, ésteres, agentes activos en superficies, jabones metálicos, reguladores de pH, antisépticos, agentes aromatizantes, agentes de retención de la humedad, agentes en polvo, absorbentes de la radiación UV, agentes de espesado, materias colorantes, antioxidantes, agentes de blanqueo, agentes quelantes, aceites, grasas y ceras.

5 Entre los ejemplos posibles de formas de dosificación de la presente invención se incluyen: polvos, píldoras, comprimidos, disoluciones inyectables, supositorios, emulsiones, cápsulas, gránulos, líquidos (incluyendo tinturas, extractos fluidos, líquidos alcohólicos suspensiones y limonadas), lociones de perfumería, cremas, leches, geles, aerosoles, aceites, agentes acondicionadores, agentes de limpieza, agentes de baño, bases de maquillaje, polvos, barras de labios, ungüentos, pomadas, emplastos, cataplasmas, pastas, yesos, alimentos en comprimidos y

10 bebidas.
A continuación se discuten en el texto algunos ejemplos de la presente invención. En las composiciones de los ejemplos respectivos, el término “partes” significa “partes en peso”, a menos que se especifique otra cosa.

15 **Preparación 1: Extracto en agua caliente de Ganoderma atrum**
El proceso supuso añadir 400 ml de agua purificada a 20 g de Ganoderma atrum seco, llevar a cabo la extracción a una temperatura entre 95 y 100 ° C durante 2 horas y filtrar la disolución extraída. Se concentró el filtrado y se liofilizó para obtener 1,4 g de extracto de Ganoderma atrum en agua caliente.

20 **Preparación 2: Extracto en etanol al 50 % de Ganoderma atrum**
El proceso supuso añadir 900 ml de una disolución de etanol al 50 % a 100 g de Ganoderma atrum seco, llevar a cabo la extracción a temperatura ambiente durante 7 días y filtrar la disolución extraída. Se evaporó el filtrado hasta sequedad para obtener 1,9 g de extracto de Ganoderma atrum en alcohol al 50 %.

25 **Preparación 3: Extracto en etanol de Ganoderma atrum**
El proceso supuso añadir 900 ml de etanol a 100 g de Ganoderma atrum seco, llevar a cabo la extracción a temperatura ambiente durante 7 días y filtrar la disolución extraída. Se evaporó el filtrado hasta sequedad para obtener 1,5 g de extracto de Ganoderma atrum en etanol.

30 **Preparación 4 de referencia: Extracto en agua caliente de Ganoderma lucidum (Reishi)**
El proceso supuso añadir 400 ml de agua purificada a 20 g de Ganoderma lucidum (Reishi) seco, llevar a cabo la extracción a una temperatura entre 95 y 100 ° C durante 2 horas y filtrar la disolución extraída. Se concentró el filtrado y se liofilizó para obtener 2,0 g de extracto de Ganoderma lucidum (Reishi) en agua caliente.

35 **Preparación 5 de referencia: Extracto en etanol al 50 % de Ganoderma lucidum (Reishi)**
El proceso supuso añadir 900 ml de una disolución de etanol al 50 % a 100 g de Ganoderma lucidum (Reishi) seco, llevar a cabo la extracción a temperatura ambiente durante 7 días y filtrar la disolución extraída. Se evaporó el filtrado hasta sequedad para obtener 3,1 g de extracto de Ganoderma lucidum (Reishi) en alcohol al 50 %.

40 **Preparación 6 de referencia: Extracto en etanol de Ganoderma lucidum (Reishi)**
El proceso supuso añadir 900 ml de etanol a 100 g de Ganoderma lucidum (Reishi) seco, llevar a cabo la extracción a temperatura ambiente durante 7 días y filtrar la disolución extraída. Se evaporó el filtrado hasta sequedad para obtener 1,5 g de extracto de Ganoderma lucidum (Reishi) en alcohol.

