



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 319**

51 Int. Cl.:  
**A61K 35/74** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00945521 .3**  
96 Fecha de presentación : **19.07.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1197218**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.04.2002**

54 Título: **Extracción de polisacáridos de proteínas de algas y uso de los mismos.**

30 Prioridad: **19.07.1999 CN 99 1 09881**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.09.2011**

73 Titular/es: **Qing Qi**  
**No. 93, Dianmen East Street**  
**Beijing 100009, CN**  
**Jian Ding**

72 Inventor/es: **Qi, Qing y**  
**Ding, Jian**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 319 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

Extracción de polisacáridos de proteínas de algas y a usos de los mismos

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un extracto de organismos de algas y sus usos, especialmente a un extracto de proteoglicano de algas y a usos del mismo

### Antecedente técnico de de la invención

10 Desde la década de los 70, los investigadores han prestado muchas más atención a los estudios con organismos de algas, especialmente algas verdeazuladas. Estos estudios se concentran principalmente en los valores nutricionales y de toxicidad de los organismos. De estas, ya en la Conferencia de Alimentos y Organización Agrícola de las Naciones Unidas de 1974 se consideró a la espirulina una excelente fuente de alimentos para los seres humanos en el futuro.

Las propiedades de varios extractos de organismos algales se llevan estudiando desde los años 80 para comprobar si los extractos de organismos algales se pueden usar como posibles agentes farmacéuticos. De los estudios, los extractos de algas verdeazuladas, en particular los extractos de espirulina se han considerado de gran importancia.

15 La solicitud de patente japonesa 58-12832 divulga un proteoglicano extraído de microalgas y de espirulina que inhibe el crecimiento de las células de leucemia. No obstante, en esta solicitud no se han divulgado otras actividades de dicho proteoglicano. Aunque en dicho documento se divulga un procedimiento para la extracción del proteoglicano de la espirulina, el procedimiento no implica la etapa de romper la pared celular de la espirulina. Por tanto, cabe esperar que el procedimiento de esta solicitud japonesa de patente sólo se aplique en el laboratorio, y no en la industria a mayor escala.

20 Por otro lado, Osamu Hayashi et al., "Enhancement of Antibody Production in Mice by Dietary Spirulina platensis", J. Nutr. Sci. Vitaminol., 40, 431-441, 1994, divulgan que un extracto en agua caliente de *Spirulina platensis* (SHW) incrementa marcadamente la proliferación de las células de bazo en un cultivo *in vitro* y potencia de forma significativa la producción de interleucina-1 (IL-1) de los macrófagos peritoneales y que la adición al cultivo *in vitro* de células de bazo de SHW tiene como resultado la potenciación de la producción de anticuerpos, lo que sugiere que la espirulina potencia la respuesta inmunitaria,

25 La presente invención se presenta en base a los estudios de los inventores sobre la extracción del proteoglicano de algas y las actividades terapéuticas del extracto de proteoglicano de algas.

### Resumen de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que usa un extracto de proteoglicano de espirulina.

30 Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para preparar un extracto de proteoglicano de espirulina.

De acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a un extracto de proteoglicano de espirulina que se puede obtener mediante un procedimiento

que comprende las etapas de:

- a) disolver la espirulina en polvo seco en 5-20 veces de agua en peso y romper las paredes celulares de espirulina;
- 35 b) calentar una solución obtenida de la etapa a) a 60-100 °C y enfriar la solución calentada para separar una fase líquida de la solución;
- c) ajustar el pH de dicha fase líquida a 3,8-4,2 y filtrar dicha fase líquida para obtener un filtrado; y
- d) ajustar el filtrado a un pH de 7 y concentrar el filtrado.

40 Características preferidas del extracto de proteoglicano se definen en las reivindicaciones adjuntas 2-6 en el presente documento.

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un componente activo, que consiste en un extracto de proteoglicano de espirulina tal como se divulga en el presente documento, con o sin un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Preferentemente, la composición de la invención se usa como composición anticancerosa, una composición de mejora de hemogramas, composición anti-irradiación, composición reparadora de ADN, composición antivirus, composición potenciadora del sistema inmunológico o composición activadora de las células similares a las dendritas.

5 De acuerdo con un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para preparar un extracto de proteoglicano de espirulina que incluye las etapas de:

- a) disolver la espirulina en polvo seco en 5-20 veces de agua en peso y romper las paredes celulares de espirulina;
- b) calentar una solución obtenida de la etapa a) a 60-100 °C y enfriar la solución calentada para separar una fase líquida de la solución;
- c) ajustar el pH de dicha fase líquida a 3,8-4,2 y filtrar dicha fase líquida para obtener un filtrado; y
- 10 d) ajustar el filtrado a un pH de 7 y concentrar el filtrado.

Características preferidas del procedimiento anterior se definen en las reivindicaciones dependientes 10-14 en el presente documento.

### **Breve descripción de las figuras**

15 La **figura 1** muestra el efecto de una composición de mejora de hemogramas de la presente invención sobre hemograma en ratones;

La **figura 2** muestra el efecto de un extracto de proteoglicano de algas de la presente invención que inhibe la relajación del ADN superenrollado mediada por la Topo 1;

La **figura 3** muestra gráficamente el efecto de un extracto de proteoglicano de algas de la presente invención que inhibe la descatenación de ADNk mediada por la Topo II;

20 La **figura 4** muestra un ensayo de electroforesis en gel de agarosa de un extracto de proteoglicano de algas de la presente invención que induce apoptosis en células HL-60 humanas;

La **figura 5** muestra gráficamente una relación entre una concentración de un extracto de proteoglicano de algas de la presente invención y el porcentaje de número de células en apoptosis;

25 La **figura 6** muestra gráficamente el efecto de diferentes composiciones de acuerdo con la invención sobre una célula de médula ósea en ratones;

La **figura 7** muestra el contenido en ADN de la médula ósea en ratones en diferentes composiciones de acuerdo con la invención;

La **figura 8** muestra e efecto de diferentes dosis de composiciones de acuerdo con la invención sobre un contenido de proteína  $\tau$  en ratones; y

30 La **figura 9** muestra gráficamente el efecto de una composición de acuerdo con la invención sobre los linfocitos T.

### **Descripción detallada de la invención**

35 La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un extracto de proteoglicano de algas y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable. En la composición de la invención, la cantidad del extracto de proteoglicano de algas usada es terapéuticamente eficaz. Dado que los organismos algales no tienen efectos adicionales sobre el ser humano, no es necesario purificar adicionalmente el extracto de proteoglicano de algas usado en la invención. No obstante, el extracto puede procesarse después para obtener un producto de mayor pureza, en caso necesario.

40 La cantidad de extracto de proteoglicano de algas usado en la invención, que en general se indica con la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" en esta solicitud, puede ser determinada con facilidad por los expertos en la técnica. Depende de las circunstancias de un paciente, tales como el peso corporal, la edad, la enfermedad del paciente y similares. Como se ha indicado antes, el extracto de proteoglicano de algas usado en la invención no tiene efectos secundarios, puede administrarse directamente a los pacientes. En este caso, la composición no comprende vehículos farmacéuticamente aceptables. En el caso de que la composición comprenda un vehículo farmacéuticamente aceptable, el extracto y el vehículo se pueden mezclar de acuerdo con un procedimiento convencional en este campo para obtener una preparación deseada. En general, la cantidad del componente activo en la composición puede ser de 0,1 %-99,9 %  
45 en peso.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en la invención incluyen los usados de forma convencional en la técnica, tales como disolventes, excipientes y agentes disgregantes. La composición farmacéutica se puede preparar por cualquier medio convencional, incluidos soluciones orales, cápsulas, trociscos, píldoras, polvos, gránulos, jarabes, supositorios etc.

5 Los polvos de algas se usan, preferentemente, como materias primas en la invención para extraer proteoglicano de algas. La rotura de la pared celular en la etapa a) se puede llevar a cabo mediante cualquier modo convencional en la técnica, tal como tratamiento supersónico, agitación rápida, lisis de cambio de presión osmótica o lisis enzimática.

10 Para eliminar los cultivos e impurezas de la superficie de los polvos de algas, la superficie de los polvos puede lavarse primero con un poco de agua. En general, el tiempo de calentamiento de la etapa b) de la invención es de 0,5 h a 2 h, preferentemente 1 h, y la temperatura de la misma está en el intervalo de 60 °C-100 °C, preferentemente de 80 °C-95 °C, y, más preferentemente a 95 °C.

La cantidad de agua usada en el procedimiento de la invención puede ser 8-15 veces en peso de los polvos de alga usados, preferentemente 10 veces en peso.

15 En la etapa c) la solución se ajusta primero a un pH <7, preferentemente a un pH 2.0-4,5, y más preferentemente a un pH de 3,8-4.2.

Los ácidos/bases convencionales, tales como una solución de HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o NaHCO<sub>3</sub>, se pueden usar para ajustar el valor del pH en esta etapa.

