



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 888**

51 Int. Cl.:

C07C 49/743 (2006.01)

C07C 403/22 (2006.01)

A61K 31/10 (2006.01)

A61K 31/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07C 403/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08250090 .1**

96 Fecha de presentación : **09.01.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **1942093**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2008**

54

Título: **Compuestos de ciclohexenona novedosos procedentes de *antrodia camphorata* y sus aplicaciones.**

30

Prioridad: **08.01.2007 TW 96100680**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.10.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.10.2011

73

Titular/es:
GOLDEN BIOTECHNOLOGY CORPORATION
15F, nº 27-6, Sec. 2 Jhong-Jheng
E.Rd. Danshuei Township
Taipei Hsien, Taiwan, TW

72

Inventor/es: **Liu, Sheng-Yun;**
Wen, Wu-Che;
Tsou, Wan-Ling;
Kuo, Mao-Tien;
Huang, Chun-Hung;
Fok, K-Heng;
Li, Ya-Ying y
Chang, Chung-Chou

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 365 888 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

Compuestos de ciclohexenona novedosos procedentes de *antrodia camphorata* y sus aplicaciones.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION1. Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un compuesto novedoso, en particular a un extracto aislado y purificado de *Antrodia camphorata*, y su uso para inhibir el crecimiento tumoral.

2. Las técnicas anteriores

[0002] *Antrodia camphorata* (Niu Chang-Zhi) también se denomina "Chang-Zhi", "Niu Chang-Ku", "Chang Roja", "Chang-Chih Roja", "Chang-Ku", seta de la cámara del alcanfor, y así sucesivamente, que es una especie endémica de que crece en el interior de la duramen podrida del haya *Cinnamomum kanehirae* a una altura de 450 m a 2000 m en las montañas de Taiwán. El cuerpo del fruto de la *Antrodia camphorata* crece en el interior del tronco del árbol. El haya *Cinnamomum kanehirae* está distribuida principalmente en las zonas montañosas de Tao-Yuan, Nan-Tou y se ha incluido en la lista de especies raras y valiosas debido a su cantidad escasa y su sobretala ilegal. De este modo, *Antrodia camphorata* en la naturaleza puede ser incluso algo raro. Puesto que la velocidad de crecimiento de la *Antrodia camphorata* natural es extremadamente lenta, y su estación de crecimiento va de junio a octubre, el precio de *Antrodia camphorata* es muy elevado.

[0003] Los cuerpos fructíferos de la *Antrodia camphorata* son perennes, sésiles, suberoides o leñosos, con aspectos diferentes como tipo bandeja, tipo cinta, tipo pezuña o tipo torre. Son planos en la superficie de la madera al principio del crecimiento. A continuación, el borde del margen delantero comienza a enrollarse en forma de bandeja o de estalactitas. Las superficies superiores de *Antrodia camphorata* son brillantes, de color marrón a marrón oscuros, con arrugas no evidentes, planas y de bordes suavizados. Los lados inferiores son de color naranja rojizo o amarillos completamente recubiertos por ostiolos.

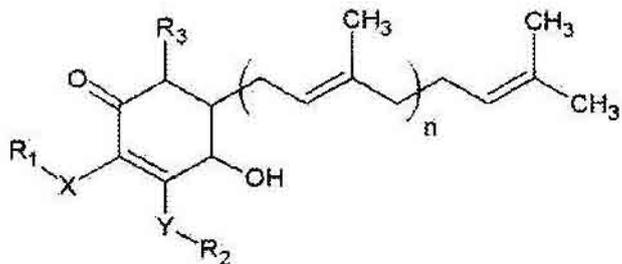
[0004] Además, *Antrodia camphorata* exhala un fuerte olor a saсаfrás (aroma del alcanfor), se vuelve de color marrón amarillento claro tras secarse al sol y tiene un fuerte gusto amargo. En la medicina tradicional taiwanesa, la *Antrodia camphorata* se utiliza habitualmente como detoxificante, protector del hígado, anticanceroso. La *Antrodia camphorata*, como otras setas generalmente comestibles y medicinales, es rica en muchos nutrientes entre los que se incluyen polisacáridos (tales como β -glucosano), triterpenoides, superóxido dismutasa (SOD), adenosina, proteínas (inmunoglobulinas), vitaminas (como la vitamina B, el ácido nicotínico), elementos traza (tales como calcio, fósforo y germanio y otros), ácidos nucleicos, aglutinina, aminoácidos, esteroides, ligninas y estabilizantes de la presión sanguínea (tales como el ácido antódico, "antodia acid") y similares. Se cree que estos ingredientes bioactivos presentan efectos beneficiosos tales como: antitumoral, potenciación de la inmunidad, antialérgico, inhibición de la aglutinación plaquetaria, antivírico, antibacteriano, antihipertensivo, rebajante de la glucosa en sangre, rebajante del colesterol, protector hepático, y similares.

