



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102018005595-0 A2



(22) Data do Depósito: 21/03/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 01/10/2019

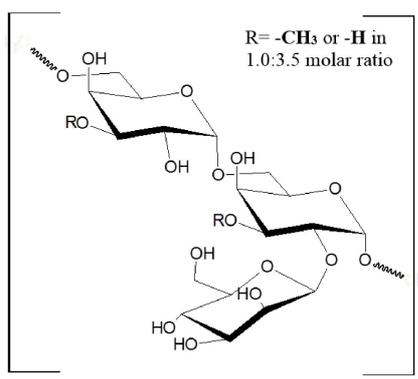
(54) **Título:** MANOGALACTANA PARCIALMENTE METILADA DE COGUMELO PLEUROTUS ERYNGII POSSUI ATIVIDADE ANTITUMORAL

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/715; A61K 31/655; A61K 36/07; A61P 35/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA.

(72) **Inventor(es):** STELEE MARCELA PETRIS BISCAIA; ELAINE ROSECHRRER CARBONERO; EDVALDO DA SILVA TRINDADE; CÉLIA REGINA CAVICHILO FRANCO; CAROLINA CAMARGO DE OLIVEIRA; ROGER CHAMMAS; MARCELO IACOMINI.

(57) **Resumo:** Câncer é um grupo de doenças que possuem crescimento desordenado de células, sendo uma das principais causas de morte no mundo, com as estatísticas apontando para um crescimento de 70% nos próximos 20 anos (WHO, 2016). Dentre os principais tratamentos existentes, todos apresentam efeitos colaterais. Assim, a busca por novas moléculas, que tenham ação antitumoral e sem toxicidade é necessária (PATEL; GOYAL, 2012). Desta forma, apresentamos a Manogalactana parcialmente metilada extraída de *Pleurotus eryngii* King Oyster, a qual possui atividade biológica antitumoral, antimelanoma e também atividade adjuvante a quimioterapia dacarbazina, quando testada em camundongos, sem apresentar toxicidade tanto in vitro quanto in vivo (BISCAIA et al., 2017).



Atividade antitumoral da manogalactana parcialmente metilada de cogumelo *Pleurotus eryngii*

Campo da Invenção

[001]. Declaramos o novo uso medicoda Manogalactana parcialmente metilada (MG-Pe) extraída de cogumelo *Pleurotus Eryngii* “King Oyster”, a qual apresenta atividade biológica antitumoral/antimelanoma e adjuvante a quimioterapia (com dacarbazina), sem apresentar efeitos colaterais e tóxicos.

A invenção apresenta proposta no campo da saúde humana e animal.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002]. Câncer é um grupo de doenças que possuem crescimento desordenado de células, sendo uma das principais causas de morte no mundo (INCA, 2016), e as estatísticas demonstram um crescimento de 70% de novos casos nos próximos 20 anos (WHO, 2016). Dentro os principais tratamentos antitumorais existentes no mercado, não há medicamentos com total eficácia, e também o grande problema atual é a citotoxicidade e os efeitos colaterais que estas moléculas atuais causam nos pacientes tratados. Desta forma, a busca de novas moléculas antitumorais, que não apresentem citotoxicidade é de alta relevância

[003]. Assim, polissacarídeos, em especial, os extraídos de cogumelos comestíveis, estão sendo explorados como novos agentes terapêuticos, como novo uso médico, e estão sendo considerados como um avanço na terapia anticâncer nos últimos anos (PATEL; GOYAL, 2012).

[004]. Desta forma, mostramos aqui que um polissacarídeo extraído de *Pleurotus eryngii*, a manogalactana parcialmente metilada

(MG-Pe), apresenta novo uso médico, caracterizado por ser na preparação de um medicamento para tratar: 1) a doença do câncer, 2) do câncer de pele do tipo melanoma e, 3) quando administrado em conjunto com uma quimioterapia já utilizada na rede do Sistema Único de Saúde – SUS para tratar o melanoma, potencializa o efeito desse quimioterápico.