20 En la presente invención, los procedimientos para la separación entre una fase sólida y una fase líquida son los usados convencionalmente en la técnica, tal como filtración a presión reducida, filtración en tamiz molecular, centrifugación y similares. Dado el tratamiento de rotura de las pared celulares implicado en la presente invención se pueden obtener extractos de proteoglicano de algas con un rendimiento mayor.

Los extractos de proteoglicano de algas obtenidos mediante el procedimiento de la invención tienen actividades anticancerosas, anti-irradiación, de potenciación inmunológica, de reparación del ADN, de activación de células similares a dendritas, de mejora de la función hematopoyética y similares.

25 La presente invención se describirá adicionalmente en los ejemplos siguientes.

#### **Preparación de extractos de proteoglicano de algas**

##### **Ejemplo 1**

30 Se disolvieron 3 kg de polvo de espirulina en 3 l de agua y después se filtraron. A una solución se añadieron 30 l de agua y se agitaron rápidamente. La solución resultante se calentó a 88 °C durante 1 hora. Después de enfriar, la solución se filtró bajo presión. Después, el pH del filtrado se ajustó a un pH de 3,8 mediante una solución diluida de HCl y se mantuvo durante la noche. Después de la centrifugación, el sobrenadante se ajustó a un pH 7 con una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Los precipitados resultantes se secaron mediante pulverización para obtener un extracto bruto de espirulina 0,599 kg, que contiene un 72,3% de proteoglicano.

##### **Ejemplo 2**

35 Se disolvieron 3 kg de polvo de espinilina en 24 l de agua, se agitaron y se calentaron a 90 °C durante 1 hora. Después de enfriar, la solución resultante se filtró a presión reducida. El filtrado se ajustó a pH 4,2 con HCl y se mantuvo durante la noche. Después de la filtración, el filtrado se ajustó a un pH 7 con una solución de NaHCO<sub>3</sub>. Los precipitados resultantes se secaron para obtener un extracto bruto de proteoglicano de espirulina 0,549 kg, que contiene un 71,2% de proteoglicano.

#### **40 Ensayos biológicos**

##### **1. Actividad anti-irradiación**

Se usaron 150 ratones C-57 (18-22 g) adquiridos en Animal Center of Chinese University of Medical Sciences. De ellos, 120 ratones se irradiaron con <sup>60</sup>Co-γ a 600 rad, 8,64 rad/min.

45 Los ratones irradiados se dividieron aleatoriamente en un grupo control, un grupo de dosis menor, un grupo de dosis media y un grupo de dosis mayor, cada uno con 30 ratones, mientras que 30 ratones no irradiados se usaron como grupo blanco control. Los ratones de los grupos de dosis menor, medio y superior recibieron el extracto de proteoglicano de

espirulina obtenido en el Ejemplo 1 a una dosis de 10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d, 40 mg/kg/d, respectivamente, mientras que a los ratones de los grupos blanco y control no se administró el extracto. En diez días, la tasa de supervivencia de los ratones en cada grupo se mostró en la tabla siguiente.

Días tras la irradiación → Grupos □ ↓	0	3	6	10	Tasa de supervivencia (%) en 10 días
Dosis mayor	30	30	26	22	73
Dosis media	30	30	26	19	63
Dosis menor	30	30	26	10	33
Control	30	6	6	3	10
Blanco	30	30	30	30	100

5

Los resultados mostraron que la tasa de supervivencia de los ratones en el grupo de administración fue significativamente mayor que en el grupo control, lo que demuestra que el extracto de proteoglicano de espirulina posee potente actividad anti-irradiación, especialmente a una dosis media o mayor.

**2. Mejora de la función hematopoyética y del hemograma y potenciación del número de plaquetas en sangre**

**10 Experimento 1. Análisis del hemograma**

Se usaron ratones C-57 (18-22 g) adquiridos en Animal Center of Chinese University of Medical Sciences. Ciento veinte ratones se irradiaron con <sup>60</sup>Co-γ a 600 rad, 8,64 rad/min.

Los ratones irradiados se dividieron aleatoriamente en un grupo control, un grupo control positivo, un grupo de dosis menor, un grupo de dosis media y un grupo de dosis mayor, mientras que 30 ratones no irradiados se usaron como grupo blanco. A los ratones del grupo positivo se les administró shengxuewan (Tianjin Darentang Pharmaceutical Factory, China) a 6000 mg/kg/d (20 veces lo que se administra normalmente a un adulto). Los ratones de los grupos de dosis menor, medio y superior recibieron un extracto de proteoglicano de espirulina obtenido en el Ejemplo 1 a 10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d, 40 mg/kg/d, respectivamente, mientras que a los ratones de los grupos blanco y control no se les administró el extracto. Se obtuvieron muestras de sangre de la vena de la cola el primer día, el tercer día, el sexto día, respectivamente, tras irradiación, y se analizaron mediante el procedimiento convencional de estudio del hemograma.

20

Los resultados se muestran del siguiente modo:

Grupos	Días tras la irradiación		
	Primer día (n=10)	Tercer día (n=10)	Sexto día (n=7)
Grupo de dosis mayor	120 ± 10,62 (<0,01)	89,3 ± 3,59 (<0,01)	163,7 ± 22,1 (<0,01)
Grupo de dosis media	70,6 ± 7,74 (<0,3)	78,2 ± 13,3 (<0,05)	109,3 ± 8,03 (<0,02)
Grupo de dosis menor	86,1 ± 9,79 (<0,05)	56,7 ± 4,34 (<0,3)	89,0 ± 9,76 (>0,5)
Grupo control de irradiación	57,2 ± 6,02	47,0 ± 3,82	85,6 ± 4,5
Grupo control blanco	354,4 ± 25,2	277,1 ± 28,12	313,3 ± 24054

Los datos de la tabla se expresaron en forma de WBC ± SE y el número de leucocitos totales es igual a cincuenta veces el número de recuento, mientras que los datos entre paréntesis eran los valores P comparados con el grupo control de irradiación y n es el número de animales en cada grupo.

25

El experimento mostró que el número de leucocitos en los grupos tratados es mayor que en grupo control de irradiación, en particular en el grupo de dosis mayor ( $P < 0,01$ ). Como se observa en la Figura 1, incluso el efecto en el grupo de dosis menor también superó el grupo control.

### Experimento 2

- 5 Un departamento marino procesó un proyecto en condiciones de radiación fuerte para hacer que los participante sufrieran daños por radiación a diferentes grados. Después de administrar extractos de proteoglicano de espirulina de acuerdo con la invención, aumentó el número de leucocitos de los pacientes y se potenció su inmunidad. Se mostró que los extractos de proteoglicano de espirulina tenían efectos de aumento del número de leucocitos.

### Experimento 3

- 10 30 personas cuyos niveles de leucocitos y plaquetas eran relativamente menores que los de las personas normales fueron sometidas a análisis. Se administró a los pacientes el extracto de proteoglicano de espirulina por vía oral, dos veces al día y tres comprimidos cada vez. Tras un mes, en el 73 por ciento de los pacientes había aumentado significativamente su número de leucocitos y plaquetas y mejoraron el estado de dieta, reposo y mental. En el otro 26 por ciento de los pacientes se produjeron poco efectos, ya que el número original de leucocitos no era menor y se mantuvo dentro de los límites normales.
- 15

### Experimento 4 Ensayo de recuento de plaquetas

- De acuerdo con los requisitos de las guías sobre nuevos fármacos en investigación preclínica, emitidas por el gobierno chino, se observó el efecto terapéutico del extracto de proteoglicano de espirulina sobre perros sabuesos. Se irradió a los perros con  $6,55\text{Gy}^{60}\text{Co-}\gamma$  de forma no uniforme. Después, se administró a los perros un líquido oral para incrementar los leucocitos, producido por Zhengzhou Pharmaceutic Co. Ltd, como grupo control positivo. Se administró a los perros cápsulas (360 mg) fabricadas con extractos de proteoglicano de acuerdo con la invención como grupos tratados, tres días antes de la irradiación y de forma consecutiva durante 24 días. Los resultados mostraron que había pocos cambios en los volúmenes específicos de leucocitos, leucocitos granulares, eritrocitos, hemoglobina y eritrocitos de sangre periférica para los perros en el grupo control positivo. No obstante, la cantidad de plaquetas para los perros en cada grupo tratado fue, obviamente, mayor que el del grupo control a la segunda y cuarta semana de la irradiación ( $P < 0,01$ ). Además, la recuperación de las macronucleocitos medulares también se aceleró, así como el incremento de la cantidad de macronucleocitos en los portas de médula de los perros de los grupos tratados. La tasa de transformación de los linfocitos de sangre periférica de los perros de los grupos tratados también fue mayor que la de un grupo control de irradiación (un control blanco) y el grupo control positivo.
- 20
- 25

- 30 Los resultados anteriores mostraron que el extracto de proteoglicano de la invención puede, obviamente, recuperar la cantidad de plaquetas de sangre periférica y la tasa de transformación de los linfocitos de los perros sabuesos tras la irradiación y estimular la proliferación de hematoblastos del sistema macronuclear medular de los mismos. Por tanto, cabe esperar que, como agente terapéutico, trate los pacientes con tumores en radioterapia y quimioterapia a una dosis mayor o a los pacientes con irradiación aguda que carecen de plaquetas o que tienen una función inmunitaria deprimida.