[0005] Los triterpenoides son el componente más estudiado entre las numerosas composiciones de *Antrodia camphorata*. Triterpenoides es el término que agrupa compuestos naturales, que contienen 30 átomos de carbono en las estructuras pentacíclicas o hexacíclicas. El sabor amargo de la *Antrodia camphorata* procede de los componentes. Tres triterpenoides novedosos de tipo ergostano (antcina ("antcin") A; antcina B; antcina C) fueron aislados por Cherng y col. procedentes de los cuerpos fructíferos de la *Antrodia camphorata* (Cherng, I. H., y Chiang, H. C. 1995. Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. J. Nat. Prod. 58:365-371). Se extrajeron tres compuestos novedosos denominados ácido zankuícico ("zhankuic acid") A, ácido zankuícico B y ácido zankuícico mediante etanol por Chen y col. (Chen, C. H., y Yang, S. W. 1995. New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*, - a fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. J. Nat. Prod. 58:1655-1661). Además, Cherng y col. También encontraron otros tres triterpenoides novedosos procedentes de los cuerpos fructíferos de la *Antrodia camphorata*, que son compuestos derivados de sesquiterpeno lactona y 2 bifenilo, 4,7-dimetoxi-5-metil-1,3-benzodioxol y 2,2',5,5'-terametoxi-3,4,3',4'-bimetilenodioxi-6,6'-dimetilbifenilo (Chiang, H. C., Wu, D. P., Cherng, I. W., y Ueng, C. H. 1995. A sesquiterpene lactone, phenyl and biphenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*. Phytochemistry. 39: 613-616). En 1996, cuatro triterpenoides novedosos de tipo ergostano (las antcinas E y F y los antcinatos de metilo G y H) fueron aislados por Cherng y col. Con los mismos procedimientos analíticos (Cherng, I. H., Wu, D. P., y Chiang, H. C. 1996. Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. Phytochemistry. 41:263-267). Y dos esteroides relacionados con el ergostano, los ácidos zankuícicos D y E junto con tres triterpenos relacionados con lanosta, ácido 15 alfa-acetil-deshidrosulfurénico, el ácido deshidroeburicoico, y el ácido deshidrosulfurénico fueron aislados por Yang y col. (Yang, S. W., Shen, Y. C., y Chen, C. H. 1996. Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea* - a fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. Phytochemistry. 41:1389-1392). La búsqueda de los principios activos exactos con efecto antitumoral sigue en la etapa de experimentación, y están pendientes de elucidación, aunque se ha informado de los efectos antitumorales de los extractos de *Antrodia camphorata* (tales como los anteriormente mencionados). Si se encuentra la composición antitumoral exacta, contribuirá en gran medida a importantes efectos beneficiosos en el tratamiento del cáncer. El documento WO8603738 informa de composiciones

antitumorales de ciclohexadienona.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