[005]. Moléculas de manogalactana já foram patenteadas, porém sem nenhum relato de ação biológica, apenas com o intuito de serem acrescentadas na fabricação de materiais como papéis, e são utilizadas para melhorar resistência, cor, viscosidade, entre outros parâmetros de materiais.

[\(http://www.freepatentsonline.com/result.html?p=1&edit_alert=&srch=xprsrch&query_txt=mannogalactan&uspat=on&date_range=all&stemming=on&sort=relevance&search=Search;](http://www.freepatentsonline.com/result.html?p=1&edit_alert=&srch=xprsrch&query_txt=mannogalactan&uspat=on&date_range=all&stemming=on&sort=relevance&search=Search;)

[https://worldwide.espacenet.com/searchResults?search=mannogalactan&DB=EPODOC&submitted=true&locale=en_EP&ST=singleline&compact=false&DB=EPODOC&query=mannogalactan\).](https://worldwide.espacenet.com/searchResults?search=mannogalactan&DB=EPODOC&submitted=true&locale=en_EP&ST=singleline&compact=false&DB=EPODOC&query=mannogalactan)

Descrição da abordagem do problema técnico

[006]. Com o objetivo de buscar um novo uso médico de uma molécula específica, nosso grupo testou um polissacarídeo, extraído de um cogumelo comestível (*Pleurotus eryngii* - "King Oyster") chamado de manogalactana parcialmente metilada.

[007]. Esta manogalactana parcialmente metilada apresentou novo uso médico, caracterizado por ser na preparação de um medicamento, com efeito antitumoral, antimelanomas animais tratados, sem apresentar citotoxicidade e também apresentou um efeito adjuvante a dacarbazina, potencializando o efeito quimioterápico (de um composto padrão já utilizado pelo Sistema Único de Saúde – SUS).

Descrição detalhada da Invenção

[008]. O polissacarídeo, com novo uso médico de ação antitumoral é uma manogalactana parcialmente metilada extraída de *Pleurotus eryngii*, e aqui é denominado de MG-Pe. O MG-Pe é um heteropolissacarídeo composto por manose, galactose e 3-O-metil galactose (Fig. 1 e Tabela 1). Apresenta uma cadeia principal composta por galactose e 3-O-metil galactose, ambas apresentando ligação do tipo $\alpha 1 \rightarrow 6$, as quais podem apresentar-se substituídas em O-2 por β -D-manose (BISCAIA et al., 2017).

UNIDADES							6		O-CH ₃
							a	b	
→2,6)-α-D-Galp-(1→ (Resíduo A)	³ C	01.14	9.84	1.36	2.44	1.76	9.87		
	H	.142	.96	.98	.02	.18	.72	.89	
→2,6)-α-D-Galp-(1→ (Resíduo B)	³ C	01.46	9.79	1.36	2.56	1.78	9.87		
	H	.137	.00	.00	.07	.14	.72	.89	
→2,6)-3-O-Me-α-D-Galp-(1→ (Resíduo C)	³ C	00.92	8.69	1.02	8.83	1.70	0.00		9.5
	H	.126	.02	.68	.30	.20	.73	.88	.48
→6)-α-D-Galp-(1→ (Resíduo D)	³ C	00.83	1.22	2.34	2.06	1.70	9.45		
	H	.998	.87	.89	.10	.20	.69	.91	
→6)-α-D-Galp-(1→ (Resíduo E)	³ C	01.04	1.22	2.27	2.00	1.70	9.45		
	H	.994	.82	.91	.05	.20	.69	.92	
→6)-3-O-Me-α-D-Galp-(1→ (Resíduo F)	³ C	00.68	0.22	1.82	8.36	1.56	9.59		9.2
	H	.990	.88	.55	.28	.17	.70	.90	.46
β-D-Manp-(1→ (Resíduo G)	³ C	04.35	3.24	5.88	9.76	9.05	4.00		
	H	.805	.11	.64	.64	.39	.77	.92	
β-D-Manp-(1→ (Resíduo H)	³ C	04.44	3.35	5.77	9.76	9.06	4.00		
	H	.780	.09	.67	.62	.39	.78	.95	

Tabela 1 - Caracterização da manogalactana de *P. eryngii* por ¹³C e ¹H.
(A) As atribuições são baseadas nas análises de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC-

TOCSY, e HSQC-DEPT. (B) Os valores dos desvios químicos foram registrados com referência ao TMS como padrão interno. Fonte: (BISCAIA et al., 2017).