### 35 3. Inhibición del crecimiento de varias líneas celulares de tumores

- El extracto de proteoglicano de acuerdo con la invención tuvo distintos efectos inhibitorios sobre la proliferación de las líneas celulares de leucemia humana, tal como U937, HL60 y P388, así como la línea de cáncer de pulmón humano A549, el hepatoma hepatocelular humano HepG2 y el adenocarcinoma gástrico humano MKN-28, HCT116 in vitro. Y también se ejerce una inhibición obvia del crecimiento del sarcoma S180 de ratón, melanoma B16 y adenocarcinoma gástrico humano MKN-28, SGC-7901 y adenocarcinoma de pulmón humano e modelos de xenoinjerto de ratones atímicos LAX83 in vivo.
- 40

### Experimento 1. Inhibición del crecimiento de varios tumores in vitro

Líneas de células tumorales analizadas:

- P388: Linfoma de ratón
- 45 U937: Leucemia monocítica humana
- K562: Eritroleucemia humana
- A-549: Cáncer de pulmón no microcítico humano
- SPC-A4: Adenocarcinoma de pulmón humano

DMS-114: Cáncer de pulmón microcítico humano

NCI-H23: Adenocarcinoma de pulmón humano

SGC-7901: Adenocarcinoma gástrico humano diferenciado

MKN-28: Adenocarcinoma gástrico humano muy diferenciado

5 HCT-116: Adenocarcinoma de colon humano poco diferenciado

Hep-G2: Hepatoma hepatocelular humano

MCF-7: cáncer de mama humano

A-431: Cáncer escamoso dérmico humano

Las líneas celulares anteriores se guardan y cultivan en el laboratorio de los inventores.

10 **Mediciones**

Las líneas celulares tumorales suspendidas P-388, U-937, HL-60 y K-562 se midieron mediante ensayo de microcultivo en tetrazolio (MTT). Las células tumorales en 90  $\mu$ l de medio se sembraron en cada pocillo de placas de microcultivo de 96 pocillos a densidades adecuadas para mantener las células en un estado exponencial de crecimiento durante el experimento. Después, a cada pocillo se añadió una solución del extracto de proteoglicano obtenida en la invención, a 10  $\mu$ l/pocillo. De acuerdo con los resultados previos al ensayo, el extracto de proteoglicano de espirulina se diseñó para cinco concentraciones y cada una se analizó en pocillos por triplicado. El blanco sin células y los controles con DMSO deberían establecerse para: Tras incubación a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h, a cada pocillo se añadieron 20  $\mu$ l de la solución MTT 5mg/ml. Después, se realizó una incubación adicional durante 4 horas a 37°C, se añadieron 50  $\mu$ l de una solución triple (10% de SDS-5% isobutanol-0,01 mol/l de HCl) a cada pocillo y las placas se incubaron durante la noche en CO<sub>2</sub>. La densidad óptica (DO) se leyó en un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm. La tasa inhibitoria de ala proliferación celular se calculó mediante la fórmula siguiente y el valor de CI<sub>50</sub> se calculó mediante el método de Logit.

Otras líneas celulares se midieron mediante el ensayo de sulfurodamina B (SRB). Primero, las células tumorales adherentes se dejaron fijar durante 24 horas, después se cultivaron mediante el mismo procedimiento que el ensayo MTT. Brevemente, tras la fijación durante 24 horas, el extracto de proteoglicano de espirulina a diferentes concentraciones se añadió a los pocillos y las placas se cultivaron a 37 °C. Se eliminaron los medios y las células se fijaron mediante 100  $\mu$ l de 10% de solución fría de ácido tricloroacético a cada pocillo mediante incubación a 4 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron con agua desionizada cinco veces y se secaron al aire. Después, las células se tiñeron con 100  $\mu$ l de solución de SRB (Sigma) en 1% de ácido acético (V/V) por pocillo durante 15 minutos. Después de la tinción, se eliminó el sobrenadante y las placas se lavaron rápidamente cinco veces con % de ácido acético para eliminar el colorante no unido y se dejaron secar al aire. El colorante unido se solubilizó con 150  $\mu$ l de base Tris 10 mmol/l en cada pocillo, después se leyó la densidad óptica (DO) en un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm. La tasa inhibitoria el valor de CI<sub>50</sub> se calculó mediante el mismo método que en el ensayo MTT.

$$\text{Tasa de inhibición del crecimiento (\%)} = (\text{DO control} - \text{DO tratados}) \times 100\% / \text{DO control}$$

Tabla 1 Tasas de inhibición (%) y valores CI50 del extracto de proteoglicano de espirulina sobre la proliferación de líneas celulares tumorales in vitro Conc (mg/ml)

Líneas celulares (mg/ml)	5	1,67	0,56	0,185	0,062	CI50
P-388	90,7	72,1	31,4	5,8	1,2	1,03
HI-60	95,7	63,8	25,5	17,0	0,0	1,22
U-937	87,5	66,1	35,7	37,5	3,6	0,93
MKN-28	76,2	55,4	24,8	20,8	14,9	1,29
SGC-7901	48,3	6,2	2,1	3,4	0,0	---
A-431	0,0	0,0	0,0	1,8	4,6	---
SPC-4	41,2	23,5	26,5	9,8	0,0	---
	5	3,3	2,2	1,48	0,99	
A-549	92,4	86,4	50,0	30,3	54,5	2
NCI-H23	30,9	10,3	0,0	4,4	0,0	---
DMS-114	75,0	63,5	46,2	36,5	19,2	2,36
Hep-G2	85,9	87,5	75,0	39,8	23,4	1,61
K562	85,1	73,1	41,8	29,9	19,4	2,18
MCF-7	0,0	6,3	20,8	1,7	0,0	---
HCT-116	86,1	65,7	44,4	30,6	24,1	2,15

#### 5 Experimento 2 Efecto inhibitor sobre la ADN topoisomerasa e influencia directa sobre ADN de los extractos de proteoglicano de espirulina

10 Las estructuras topológicas del ADN de organismos eucarióticos están reguladas por dos clases de enzimas clave, la topoisomerasa I (Topo I) y la topoisomerasa II (Topo II). La Topo I puede dar lugar a la rotura de un ADN monocatenario y desempeña un papel importante en la replicación, transcripción y organización cromosómica del ADN, aunque no es necesaria para la supervivencia de una célula eucariótica. La Topo II es necesaria para la célula y puede catalizar la rotura de un ADN bicatenario y desempeña un papel importante en la replicación, transcripción, recombinación del ADN, además de formar la adecuada estructura cromosómica, segregación y condensación cromosómica. En virtud de sus funciones cruciales y su carácter catalítico, las Topo I y Topo II se han identificado como extensas dianas de los fármacos quimioterapéuticos en la clínica.

15 Los inhibidores de la ADN topoisomerasa que tienen ADN de intercalación se pueden unir directamente al ADN, pero no rompen el ADN, mientras que otro tipo de compuestos, como las "tijeras moleculares", pueden escindir el ADN directamente. Un inhibidor de la ADN topoisomerasa y tijeras moleculares producen turbulencias metabólicas en el ADN, lo que da lugar a la muerte de una célula.

#### Procedimientos:

1. Efecto del extracto de proteoglicano de espirulina sobre la actividad de la Topo I
- 20 El extracto de proteoglicano de espirulina puede inhibir la relajación del PBR322 superenrollado mediada por la Topo 1.
2. Efecto del extracto de proteoglicano de espirulina sobre la actividad de la Topo II. El extracto de proteoglicano de espirulina puede inhibir la descatenación del ADNk mediada por la Topo II.

Los resultados experimentales se muestran en las Figuras 2 y 3.

El extracto de proteoglicano de espirulina inhibió la relajación del PBR322 superenrollado mediada por la Topo 1 mostrado



en la Figura 2, en la que

carril 1: PBR322 control; carril 2: 1µ de solución enzima Topo I en bruto-extracto; carril 3: OPT 50 µM; carriles 4-10: 0,64, 3,2, 16, 80, 400, 2000, 10000 µg/ml de componentes solubles en DMSO del extracto de proteoglicano de espirulina; carriles 11-17: 0,64, 3,2, 16, 80, 400, 2000, 10000 µg/ml de componentes hidrosolubles del extracto de proteoglicano de espirulina.