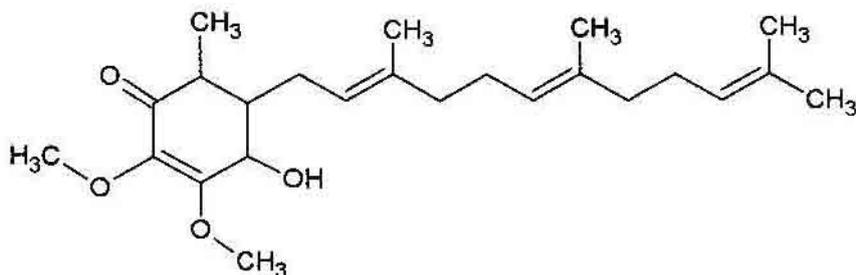
- 5 **[0006]** Para identificar los compuestos antitumorales procedentes de los extractos de *Antrodia camphorata*, en esta invención se aisló y purificó el compuesto de fórmula (1),



(1)

- 10 en la que X e Y pueden ser oxígeno o azufre, cada uno de R₁, R₂ y R₃ son un átomo de hidrógeno, metilo o (CH₂)_m-CH₃ y m=1-12; n=1-12.

- [0007]** Un compuesto preferido de la fórmula general (1) es 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona como se muestra en la fórmula (2), con la fórmula molecular de C₂₄H₃₈O₄, aspecto de polvo amarillo claro y un peso molecular de 390.



(2)

- [0008]** Los compuestos que tienen las estructuras de la fórmula (1) y la fórmula (2) se purificaron a partir de la extracción acuosa o extracción con disolvente orgánico de *Antrodia camphorata*. Entre los disolventes orgánicos se incluyen, pero no se limitan a, alcoholes tales como metanol, etanol o propanol, ésteres tales como acetato de etilo, alcanos tales como hexano, o haluros de alquilo tales como clorometano, cloroetano. Entre estos, se prefiere el alcohol, y especialmente se prefiere el etanol.

- 25 **[0009]** Con los compuestos que se pueden usar de acuerdo con esta invención, se puede inhibir el crecimiento de células tumorales, se pueden usar adicionalmente como una composición medicinal para tratar el cáncer y para potenciar los efectos terapéuticos. Los compuestos de la invención se pueden aplicar a una gama de células cancerosas, entre las que se incluyen cáncer de mama, cáncer hepático y cáncer de próstata, que puede dar como resultado una ralentización en el crecimiento de las células cancerosas, incluyendo adicionalmente la inhibición de la proliferación de las células cancerosas y la disminución en el riesgo de neoplasia. De este modo se pueden usar en el tratamiento del cáncer tal como cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de próstata y similares.

- [0010]** Por otra parte, los compuestos de fórmula (1) y/o de fórmula (2) de la invención se pueden incorporar a composiciones medicinales para tratar el cáncer de mama, cáncer hepático y cáncer de próstata para inhibir el crecimiento de células tumorales. Las composiciones medicinales no solo incluyen los compuestos de fórmula (1) y/o de fórmula (2), sino también los vehículos farmacéuticamente aceptables. Entre los vehículos se incluyen, pero no se limitan a, excipientes tales como agua, cargas tales como sacarosa o almidón, aglutinantes tales como los derivados de celulosa, diluyentes, desintegrantes, potenciadores de la absorción o endulzantes. La composición farmacéutica de la presente invención se puede fabricar mezclando los compuestos de fórmula (1) y/o de fórmula (2) con al menos uno de los vehículos por medios convencionales conocidos en el campo técnico farmacéutico, que se pueden formular, pero no se limitan a, en forma de polvo, comprimido, cápsula, aglomerados, gránulos u otra formulación

liquida.

[0011] Además, debido a que los compuestos de la presente invención poseen actividad antioxidante a la vez, son suplementos ideales para alimentos, dietas y bebidas saludables, productos médicos y cosméticos, y son 5 beneficiosos para la salud humana por su capacidad para prevenir dolencias cardiovasculares o mutaciones celulares.