45 **Ejemplo 1: Polvo 1**

Receta	Contenido
1. Extracto en agua caliente de Ganoderma atrum (preparación 1)	2,0 partes
2. Almidón de maíz seco	38,0 partes
3. Celulosa microcristalina	60,0 partes

50 (Proceso de fabricación)
El proceso supone mezclar los componentes 1 a 3 juntos para obtener un polvo 1.

55 **Ejemplo 2: Polvo 2**

Se prepara un polvo 2 sustituyendo en el ejemplo 1 el extracto en agua caliente de Ganoderma atrum por el extracto en etanol al 50 % de Ganoderma atrum (preparación 2).

60 **Ejemplo 3 de referencia: Polvo 3**

Se prepara un polvo 3 sustituyendo en el ejemplo 1 el extracto en agua caliente de Ganoderma atrum por el extracto en agua caliente de Ganoderma lucidum (Reishi) (preparación 4).

65 **Ejemplo 4: Polvo 4**

Se prepara un polvo 4 sustituyendo en el ejemplo 1 el extracto en agua caliente de Ganoderma atrum por una mezcla de cantidades iguales del extracto en agua caliente de Ganoderma atrum (preparación 1) y el extracto en agua caliente de Ganoderma lucidum (Reishi) (preparación de referencia 4).

Ejemplo para comparación 1: Polvo A (polvo sin extracto en disolvente de hongo Ganoderma)

Se prepara un polvo A sustituyendo el extracto en agua caliente de Ganoderma atrum del ejemplo 1 por almidón de maíz seco.

5

Ejemplo 5: Comprimidos

Receta	Contenido
1. Extracto en etanol de Ganoderma atrum (preparación 3)	5,0 partes
2. Almidón de maíz seco	25,0 partes
3. Carboximetilcelulosa cálcica	20,0 partes
4. Celulosa microcristalina	40,0 partes
5. Polivinilpirrolidona	7,0 partes
6. Talco	3,0 partes

10

15

(Proceso de fabricación)

El proceso supone mezclar los componentes 1 a 4 juntos y añadir una disolución acuosa del componente 5 como agente ligante a la mezcla para formar gránulos. Posteriormente, el proceso supone añadir el componente 6 a los gránulos y formar comprimidos. El peso de cada comprimido es de 0,52 g.

20

Ejemplo de referencia 6: Comprimidos alimenticios

Receta	Contenido
1. Extracto en etanol al 50 % de Ganoderma lucidum (preparación 5)	2,0 partes
2. Almidón de maíz seco	50,0 partes
3. Eritritol	40,0 partes
4. Ácido cítrico	5,0 partes
5. Éster de ácido graso de sacarosa	3,0 partes
6. Ingrediente aromatizante	cantidad suficiente
7. Agua	cantidad suficiente

25

30

(Proceso de fabricación)

El proceso supone mezclar los componentes 1 a 4 y 7 y formar gránulos. Posteriormente, el proceso supone añadir los componentes 5 y 6 a los gránulos y formar comprimidos. El peso de cada comprimido es de 1,0 g.

35

Ejemplo de referencia 7: Bebida

Receta	Contenido
1. Extracto en etanol de Ganoderma lucidum (preparación 6)	1,0 partes
2. Estevia	0,05 partes
3. Ácido málico	5,0 partes
4. Ingrediente aromatizante	0,1 partes
5. Agua en la cantidad necesaria hasta completar en total 100 partes	

40

45

(Proceso de fabricación)

El proceso supone disolver los componentes 2 y 3 en una pequeña cantidad de agua y en mezclar los componentes 1, 4 y 5 con la disolución.

50

A continuación se describen ejemplos experimentales para la discusión detallada de los efectos de la presente invención.