El extracto de proteoglicano de espirulina puede inhibir la descatenación del ADNk mediada por la Topo II como se muestra en la Figura 3, en la que:

carril 1: kDNA control; carriles 2 y 10: 1µ de solución enzima Topo II en bruto-extracto; carril 3: VP16 50 µM; carriles 4-9: 0,64, 3,2, 16, 80, 400, 2000, 10000 µg/ml de componentes solubles en DMSO del extracto de proteoglicano de espirulina; carriles 11-17: 0,64, 3,2, 16, 80, 400, 2000 µg/ml de componentes hidrosolubles del extracto de proteoglicano de espirulina; Carril 18: 20% de DMSO.

Los resultados mostraron que dos tipos de componentes del extracto de proteoglicano de espirulina inhibían la actividad de la Topo I y la Topo II tanto en la reacción de relajación del PBR322 superenrollado mediada por la Topo 1 como en la reacción de descatenación del ADNk mediada por la Topo II. No obstante, había una diferencia relativamente obvia entre ellos. El componente hidrosoluble tenía un efecto inhibitor mayor sobre la Topo I, la Topo II y mostró un efecto inhibitor completo de la actividad de la Topo I a una dosis de 3,2 µg/ml y a 16 µg/ml para la actividad de la Topo II. La dosis inhibitoria completa del componente soluble en DMSO fue 80 µg/ml para la Topo I y 2000 µg/ml para la Topo II, respectivamente.

Estos experimentos indicaron que el componente hidrosoluble del extracto de proteoglicano de espirulina era el principal componente activo inhibitor de la topoisomerasa, cuyo mecanismo podría ser interaccionar con el ADN primero, inducir un cambio de conformación del ADN, después proporcionar un contacto ineficiente entre la enzima y el sustrato y disminuir, incluso perder, la actividad enzimática.

En resumen, ambos componentes del extracto de proteoglicano de espirulina tienen obvios efectos inhibidores sobre la Topo I y la Topo II. Además, el componente hidrosoluble también puede inducir la rotura del ADN bicatenario directamente.

### Experimento 3 Efecto del extracto de proteoglicano de espirulina sobre la proteína tirosina quinasa (PTK)

La proteína tirosina quinasa (PTK) es un factor crucial en la transducción de señal y se asocia con el crecimiento, proliferación y transformación de una célula. Muchos productos de expresión de oncogenes son de actividad de PTK, que es mucho mayor en células transformada que en células normales. Por tanto, se ha postulado la hipótesis de que el crecimiento inesperado de las células tumorales se puede controlar disminuyendo la actividad de PTK.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), una PTK de tipo receptor, es una glicoproteína transmembrana monocatenaria que consta de 1196 aminoácidos y cuyo peso molecular es 17 kDa, y existe ampliamente en la membrana epitelial de mamíferos. El extremo C del EGFR puede reconocer y activar muchos sustratos celulares después de fosforilar, después efectuar la metabolización, crecimiento y carcinogénesis de una célula. Numerosos investigadores han indicado que el EGFR estaba sobreexpresado en muchos tumores y estaba estrechamente asociado con las metástasis tumorales y un mal pronóstico. En la investigación de los autores, usaron células A431 que contiene el EGFR para captar PTK y observar el efecto del extracto de proteoglicano de espirulina sobre la fosforilación de PTK.

### Resultados

#### **Resultados 1:**

Conc.(mg/ml)	5,0	2,5	1,2	0,6	0,3
Tasa de inhibición (%)	100	100	100	67,9	65,0

**Control positivo: Tirfostina 2.5mM 25, tasa de inhibición: 100%**

**Resultados 2:**

Conc.(mg/ml)	1,5	0,75	0,4	0,2	0,1
Tasa de inhibición (%)	94,1	72,5	62,7	62,7	47,1

**Control positivo: Tirfostina 0.25mM 25, tasa de inhibición: 86,1%**

**Resultados 3:**

Conc.(mg/ml)	1,2	0,6	0,3	0,15	0,07
Tasa de inhibición (%)	89	80,6	67,7	54,1	37,7

**Control positivo: Tirfostina 0.25mM 25, tasa de inhibición: 80,5%**

5 Los resultados mostraron que el extracto de proteoglicano tenían diferentes efectos inhibidores sobre la actividad de PTK Inhibió casi completamente la fosforilación en tirosina de PTK a una dosis de 1,2 mg/ml y tenía una tasa de inhibición del 65-67% a una dosis de 0,3 mg/ml, todavía tenía una tasa de inhibición del 37% a una dosis menor de 0,07 mg/ml.

Los experimentos anteriores ilustraron que el extracto de proteoglicano de espirulina podía inhibir claramente la fosforilación del residuo de tirosina de PTK. El posible mecanismo que altera la transducción de la señal mediada por PTK mediante la inhibición de la quinasa de modo que prohíbe el crecimiento maligno de las células tumorales.

10 **Experimento 4. Extracto de proteoglicano de espirulina inductor de la apoptosis en células HL-60 de leucemia humana**

15 La apoptosis, regulada por una serie de genes, es una muerte celular programada. Su turbulencia reguladora estaba estrechamente asociada con la tumorigénesis maligna. Actualmente es bien conocido que muchos fármacos anticancerosos son capaces de inducir la apoptosis en células tumorales y el efecto anticancerosos está relacionado con la capacidad de inducir apoptosis en las células tumorales. La inducción de la apoptosis celular puede ser una vía común para los fármacos anticancerosos que interfieren en el tumor en diferentes mecanismos, de modo que la apoptosis celular se convierte en un procedimiento de evaluación de la eficacia de la cura y la inducción de la apoptosis de las células tumorales también es un objetivo para curar el tumor.

**Experimentos y Resultados**

20 **Electroforesis en gel de agarosa**

25 Cuando se produjo la apoptosis celular, la endonucleasa estaba activa, el ADN se escindió entre nucleosomas para formar fragmentos de ADN de aproximadamente 180-200 pb o múltiplos. La electroforesis en gel de agarosa pudo detectar escaleras de ADN específicas, véase la Figura 4. En la Figura 4, el número de referencia 1 representó un grupo control, el número de referencia 2 representó un grupo de extracto de proteoglicano de espirulina de 1 mg/ml, el número de referencia 3 representó un grupo un grupo de extracto de proteoglicano de espirulina de 3 mg/ml y el número de referencia 4 representó un grupo un grupo de extracto de proteoglicano de espirulina de 6 mg/ml.

Citometría de flujo

30 Cuando se produjo la apoptosis celular, los fragmentos rotos de ADN salieron de las células y la cantidad de ADN en las células disminuyó. El procedimiento de citometría de flujo puede detectar las células antes de la fase G1 (también denominadas células en apoptosis), en las que la cantidad de ADN es menor que la ce las células diploides. Los resultados del experimento se mostraron en la figura 5.

35 El experimento demostró que los extractos de proteoglicano de espirulina tenían efectos inhibidores sobre un amplio espectro de tumores sólidos humanos y leucemia tanto in vitro como in vivo. Inhibió el crecimiento de células tumorales como agente inhibidor de la proteína tirosina quinasa del EGFR bloqueando las vías de señal de la proliferación de las células y también indujo apoptosis en un tumor como inhibidor de la topoisomerasa interfiriendo en la replicación,

transcripción y expresión génica del ADN. Los extractos de proteoglicano de espirulina eran un poco tóxicos y podían usarse clínicamente a largo plazo. Tenía efectos antitumorales significativos y era un claro objetivo, por lo que debería convertirse en un prometedor fármaco para tratar cánceres.

#### 4. Reparación de ADN

#### 5 Experimento 1 Experimento de daños en la médula ósea

Ratones C-57, de peso corporal 18-22 g adquiridos en Animal Center of Chinese University of Medical Sciences. Los ratones se irradiaron con una dosis de 600 rad  $^{60}\text{Co-}\gamma$ , 8,64 rad/min.

Grupos	Células/50mm <sup>2</sup> (Media)	Porcentaje de células prematuradas (Media)	Mitosis celular
Grupo control	140	40	Sí
Grupo de irradiados	31	4	Ninguno
Grupo de dosis menor	72	30	Sí
Grupo de dosis mayor	74	35	Sí
Grupo control positivo	45	35	Sí

Los ratones irradiados se dividieron en grupos de control irradiados, dosis menor, dosis media y dosis mayor. Los ratones del grupo control no se irradiaron. Los ratones del grupo control y el grupo de controles irradiados se trataron sin fármacos, los ratones del grupo de dosis menor se trataron con extractos de proteoglicano de espirulina a una dosis de 10 mg/kg/día, en el grupo de dosis media con extractos de proteoglicano de espirulina a una dosis de 20 mg/kg/día y en el grupo de dosis mayor con extractos de proteoglicano de espirulina a una dosis de 40 mg/kg/día. El segundo día después de la irradiación, en 10 ratones seleccionados de forma aleatoria de cada grupo se realizaron necropsias para obtener secciones de tejido. Las láminas se observaron al microscopio, amplificado 750 veces.