[0012] La presente invención se va a explicar adicionalmente en la siguiente realización ilustrativa y en los 10 ejemplos

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

[0013] Los micelios, cuerpos fructíferos o una mezcla de ambos procedentes de *Antrodia camphorata* se 15 extrajeron en primer lugar con agua o disolventes orgánicos para obtener el extracto acuoso o el extracto en disolvente orgánico de *Antrodia camphorata* usando procedimientos bien conocidos en las técnicas. Los disolventes orgánicos incluyen, pero no se limitan a alcoholes tales como metanol; etanol o propanol; ésteres tales como acetato de etilo; alcanos tales como hexano; o haluros de alquilo tales como clorometano, y cloroetano. Entre estos, se prefiere el alcohol y se prefiere especialmente el etanol.

[0014] Los extractos acuosos o en disolventes orgánicos de *Antrodia camphorata* se sometieron a cromatografía 20 líquida de alto rendimiento (HPLC) para su aislamiento y purificación. Cada fracción se recuperó y se ensayó para determinar sus efectos anticancerígenos. Las fracciones con potentes efectos anticancerígenos se analizaron para determinar su composición y se analizaron adicionalmente frente a distintas células tumorales. El enfoque anterior condujo a la identificación de compuestos novedosos, la fórmula (1) y la fórmula (2), que inhibieron el crecimiento de 25 diferentes células tumorales, que no se habían encontrado en *Antrodia camphorata* y de los que no se había informado en ninguna publicación anterior.

[0015] El compuesto 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona de la 30 fórmula (2) se detalla a continuación como ejemplo de la presente invención. Los efectos anticancerígenos del 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona se evaluaron mediante el ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, S-difenil tetrazolio (MTT) según el modelo de cribado de fármacos antitumorales del National Cancer Institute (NCI) sobre las tasas de supervivencia tumorales usando líneas celulares tales como de cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de próstata y similares. Los anteriores ensayos 35 demostraron que la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona disminuyó las tasas de supervivencia de las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), de las líneas celulares de carcinoma hepatocelular (Hep 3B y Hep G2) y de las líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP y DU-145), y al mismo tiempo demostraron unos valores para la concentración de semiinhibición (CI₅₀) relativamente bajos. El crecimiento de células cancerosas de cáncer de mama, cáncer hepático y cáncer de próstata fue inhibido por la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona y por tanto se puede 40 utilizar en el tratamiento de cánceres tales como cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de próstata similares. Los detalles de los ejemplos se describen a continuación:

Ejemplo 1

Aislamiento de 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona

[0016] 100 g de micelios, cuerpos fructíferos o una mezcla de ambos procedentes de *Antrodia camphorata* se 50 colocaron en un matraz. Se agregó una cantidad adecuada de agua y alcohol (disolución de alcohol al 70-100%) al matraz, y se agitó a 20-25°C durante al menos 1 hora. La disolución se filtró a través de un filtro de membrana de 0,45 µm y el filtrado se recogió como el extracto.

[0017] El filtrado de *Antrodia camphorata* se sometió a análisis mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). La separación se llevó a cabo con una columna RP18, la fase móvil consistió en metanol (A) y ácido acético (B) al 0,1-0,5%, con concentraciones de gradiente de 0-10 min en B, 95% ~ 20% B, 10-20 min en 20% ~ 10% B, 20- 55 35 min en 10% ~ 10% B, 35-40 min en 10% ~ 95% B, a un caudal de 1 ml/min. El efluente de la columna se controló mediante un detector UV-visible.

[0018] Las fracciones recogidas a 25-30 min se recogieron y concentraron para dar la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6- 60 metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona, un producto pulverulento de color amarillo claro. El análisis de la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona demostró la fórmula molecular de C₂₄H₃₈O₄, un peso molecular de 390, un punto de fusión de 48°C - 52°C. El estudio del espectro de RMN mostró un ¹H RMN (CDCl₃)δ(ppm) = 1,51, 1,67, 1,71, 1,75, 1,94, 2,03, 2,07, 2,22, 2,25, 3,68, 4,05, 5,07, y 5,14; ¹³C-RMN(CDCl₃) δ(ppm) = 12,31, 16,1, 16,12, 17,67, 25,67, 26,44, 26,74, 27,00, 39,71, 39,81, 4,027, 43,34, 59,22, 60,59, 120,97, 123,84, 124,30, 131,32, 135,35, 135,92, 138,05, 160,45, y 197,12.