Ejemplo experimental 1: Ensayo de inhibición de las MMP

Se sometieron los extractos en disolventes de los hongos Ganoderma a un ensayo de inhibición frente a la actividad de la gelatinasa mediante zimografía de gelatina. En el procedimiento se preparó un gel de electroforesis de gel de poliacrilamida del dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) (de 1 mm de espesor) que contenía 0,6 mg/ml de gelatina y se sometieron 0,014 ml de un cultivo sobrenadante de células de melanoma de ratón B16 a electroforesis en gel en condiciones no reductoras. Posteriormente, el procedimiento continuó con el lavado del gel dos veces con una disolución de Triton X-100 (Sigma Chemical Co.) al 2,5 % a temperatura ambiente durante 30 minutos, para eliminar el SDS (dodecilsulfato de sodio) y con la incubación del gel lavado en una disolución tampón tris-HCl 30 mM (pH 7,6) que contenía 200 ml de cloruro de sodio, 5mM de cloruro de calcio y brij-35 (Sigma Chemical Co.) al 0,01 %, a 37 ° C durante 24 horas. A la disolución tampón se añadieron cada uno de los siguientes extractos: extracto de Ganoderma atrum en agua caliente (preparación 1), extracto de Ganoderma lucidum (Reishi) en agua caliente (preparación de referencia 4) y mezcla en cantidades iguales de extracto de Ganoderma atrum en agua caliente y extracto de Ganoderma lucidum (Reishi) en agua caliente; el gel se remojó en dichas disoluciones. Una vez completada la reacción, el gel se tiñó con una disolución al 0,2 % de Coomassie Brilliant Blue R y se

55

60

65

decoloró con una disolución con 5 % de metanol y 7,5 % de ácido acético. El procedimiento determinó la actividad de la gelatinasa detectada como una banda no teñida sobre el gel teñido de azul mediante un densitómetro (Atto Densitograph AE-6905, Atto Co.) y se calculó la tasa de inhibición. La tasa de inhibición (%) se calculó según la ecuación (1) que va más adelante, a partir de los valores observados en el densitómetro. Los resultados se muestran en la tabla 1. Los extractos en disolventes de hongos Ganoderma inhibieron la gelatinasa producida por las células de melanoma de ratón B16 en una forma dependiente de la concentración.

$$\text{Tasa de inhibición} = [1 - (A/B)] \times 100 \quad (1)$$

A: valor observado en el densitómetro en el caso de adición del extracto en disolvente de hongos Ganoderma

B: valor observado en el densitómetro en el caso de no adición del extracto en disolvente de hongos Ganoderma

Tabla 1
Muestras

	Concentración final en la disolución de reacción (%)	Tasa de inhibición (%)
S1	0,25	38
	0,50	64
	1,0	99
S2	0,25	9
	0,50	49
	1,0	96
S3	0,25	26
	0,50	58
	1,0	98

S1: Extracto en agua caliente de Ganoderma atrum (preparación 1)

S2: Extracto en agua caliente de Ganoderma lucidum (Reishi) (preparación de referencia 4)

S3: Mezcla a partes iguales de extracto en agua caliente de Ganoderma atrum y extracto en agua caliente de Ganoderma lucidum (Reishi)

Ejemplo experimental 2: Ensayo de inhibición de las MMP

Se sometieron también los siguientes extractos: extracto en etanol al 50 % de Ganoderma lucidum (Reishi) (preparación de referencia 5), extracto en etanol de Ganoderma lucidum (Reishi) (preparación de referencia 6), extracto en etanol al 50 % de Ganoderma atrum (preparación 2) y extracto en etanol de Ganoderma atrum (preparación 3) al ensayo de inhibición descrito en el apartado anterior. Los resultados se muestran en la tabla 2. Las concentraciones de estos cuatro extractos en sus respectivas disoluciones de reacción fueron todas extremadamente bajas, con valores de 0,03 %. Sin embargo, los extractos en etanol de los hongos Ganoderma a estas concentraciones más bajas inhibieron más eficazmente la gelatinasa producida por las células de melanoma de ratón B16 que sus respectivos extractos en agua.