[009]. Para a avaliação da atividade biológica, foram utilizadas células de melanoma murino, da linhagem B16-F10, que foram obtidas do banco de células ATCC. Estas células foram cultivadas em garrafas (Corning), com meio RPMI (GIBCO CAT 31600-026), suplementado com 10% de SFB - Soro Fetal Bovino (GIBCO, CAT 10270-106, USA), e então mantidas em incubadora de CO₂ a 37° C, em atmosfera úmida, com 5% CO₂.

[010]. Experimentos "in vitro" foram realizados, como para o teste de citotoxicidade como MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide - SIGMA, St. Louis, Missouri, EUA, M5655), como descrito em Mosmann, 1983. Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o ensaio de Vermelho neutro (SIGMA, N6634) como descrito em Borenfreund & Puerner, 1985; e Azul de Tripán (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA, CAT 15250) como descrito em Phillips, 1973; e também o 7AAD (BD Biosciences, Franklin, Lakes, Nova Jersey, EUA CAT 559763), de acordo com as instruções do fabricante.

[011]. Todos os ensaios de citotoxicidade "in vitro" demonstraram que MG-Pe não altera nenhum parâmetro de viabilidade em relação ao controle analisado (BISCAIA et al., 2017).

[012]. Quando foi analisado o efeito "in vivo" da ação antimelanoma de MG-Pe, as células foram mantidas em cultivo, como descrito acima (item 009). Após cultivo, 5.10⁵ células viáveis foram injetadas subcutaneamente no flanco dorsal direito de cada animal – dia zero. No dia 5, o tratamento com MG-Pe foi iniciado com injeções intraperitoniais diárias, e os grupos avaliados foram: Controle (somente veículo), MG-Pe (50mg/kg de animal), DTIC (dacarbazina 80mg/kg de animal) e MG-Pe + DTIC (50 mg/kg de animal + dacarbazina 80mg/kg

de animal). Durante os 15 dias de experimento os animais foram monitorados diariamente, quanto ao volume do tumor.

[013]. Ao final de 15 dias os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina, coletados sangue, órgãos e tumor, e então eutanasiados por deslocamento cervical, de acordo com o painel de eutanásia da *American Veterinary Medical Association (Report of the AVMA Panel on Euthanasia - 2007)* e da Resolução nº 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), de 11 de Maio de 2012. Ao final do experimento, as carcaças foram encaminhadas para descarte de lixo biológico da Instituição.

[014]. Como mostra a figura 2, o grupo tratado (MG-Pe) mostrou redução no volume tumoral em 60% em relação ao grupo não tratado (Veículo) (**p=0.0039). Também pode-se visualizar no gráfico que o veículo em relação ao quimioterápico dacarbazina (DTI) mostra efeito redutor (*p=0.0273), mas é um efeito inferior comparado ao tratado com MG-Pe. No entanto quando comparados os grupos MG-Pe e DTI não há diferença estatística (p=0,3223), mostrando que uma molécula sem efeitos colaterais possui o mesmo efeito de um quimioterápico padrão utilizado pelo Sistema Único de Saúde - SUS. E surpreendentemente, quando tratamos os animais com o quimioterápico dacarbazina (DTI) em conjunto com a manogalactana (MG-Pe) os efeitos são maiores, mostrando uma redução em torno de 80% em relação ao grupo veículo (**p=0.0020). Ao final dos experimentos "in vivo" a molécula MG-Pe, apresentou novo uso médico por tratar a doença do câncer.