Los resultados del experimento mostrados en la figura 6 demostraron que el daño de la irradiación en los ratones era más significativo en el grupo control irradiado. En este grupo, la médula ósea de los ratones era similar a una red, la proliferación celular en la misma estaba alterada, las células prematuras de la misma sólo ocupaban el 4% y no se observó mitosis. La pared de los capilares sanguíneos en la médula ósea estaba dañada y causaba hemorragia y formaba una "piscina de sangre". Los daños de los ratones en los grupos tratados con fármaco se redujeron.

#### Experimento 2 Determinación de la cantidad de ADN de la médula ósea

Los ratones se irradiaron y trataron como se ha indicado en lo que antecede. El sexto día después de la irradiación, en 10 ratones seleccionados de forma aleatoria de cada grupo se realizaron necropsias. Un fémur intacto sin los tejidos blandos se lavó con 10 ml de solución de  $\text{CaCl}_2$  0,005M para introducir toda la médula ósea en un tubo de centrifuga, se mantuvo a 4°C durante 30 minutos y se centrifugó con 2500 rpm durante 15 minutos. El precipitado se mezcló completamente con 5 ml de solución de  $\text{HClO}_4$  0,2 mol/l, se calentó a 90°C durante 15 minutos y se centrifugó después de enfriar. Se detectó el valor de la DO del sobrenadante a 286 nm. Contenido en ADN: 1DO= 33  $\mu\text{g/ml}$  de ADN

Los resultados experimentales fueron los siguientes:

Grupo	Grupo control	Grupo control irradiado	Grupo de dosis menor	Grupo de dosis media	Grupo de dosis mayor	Grupo control positivo
ADN $\mu\text{g/ml}$	49,04	2,01	2,71	8,94	6,34	3,56
	27,03	2,94	8,42	10	4,82	2,38
	27,92	1,58	7,19	7,79	6,14	4,79
	27,19		4,42		3,7	6,34
Media	32,79	2,18	5,68	8,91	5,25	4,27
P			<0,05	<0,01	<0,01	<0,01

Los resultados también se expresaron como en la Figura 7, que demostraron: El contenido de ADN en el grupo tratado fue mayor que el del grupo control irradiado. Los grupos de dosis media, dosis mayor o control positivo, en comparación con el grupo control irradiado, tenían una diferencia significativa ( $P < 0,01$ ). Mostró que el extracto de acuerdo con la invención protegía las células de médula ósea y, obviamente, tenía un efecto de reparación sobre el ADN.

## 5. Experimento antiviral

### Patología clínica:

Paciente 1: XXX, varón, de mediana edad, granjero de Daxing County, Beijing. Sufrió hepatitis viral y, después, desarrolló cirrosis. Después de 10 años, presentó fluido ascítico y hemorragia graves en el tracto digestivo. Después de tratar con una cápsula hecha de extractos de proteoglicano de espirulina de acuerdo con la invención dos veces al día, 1 cápsula cada vez, había menos fluido ascítico y gran hemorragia tras 60 días, había poco fluido ascítico tras 90 días y pudo seguir con sus quehaceres cotidianos y se recuperó. En 1999, se sometió a una TC en el hospital, se comparó con el resultado de la TC de hace 10 años, el foco no se había expandido ni empeoró. De acuerdo con los patólogos, era raro que en un paciente no aumentara el foco sufriendo cirrosis durante 10 años.

Paciente 2: XXX, director de un colegio de primaria en Beijing, tenía cirrosis porque no se curó bien una hepatitis viral, seguida de fluido ascítico abundante y gran hemorragia en el tracto digestivo, iba a morir. Después de tratar al paciente con extractos de proteoglicano de espirulina, dos veces al día, una cápsula cada vez, durante 60 días, se observó menos fluido ascítico obviamente y ya no había gran hemorragia. Después de tratar durante 90 días, había poco fluido ascítico; después de tratar con el fármaco durante 180 días, pudo seguir con sus quehaceres cotidianos, volver al trabajo y sentirse bien. En 1999 se realizó una TC en hospital 301 y no se encontró foco. Los patólogos creen que había pruebas para considerar que el virus había sido inhibido.

## 6. Reparación de los daños en la membrana mucosa

Ratones C-57, de peso corporal 18-22 g adquiridos en Animal Center of Chinese University of Medical Sciences. Los ratones se irradiaron con una dosis de 600 rad  $^{60}\text{Co-}\gamma$ , 8,64 rad/min.

Los ratones irradiados se dividieron en grupos de control irradiados, dosis menor, dosis media y dosis mayor. Los ratones del grupo control blanco no se irradiaron. Los ratones del grupo control blanco y del grupo control irradiado se trataron sin fármacos. Los ratones del grupo de dosis menor se trataron con extractos de proteoglicano de espirulina de acuerdo con la invención a una dosis de 10 mg/kg/día, en el grupo de dosis media a una dosis de 20 mg/kg/día y en el grupo de dosis mayor a una dosis de 40 mg/kg/día. El séptimo y el decimocuarto día después de la irradiación, en 10 ratones seleccionados de forma aleatoria de cada grupo se realizaron necropsias y se obtuvieron secciones de tejido de intestino delgado. Las láminas se observaron al microscopio, se fotografiaron y se contaron.

Datos del experimento mostrados: Para los ratones en el grupo control, la radiación generó muchos daños en las células epiteliales de la membrana mucosa del intestino delgado, causó daños en las células epiteliales de la membrana mucosa de los ratones dañados incluso rotura. Esto también desnudó el estrato de las células. No obstante, los daños de la irradiación en las células epiteliales de la membrana mucosa del intestino delgado de los ratones en el grupo tratado fue mucho menor en comparación con el grupo control.

## 7. Potenciación del sistema inmunitario

### Experimento 1 Contenido de $\gamma$ globulina

Ratones C-57, de peso corporal 18-22 g adquiridos en Animal Center of Chinese University of Medical Sciences se irradiaron con una dosis de 600 rad  $^{60}\text{Co-}\gamma$ , 8,64 rad/min.

Los ratones irradiados se dividieron en un grupo control irradiado y un grupo tratado irradiado. Los ratones del grupo control y del grupo control tratado no se irradiaron. Se obtuvo sangre de las bolsas de los ojos de los ratones, se centrifugó y se obtuvo el suero. Con el suero se realizó un análisis cromatográfico tras la tinción. El contenido de  $\gamma$ -globulina en suero se calculó de acuerdo con los valores máximos.

Los resultados fueron los siguientes:

Grupo	Media del porcentaje de $\gamma$ globulina ( $\pm$ SD)
Control	10,07 $\pm$ 3,57
Control tratado	12,84 $\pm$ 6,75
Control irradiado	6,19 $\pm$ 4,96
Tratados irradiados	13,32 $\pm$ 6,73

5 Los resultados también se expresan como en la Figura 8, que demostró que los ratones del grupo irradiado y del grupo no irradiado, el porcentaje de  $\gamma$ -globulina de los ratones en el grupo tratado fue mayor que en del grupo control correspondiente. Ya que el contenido de  $\gamma$ -globulina representa la función inmunitaria de un cuerpo, el incremento del porcentaje de  $\gamma$ -globulina mostró una mejora de la función inmunitaria de un cuerpo.

#### Experimento 2 Ensayo de linfocitos T

10 Ratones de 18-22 g de peso corporal se dividieron aleatoriamente en un grupo control blanco, grupo control positivo, un grupo de dosis mayor y un grupo de dosis menor, con 10 ratones por grupo. En los ratones en los grupos tratados se inyectó CTX a:

15 una dosis de 10mg/kg/d y después se trató con extractos de proteoglicano de espirulina por vía oral a la misma dosis que antes. Los ratones del grupo control positivo se trataron con CTX a una dosis de 10 mg/kg/d y después se trataron con agua por vía oral, los ratones del grupo control sólo se trataron con agua por vía oral, después de continuar el tratamiento durante 10 días, el tratamiento se detuvo durante 2 días. Se obtuvo sangre de las bolsas de los ojos de los ratones para obtener porciones de linfocitos. Después de incubar y teñir se determinó el porcentaje de linfocitos T.

Los resultados se muestran del siguiente modo:

Grupos	Linfocitos T	Valor p
Control	28,0 $\pm$ 2,55	
Control positivo	25,6 $\pm$ 2,51	
Dosis mayor	39,8 $\pm$ 7,4	<0,01
Dosis menor	33,2 $\pm$ 6,3	<0,05

20 Los resultados también se expresaron como en la Figura 9, que demostró que tras inyectar a los ratones CTX, el contenido en linfocitos T de los ratones disminuyó significativamente. No obstante, el contenido en linfocitos T de los ratones en el grupo tratado aumentó, especialmente en el grupo de dosis mayor,  $P < 0,01$ . Esto demostró que los extractos de proteoglicano de espirulina de acuerdo con la invención tenían función de potenciación de la función inmunitaria de un cuerpo y protección de las células de médula ósea.