Tabla 2
Muestras

	Concentración final en la disolución de reacción (%)	Tasa de inhibición (%)
T1	0,03	67
T2	0,03	78
T3	0,03	85
T4	0,03	96

T1: Extracto en etanol al 50 % de Ganoderma lucidum (Reishi) (preparación de referencia 5)

T2: Extracto en etanol de Ganoderma lucidum (Reishi) (preparación de referencia 6)

T3: Extracto en etanol al 50 % de Ganoderma atrum (preparación 2)

T4: Extracto en etanol de Ganoderma atrum (preparación 3)

Ejemplo experimental 3: Ensayo de supresión de metástasis de cáncer

Cada uno de los siguientes extractos: extracto en agua caliente de Ganoderma atrum (preparación 1), extracto en agua caliente de Ganoderma lucidum (Reishi) (preparación de referencia 4) y mezcla a partes iguales de extracto en agua caliente de Ganoderma atrum y extracto en agua caliente de Ganoderma lucidum (Reishi), se administró repetidamente a una concentración de 100 mg/kg a un grupo de ratones C57BL/6 a través de la cavidad abdominal una vez al día durante una semana. En este ejemplo cada grupo incluía 8 ratones. A cada ratón se le inyectaron células de melanoma de ratón B16 a través de la vena de la cola hasta una densidad de 1×10^5 células por ratón. Tras la inyección, se siguió administrando repetidamente cada muestra. Tres semanas después de la inoculación de las células cancerosas se extrajo el pulmón de cada ratón y se fijó en una disolución de formalina al 10 %. El procedimiento continuó dividiendo los pulmones fijados en formalina en 5 lóbulos y contando el número de nidos de

células metastizadas sobre la superficie de los lóbulos. Los resultados se muestran en la tabla 3. La administración de los extractos en disolventes de hongos Ganoderma suprimió de manera significativa la formación de nidos de células metastizadas, cuando se compara con el grupo de control. Concretamente, los extractos en disolventes de hongos Ganoderma tenían suficiente resistencia a las metástasis.

5

Tabla 3
Muestras Número promedio de nidos de células metastizadas

10

U1	49
U2	8
U3	25
U4	14

15

U1: Disolución salina fisiológica
U2: Extracto en agua caliente de Ganoderma atrum (preparación 1)
U3: Extracto en agua caliente de Ganoderma lucidum (Reishi) (preparación de referencia 4)
U4: Mezcla a partes iguales de extracto en agua caliente de Ganoderma atrum y extracto en agua caliente de Ganoderma lucidum (Reishi)

20

De acuerdo con los resultados precedentes, el extracto en agua caliente de Ganoderma atrum (preparación 1), el extracto en agua caliente de Ganoderma lucidum (Reishi) (preparación de referencia 4) y la mezcla a partes iguales de extracto en agua caliente de Ganoderma atrum y de extracto en agua caliente de Ganoderma lucidum (Reishi) tienen los efectos excelentes de inhibición de las MMP y supresión de las metástasis del cáncer. También se sometieron al ensayo anterior de supresión los extractos en alcohol al 50 % y en alcohol de Ganoderma atrum y Ganoderma lucidum (Reishi) (preparaciones 2 y 3 y preparaciones de referencia 5 y 6). Los resultados mostraron que los extractos en etanol al 50 % y en etanol de estos hongos Ganoderma también tenían los efectos excelentes de inhibición de las MMP y supresión de las metástasis del cáncer.