Citação das Figuras

[015]. Figura 1. Estrutura química do polissacarídeo da manogalactana obtida de *Pleurotus eringii*. Fonte: (BISCAIA et al., 2017).

[016].Figura 2. Ação antitumoral da manogalactana parcialmente metilada de *Pleurotus eringii*. Experimento realizado em triplicata experimental com n=5, em animais C57Bl/6, em modelo de tumor sólido, inoculadas células de melanoma murino B16-F10 (Mean and Error, SD, Test-t paramétrico, com pós teste de Wilcoxon). [Veículo] x [DTI (dacarbazina)] → *p=0,0273; [DTI] x [MG-Pe (manogalactana)] → p=0,3223; [MG-Pe] x [DTI+ MG-Pe] → **p=0,0059; [DTI] x [DTI+ MG-Pe] → **p=0,0020.

Referências:

[017]. BISCAIA, S. M. P. et al. Safe Therapeutics of Murine Melanoma Model Using A Novel Antineoplastic, The Partially Methylated Mannogalactan From *Pleurotus eryngii*. **Carbohydrate Polymers**, set. 2017.

[018]. BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, n. 1, p. 7–9, 1985.

[019].INCA. **O que é o câncer? - INCA**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>.

[020].MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

[021].PATEL, S.; GOYAL, A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. **Biotech**, v. 2, n. 1, p. 1–15, 25 mar. 2012.

[022].WHO. **WHO - Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso da manogalactana parcialmente metilada, extraída do cogumelo *Pleurotus eringii*, **caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar a doença do câncer.
2. Uso da manogalactana parcialmente metilada, extraída do cogumelo *Pleurotus eringii*, de acordo com as reivindicação 1, **caracterizado pela** sua aplicação na preparação de um medicamento para tratar a doença do câncer de pele, do tipo melanoma.
3. Uso da manogalactana parcialmente metilada, extraída do cogumelo *Pleurotus eringii*, de acordo com a reivindicação 1 e 2, **caracterizada pela** sua composição por manose (32,9%), galactose (52,1%) e 3-Ometil galactose (15%), apresentando ligação do tipo α 1 - 6, e massa molecular de $20,9 \times 10^3$ g/mol no uso médico associado como agente antitumoral, antimelanoma e/ou adjuvante à quimioterapia.
4. Uso da manogalactana parcialmente metilada, extraída do cogumelo *Pleurotus eringii*, de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, **caracterizada pela** inexistência de efeitos colaterais e tóxicos no uso médico associado como agente antitumoral, antimelanoma e/ou adjuvante à quimioterapia.
5. Uso da manogalactana parcialmente metilada, extraída do cogumelo *Pleurotus eringi* na preparação de um medicamento para tratar a doença do câncer, conforme reivindicação 1, 2, 3 e 4, **caracterizado pela** potencialização do quimioterápico da carbazina quando administrado em conjunto.