25 8. Extractos de proteoglicano de espirulina sobre la proliferación de las células madre/progenitoras hematopoyéticas CD43+

#### Materiales y procedimientos:

Todas las células se cultivaron con los correspondientes factores celulares a 37°C en medio RPMI 1640 con 15% de FCS en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Células madre/progenitoras hematopoyéticas CD34+ en sangre de cordón umbilical

5 Una muestra de sangre de cordón umbilical procedió del People Hospital, Department of Gynaecology and Obstetrics, Beijing Medical University. La concentración final de heparina fue de 20 U/ml. La muestra se sometió a detección selectiva de células CD34+ en las 5 horas posteriores a la recolección de la sangre. La sangre de cordón umbilical se diluyó con PBS. Los eritrocitos se precipitaron con 0,1% de metilcelulosa y se recogió el sobrenadante. Se separaron los monocitos (MNC) con medio de separación de linfocitos. Se usaron QBEND-10 como anticuerpo de CD34 y perlas inmunes de IgG1 anti-ratón (Miltenyi Biotec Co. Alemania). Las células marcadas se pasaron a través de una columna de separación en un campo magnético y las células no marcadas se eliminaron mediante elución. Se retiró la columna del campo magnético y se eluyó a presión. Se recogieron las células CD34+ y se contaron.

Factores celulares

10 Los factores celulares y la fabricación de los mismos en el cultivo de células CD34 se indican a continuación:

Factores celulares en el cultivo y fuentes de los mismos

Factores	Fuentes
FL	Immunex
Tpo	Glaxo
SCF	Sandos
IL-6	Sandos
IL-3	Sandos
G-CSF	Amgen
GM-CSF	Amgen

Anticuerpo

15 Los anticuerpos monoclonales usados en una citometría de flujo incluidos CD34-FITC, HLA-DR-FITC, CD33-PE, CD1a-PE, CD42b-PE procedían de Pharmingen Co.

Detección de efectos sobre la proliferación y diferenciación de las células madre/progenitoras hematopoyéticas CD43+

20 células madre/progenitoras hematopoyéticas CD43+ se cultivaron en un medio que consisten en IMDM, 15% FCS, 15% HS, FL 40 ng/ml, Tpo 20 ng/ml, SCF 200 ng/ml, IL-6 10 ng/ml, IL-3 10 ng/ml y 2X10<sup>4</sup> u/ml de G-CSF. Las células CD34+ se incubaron y cultivaron en una placa de 24 pocillos, 3X10<sup>4</sup> células/ml, 1ml/célula. 3 células, como grupo, se trataron con extractos de proteoglicano de espirulina a una dosis de , 0,2, 0,4 y 0,8 mg/ml, respectivamente. Las células se cultivaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5% y una humedad saturada, y se añadieron factores de riesgo cada 48 horas. Después de cultivar durante diez días, se recogieron las células y se detectaron según el fenotipo celular con el correspondiente anticuerpo fluorescente.

**Resultados del experimento:**

25 En presencia de FL, TPO, SCF, IL-6, IL-3 y G-CSF, la proliferación de células CD34+ mostraron una relación negativa con las concentraciones de los extractos de proteoglicano de espirulina. Es decir, en ausencia de extractos de proteoglicano de espirulina, la proliferación y diferenciación celular estaban activos, y el número de células y la tasa de diferenciación aumentaron. Después de cultivar durante 10 días, la mayoría de las células CD34+ se diferenciaron en células maduras.

30 Con el incremento de las concentraciones de los extractos de proteoglicano de espirulina, la proliferación celular disminuyó y la deformación células y las células de anclaje aumentaron al microscopio. Esto demostró que los extractos de proteoglicano de espirulina podían invertir la proliferación de células CD34+ reforzadas por factores celulares y podían disminuir la tasa de diferenciación de las células CD34+. Después del cultivo, el porcentaje de células CD34+ y las células progenitoras granulares y nucleares en los grupos tratados fue mayor que el de los grupos sólo tratados con factores celulares.

35 Tratadas con diferentes concentraciones de extractos de proteoglicano de espirulina, las células CD34+ se detectaron mediante citometría de flujo tras cultivar durante 10 días. Los resultados se muestran a continuación:

Concentración de los extractos de proteoglicano de espirulina (mg/ml)	Porcentaje de células (%)				
	CD34+	CD34+CD33+	CD34+CD42b+	CD1a+	HLA-DR+
0	0,07	0,08	0	1,7	26,87
0,2	1,1	0,71	0,16	13,09	73,94
0,4	4,83	2,08	1,77	23,12	86,49
0,8	25,75	7,78	9,03	19,02	80,98

5 A partir de la tabla anterior, cuando se incrementó la concentración de extractos de proteoglicano de espirulina, el contenido de células CD34+ aumentó en consecuencia de forma significativa. Así era el contenido de células CD34+CD33+ que representan células progenitoras granulares y del núcleo y de las células CD34+CD42b+ que representan células progenitoras de monocitos. También a partir de la tabla anterior, se mostró el contenido de CD1a+ y HLA-DR+ que representan células dendríticas (CD) aumentó significativamente con el incremento de las concentraciones de los extractos de proteoglicano de espirulina. Muchas células dendríticas típicas aparecieron en el cultivo. Esto indicó que los extractos de proteoglicano de espirulina de acuerdo con la invención tenían efectos sobre la inducción para diferenciar las células CD34+ en células dendríticas, alcanzando un máximo a una dosis de 0,4 mg/ml de los extractos. Los extractos de proteoglicano de espirulina estimulan los linfocitos para secretar factores celulares.

15 La tabla siguiente mostró que los extractos de proteoglicano de espirulina con diferentes posologías estimulaban los linfocitos para secretar IL-2, IL-3, GM-CSF e IFN- $\gamma$ . Mostró que los extractos de proteoglicano de espirulina tenían efectos significativos sobre la estimulación de los linfocitos para secretar GM-CFS, que estaban relacionados con la dosificación de los extractos usados. Con el incremento de la dosificación de los extractos de proteoglicano de espirulina usados, la secreción de GM-CSF aumentó de forma correspondiente. Cuando la concentración de los extractos de proteoglicano de espirulina era de 0,8 mg/ml, la cantidad de GM-CSF fue de 1,15 veces la observada en los grupos no tratados. No obstante, los efectos de la estimulación de los extractos de proteoglicano de espirulina sobre la secreción de IL-2, IL-3 e IFN- $\gamma$  no eran significativos.

20 Los extractos de proteoglicano de espirulina estimulan los linfocitos de sangre periférica humana para secretar citocinas

Extractos de proteoglicano de espirulina (mg/ml)	0	0,2	0,4	0,8
GM-CSF (pg/ml)	20,4	67,3	196,2	235,3
IL-2 (pg/ml)	0	1,2	0,0	0,0
IL-3 (pg/ml)	3,2	3,2	2,9	3,0
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	13,8	12,5	12,8	13,0

#### Conclusión:

25 1. Los extractos de proteoglicano de espirulina podrían regular de forma negativa la proliferación de células madre/progenitoras hematopoyéticas CD34+ umbilicales en presencia de factores celulares y ralentizar considerablemente la diferenciación de las células CD34+. En el sistema de cultivo de células CD34+, con el incremento de las concentraciones de extractos de proteoglicano de espirulina, el contenido de células madre/progenitoras hematopoyéticas CD34+, células progenitoras mieloides CD34+CD33+ y células progenitoras macronucleares CD34+CD42b+ fue mucho mayor que en el grupo en el que sólo se añadieron factores celulares. Esto reveló que los extractos de proteoglicano de espirulina podrían inhibir parcialmente la proliferación de CD34+ por factores celulares, ralentizar la diferenciación de células madre/progenitoras hematopoyéticas elevan la proporción de las células progenitoras mieloides y macronucleares, y mantienen la hemopoyesis durante más tiempo. Era esperable que en un experimento animal, el reclutamiento de mielocitos y plaquetas por los extractos de proteoglicano de espirulina se realizaría más tarde que por los factores celulares, pero el mantenimiento de mielocitos y plaquetas sería evidente.

35 2. Las células dendríticas (CD) es la célula presentadora de antígenos más eficaz (APC), que desempeña un papel importante en la reacción inmunitaria del huésped- Puede reconocer las células mutantes, transferir señales a células

efectoras y, al final, matar células tumorales. In vivo, las CD suelen ser demasiado escasas como para realizar funciones. Por tanto, cómo aumentar el número de CD se convierte en uno de los objetivos al estudiar la inmunoterapia antitumoral y su aplicación clínica. Aunque en la presente invención no se añaden al medio de cultivo factores inducidos por CD, tales como GM-CSF, IL-4 o TNF- $\alpha$ , la proporción de células Cd1a+ and HLA-DR+ (importante marcador de superficie de las CD) aumenta junto con el incremento de las concentraciones de extractos de proteoglicano de espirulina. Se demuestra que los extractos de proteoglicano de espirulina pueden inducir la diferenciación de la células madre/progenitoras hematopoyéticas CD34+ en CD. Cuando las concentraciones de extractos de proteoglicano de espirulina son de 0,4 mg/ml, la eficiencia inducida se convierte en la más elevada (el contenido de células CD1a+ and HLA-DR+ aumentó respectivamente de 1,70% y 26,87% a 23,14% y 86,49% en el grupo control). Esto implica que los extractos de proteoglicano de espirulina tienen un potencial valor y tienen amplias perspectivas en la inmunoterapia antitumoral.