25

30

Ejemplo experimental 4: Ensayo de supresión de metástasis de cáncer

Se prepararon piensos experimentales añadiendo cada uno de los polvos 1 a 4 (ejemplos 1 a 4) de la presente invención, que contenían respectivamente el extracto en agua caliente de Ganoderma atrum (preparación 1), el extracto en etanol al 50 % de Ganoderma atrum (preparación 2), el extracto en agua caliente de Ganoderma lucidum (Reishi) (preparación de referencia 4) y la mezcla a partes iguales del extracto en agua caliente de Ganoderma atrum y del extracto en agua caliente de Ganoderma lucidum (Reishi), a una concentración del 5,0 % a un pienso comercialmente disponible (MF para cría de ratones y ratas: Oriental Yeast Co., Ltd.). Grupos de ratones comieron libremente los piensos respectivos. Otro grupo de ratones comió libremente un pienso experimental que tenía 5,0 % del polvo A (ejemplo comparativo 1) sin ningún extracto en disolventes de hongos Ganoderma (grupo de control). En este ejemplo, cada grupo incluía 8 ratones. Al igual que en el procedimiento del ejemplo experimental 2, se inocularon células cancerosas dos semanas después de comenzar la cría de los ratones con el pienso al que se habían añadido los polvos. Se contó el número de nidos de células metastizadas. Los resultados se muestran en la tabla 4. La adición a los piensos de cada polvo que contenía el extracto en disolventes de hongos Ganoderma suprimió de manera significativa la formación de nidos de células metastizados, cuando se comparan con el grupo de control (ejemplo de comparación). Concretamente, los extractos en disolventes de hongos Ganoderma fueron eficaces para suprimir las metástasis del cáncer.

45

Tabla 4
Muestras Número promedio de nidos de células metastizadas

50

V1	62
V2	35
V3	33
V4	47
V5	41

55

V1: Ejemplo para comparación
V2: Polvo 1 (ejemplo 1)
V3: Polvo 2 (ejemplo 2)
V4: Polvo 3 (ejemplo de referencia 3)
V5: Polvo 4 (ejemplo 4)

60

Se machacaron en un mortero los comprimidos del ejemplo 5 y los comprimidos alimenticios del ejemplo 6 hasta transformarlos en polvo. Las muestras en polvo se sometieron al ensayo de supresión precedente para polvos. Con respecto a la bebida del ejemplo de referencia 7, se administraron 0,3 ml de la muestra oralmente a cada ratón una

vez al día con una sonda de alcance para el estómago y se examinaron los efectos de la muestra sobre metástasis de cánceres. Las muestras de los ejemplos 5 a 7 también resultaron eficaces para suprimir las metástasis del cáncer.

5 Aplicabilidad industrial

Según se ha descrito previamente, los extractos en disolventes de los hongos Ganoderma tienen los efectos de inhibir la activación de las MMP producidas por las células cancerosas y los efectos de suprimir las metástasis de los cánceres relacionados con las MMP activadas. El inhibidor de las MMP de la presente invención se aplica preferentemente para la prevención, supresión y alivio sintomático de diversos trastornos y enfermedades provocados por las MMP activadas, tales como metástasis de cánceres, ulceración, artritis reumatoide, osteoporosis, periodontitis y envejecimiento de la piel.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un extracto en disolventes de Ganoderma atrum que tiene actividad inhibidora de las metaloproteinasas de la matriz celular, en el que los extractantes son uno o más disolventes escogidos en el grupo que consiste en agua, alcoholes inferiores y alcoholes polihídricos líquidos.
- 10 2. Un producto farmacéutico que comprende un extracto en disolvente según la reivindicación 1.
3. Un producto de alimentación que comprende un extracto en disolvente según la reivindicación 1.
4. Una composición cosmética que comprende un extracto en disolvente según la reivindicación 1.
- 15 5. Un extracto en disolvente de Ganoderma atrum según la reivindicación 1 para usarlo como medicamento o para usarlo en terapia.
- 20 6. Un extracto en disolvente de Ganoderma atrum según la reivindicación 1 para usarlo en el tratamiento de las metástasis del cáncer, la ulceración, la artritis reumatoide, la osteoporosis o la periodontitis.
7. Uso de un extracto en disolvente según la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para usarlo en el tratamiento de las metástasis del cáncer, la ulceración, la artritis reumatoide, la osteoporosis o la periodontitis.
- 25 8. Uso de un extracto en disolvente según la reivindicación 1 para el tratamiento cosmético del envejecimiento de la piel.