DESENHOS

Figura 1

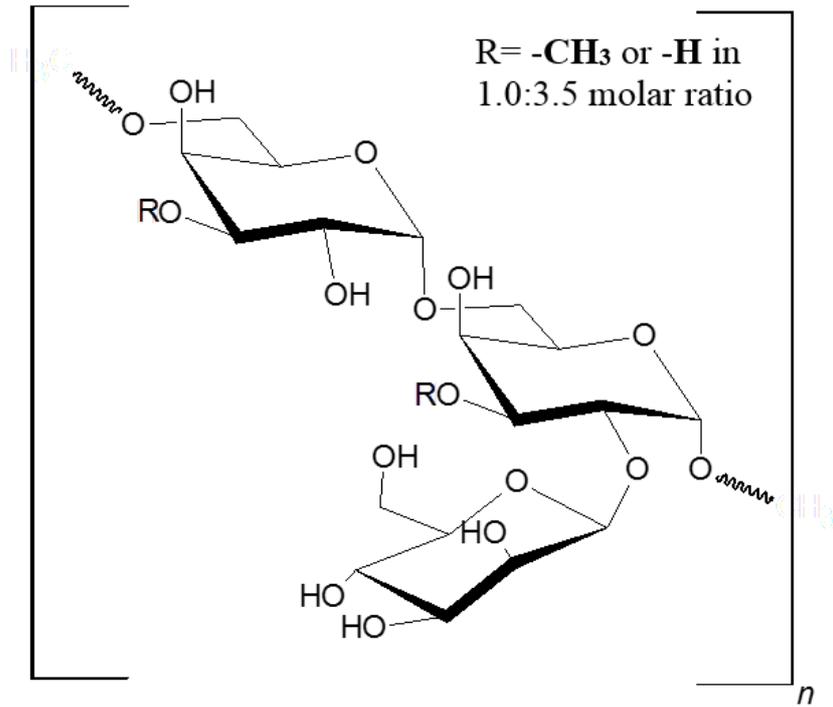
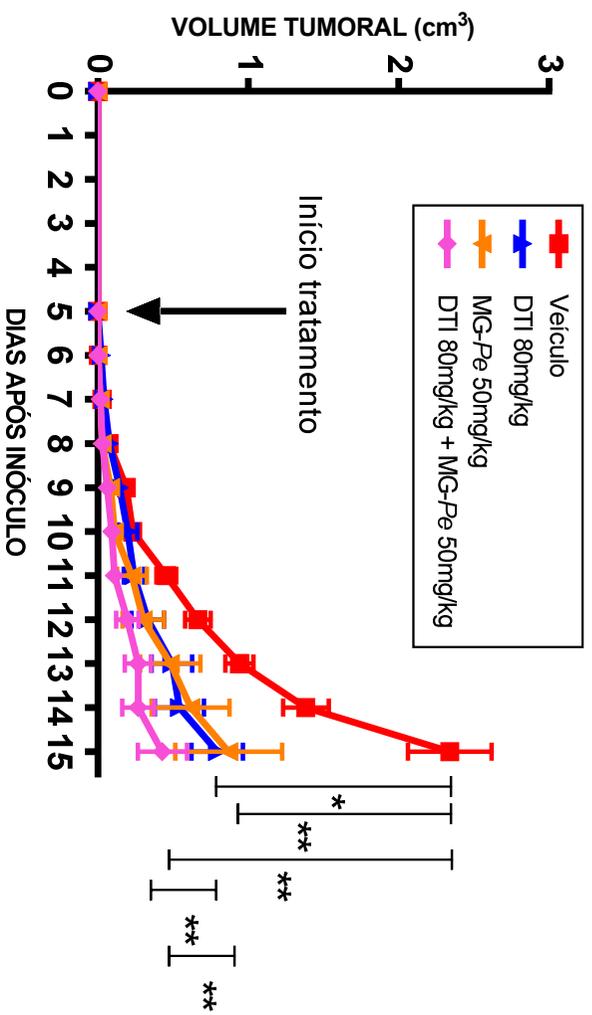


Figura 2



RESUMO**Manogalactana parcialmente metilada de cogumelo *Pleurotus eryngii*
possui atividade antitumoral**

Câncer é um grupo de doenças que possuem crescimento desordenado de células, sendo uma das principais causas de morte no mundo, com as estatísticas apontando para um crescimento de 70% nos próximos 20 anos (WHO, 2016). Dentre os principais tratamentos existentes, todos apresentam efeitos colaterais. Assim, a busca por novas moléculas, que tenham ação antitumoral e sem toxicidade é necessária (PATEL; GOYAL, 2012). Desta forma, apresentamos a Manogalactana parcialmente metilada extraída de *Pleurotus eryngii* “King Oyster”, a qual possui atividade biológica antitumoral, antimelanoma e também atividade adjuvante a quimioterapia dacarbazina, quando testada em camundongos, sem apresentar toxicidade tanto “in vitro” quanto “in vivo” (BISCAIA et al., 2017).