3. Los extractos de proteoglicano de espirulina pueden estimular considerablemente los linfocitos para secretar GM-CSF, con una relación típica con la dosificación de los extractos. La secreción de GM-CSF aumenta obviamente junto con el incremento de las concentraciones de extractos de proteoglicano de espirulina (la secreción de GM-CSF aumentó 11,5 veces con una concentración de 0,8 mmg/ml). Revela que los extractos de proteoglicano de espirulina pueden mejorar la recuperación de la función hematógica y tienen amplios efectos sobre la estimulación de la proliferación de las células hepatopoyéticas. Además, GM-CSF es uno de los factores celulares más importantes para estimular la proliferación, maduración y función de las CD, que es uno de los posibles mecanismos de la formación de CD inducida por extractos de proteoglicano de espirulina de acuerdo con la invención.



**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un extracto de proteoglicano de espirulina que se puede obtener mediante un procedimiento que comprende las etapas de:
  - a) disolver la espirulina en polvo seco en 5-20 veces de agua en peso y romper las paredes celulares de espirulina;
- 5      b) calentar una solución obtenida de la etapa a) a 60-100 °C y enfriar la solución calentada para separar una fase líquida de la solución;
- c) ajustar el pH de dicha fase líquida a 3,8-4,2 y filtrar dicha fase líquida para obtener un filtrado; y
- d) ajustar el filtrado a un pH de 7 y concentrar el filtrado.
- 10     2.- El extracto de proteoglicano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha agua en la etapa a) es 8-15 veces en peso de dicho polvo seco de espirulina
- 3.- El extracto de proteoglicano de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha agua en la etapa a) es 10 veces en peso de dicho polvo seco de espirulina.
- 4.- El extracto de proteoglicano de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha etapa b) se realiza a una temperatura de entre 80°C y 95°C.
- 15     5.- El extracto de proteoglicano de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicha etapa b) se realiza a una temperatura de 90 °C.
- 6.- El extracto de proteoglicano de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha etapa b) comprende además secar el filtrado.
- 20     7.- Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un componente activo que consiste un extracto de proteoglicano de espirulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 con o sin un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25     8.- La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha composición se usa como composición anticancerosa, una composición de mejora de hemogramas, composición anti-irradiación, composición reparadora de ADN, composición antiviral, composición potenciadora del sistema inmunológico o composición activadora de las células similares a las dendritas.
- 30     9.- Un procedimiento para preparar un extracto de proteoglicano de espirulina, que incluye las etapas de:
  - a) disolver la espirulina en polvo seco en 5-20 veces de agua en peso y romper las paredes celulares de espirulina;
  - b) calentar una solución obtenida de la etapa a) a 60-100 °C y enfriar la solución calentada para separar una fase líquida de la solución;
  - c) ajustar el pH de dicha fase líquida a 3,8-4,2 y filtrar dicha fase líquida para obtener un filtrado; y
  - d) ajustar el filtrado a un pH de 7 y concentrar el filtrado.
- 35     10.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha agua en la etapa a) es 8-15 veces en peso de dicho polvo seco de espirulina
- 11.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha agua en la etapa a) es 10 veces en peso de dicho polvo seco de espirulina
- 12.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicha etapa b) se realiza a una temperatura de entre 80°C - 95°C.
- 40     13.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en la que dicha etapa b) se realiza a una temperatura de 90 °C.
- 14.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicha etapa b) comprende además secar el filtrado.

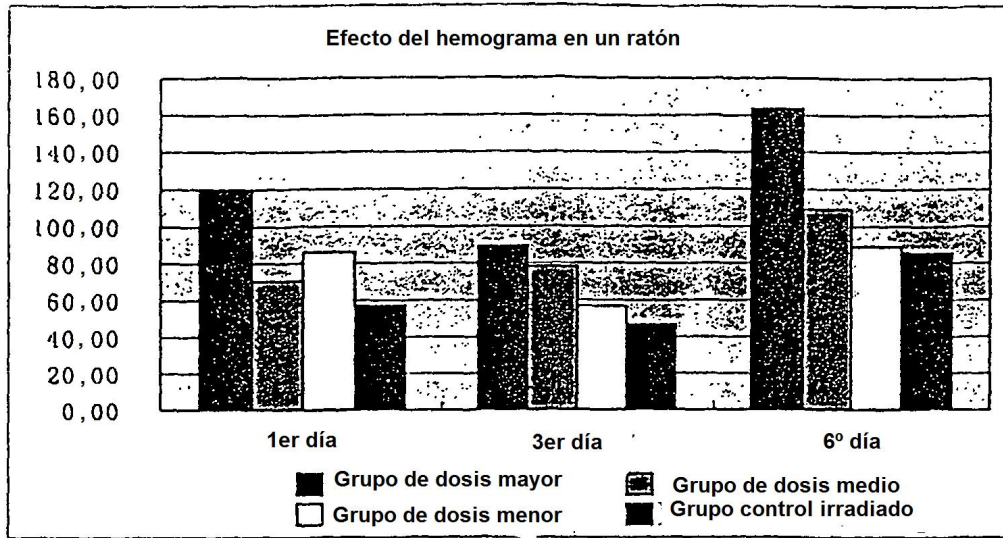


Fig. 1

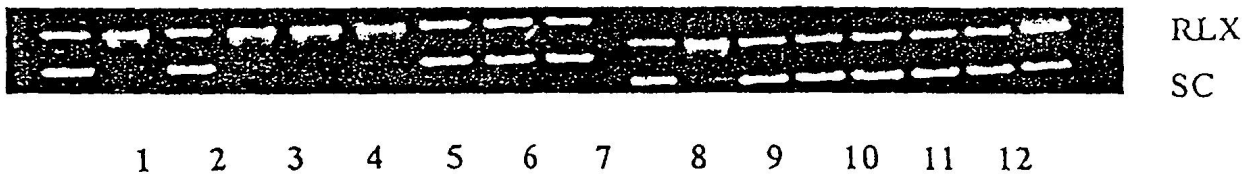


Fig. 2

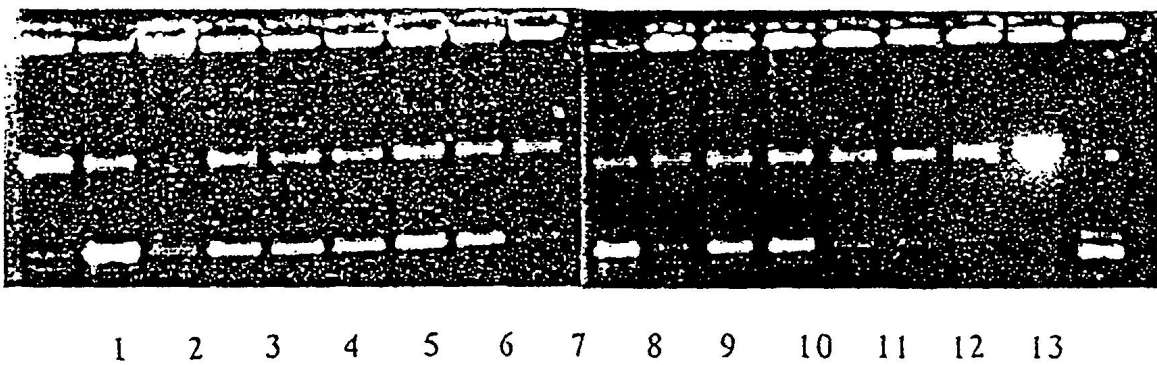


Fig. 3



Fig. 4

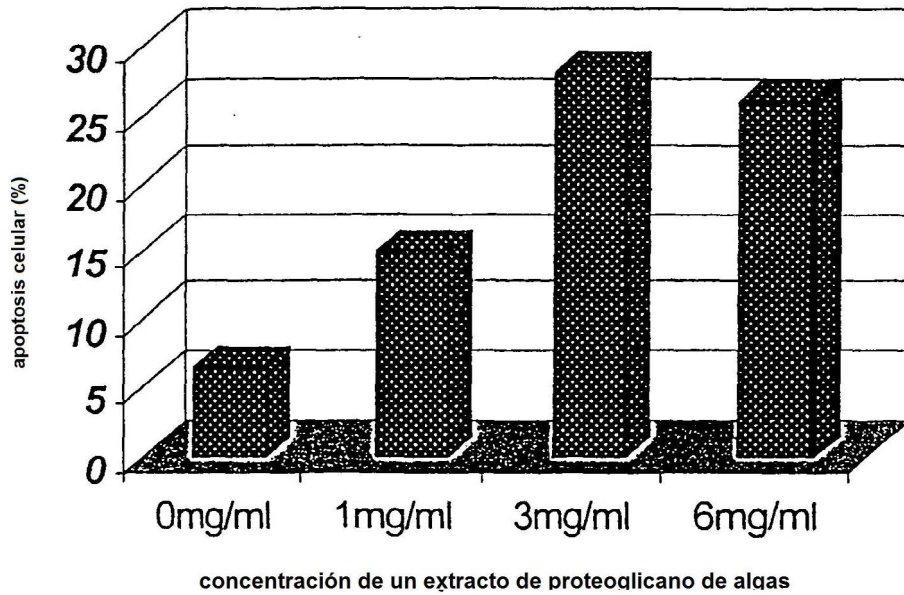


Fig. 5

Efecto de diferentes composiciones sobre las células de médula ósea en un ratón *in a mice*

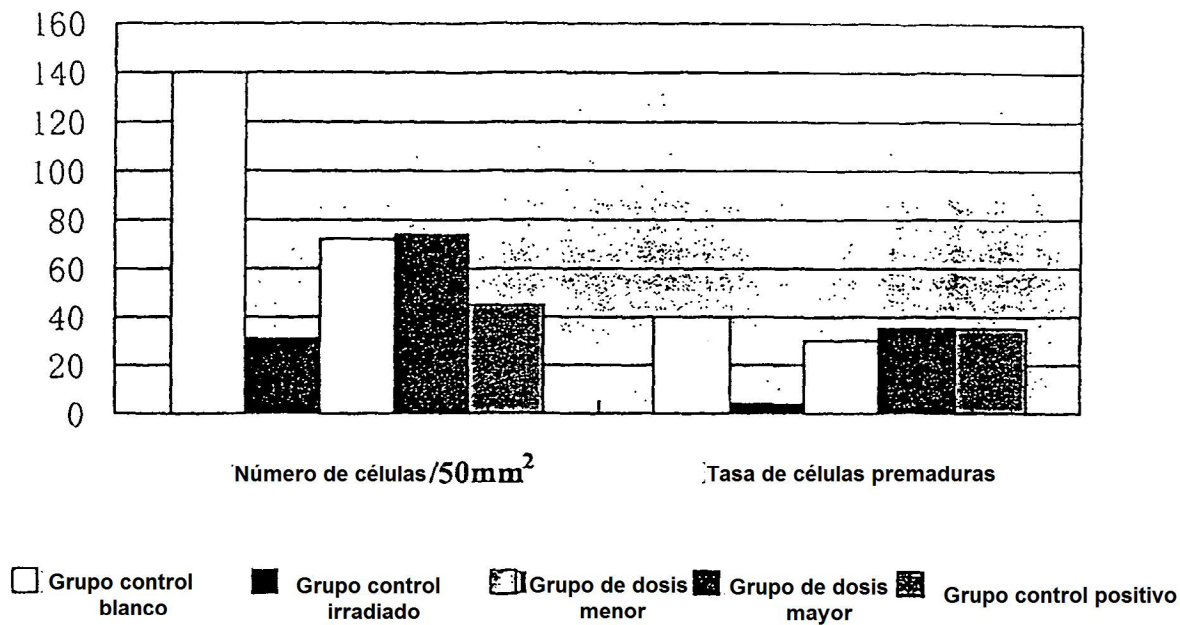


Fig. 6

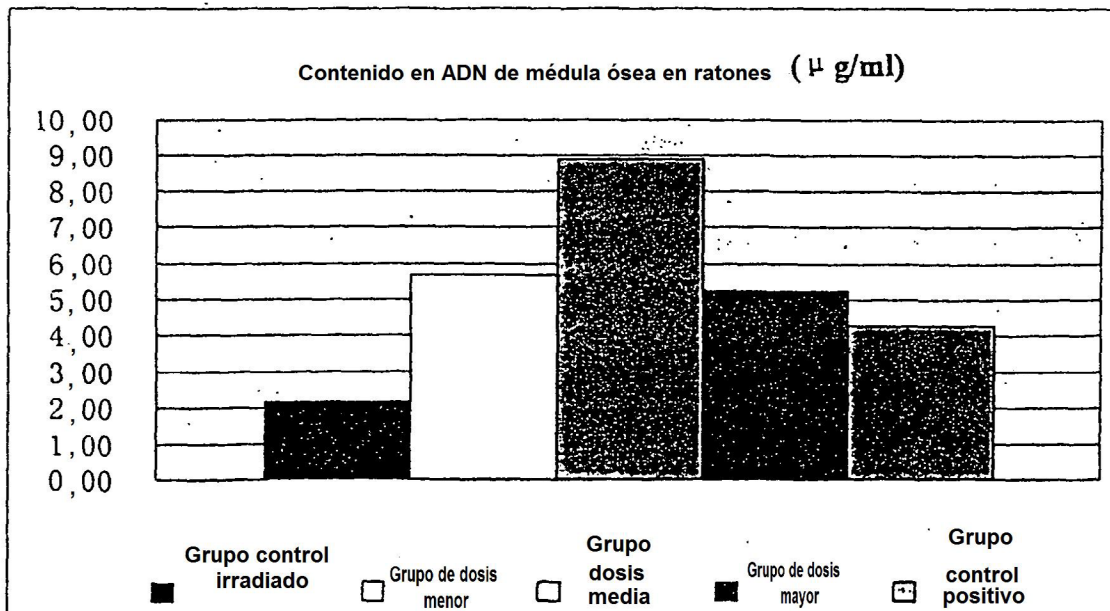


Fig. 7

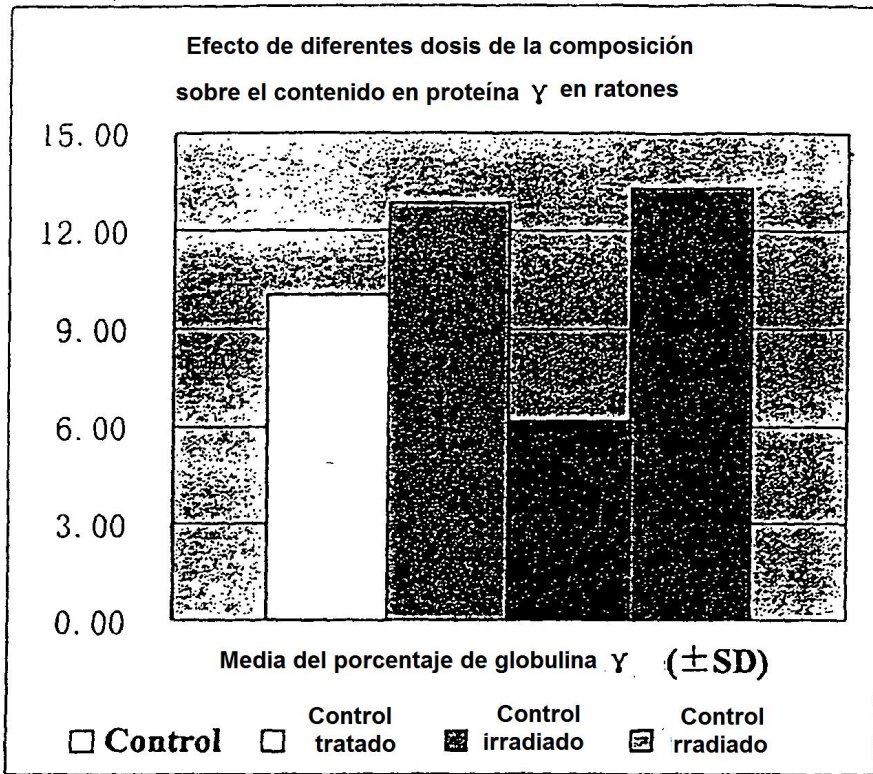


Fig. 8

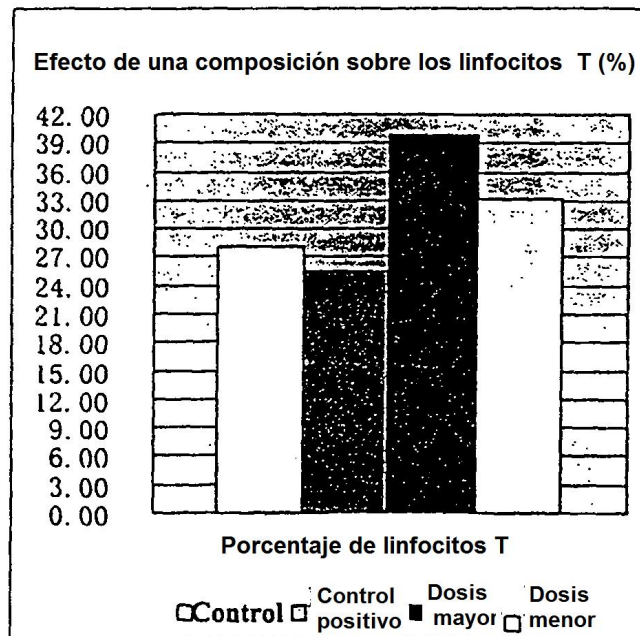


Fig. 9