[0019] La estructura química de la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-

enona se comparó con la base de datos de compuestos químicos y ninguna estructura similar estuvo disponible. Estos datos confirman que la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona es un compuesto novedoso del que nunca se había informado hasta el momento.

5 Ejemplo 2

Ensayo de supervivencia *in vitro* para efectos contra el cáncer de mama

[0020] Se adoptó el modelo de cribado de fármacos anticancerosos del NCI para probar el efecto anticancerígeno del compuesto del ejemplo 1 de la invención. El compuesto aislado de la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona procedente del ejemplo 1 se agregó al medio de cultivo de células de cáncer de mama humano, MCF-7 o MDA-MB-231, para un ensayo de supervivencia de células tumorales. Este ensayo se puede ensayar con la prueba del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]2,5-difeniltetrazolio (MTT), que se utiliza habitualmente para determinar la proliferación celular, el porcentaje de células viables y la citotoxicidad. El MTT es un colorante amarillo, que puede absorberse por las células vivas y reducirse a los cristales azul púrpura del formazano mediante una succinato tetrazolio reductasa en las mitocondrias. La formación del formazano puede, de este modo, utilizarse para evaluar y determinar la tasa de supervivencia de las células.

[0021] Las células de cáncer de mama humano, MCF-7 o MDA-MB-231 se cultivaron independientemente en medio que contenía suero de ternera fetal durante 24 horas. Las células que proliferaron se lavaron una vez con PBS, y posteriormente se trataron 1x con tripsina-EDTA y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el aglomerado celular se volvió a suspender en 10 ml de medio de cultivo fresco por agitación suave. Las células se colocaron en una placa de 96 pocillos. A cada uno de los 96 pocillos se agregaron los extractos etanólicos de *Antrodia camphorata* (el grupo de control, los extractos totales de *Antrodia camphorata* sin purificación) en las siguientes concentraciones: 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 y 0,03 µg/ml, respectivamente, mientras que la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona (el grupo experimental) se agregó a cada uno de los 96 pocillos en las siguientes concentraciones: 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 y 0,03 µg/ml, respectivamente. Las células se incubaron a 37°C en una estufa con CO₂ al 5% durante 48 horas. Se agregó MTT en una concentración de 2,5 mg/ml en cada pocillo en la oscuridad y se incubó durante 4 horas, seguido por la adición de 100 µl de tampón de lisis para detener la reacción. Las placas se leyeron en un lector ELISA a una longitud de onda de 570 nm para determinar las tasas de supervivencia. Se calcularon también los valores de la concentración de semiinhibición (CI₅₀), y se relacionan en la Tabla 1.

Tabla 1 Resultados del ensayo de supervivencia *in vitro* para la inhibición de células de cáncer de mama.

Muestras	CI ₅₀ (µg/ml)
Grupo de control (extracto de <i>Antrodia camphorata</i>)	
MCF-7	11,132
MDA-MB-231	25,812
Grupo experimental (fórmula 2)	
MCF-7	0,852
MDA-MB-231	1,031

[0022] Según los resultados de la tabla 1, la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona es un potente inhibidor del crecimiento de la línea celular del cáncer de mama humano. Los valores de CI₅₀ de la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona frente a MCF-7 y MDA-MB-231 son 0,852 µg/ml y 1,031 µg/ml respectivamente, que son significativamente inferiores a los de los extractos totales de *Antrodia camphorata*. De este modo, la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-etil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona procedente de *Antrodia camphorata* se puede aplicar para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama.

Ejemplo 3

45

Estudio de adición *in vitro* frente a terapia con adyuvante en células de cáncer de mama

[0023] El experimento también se llevó a cabo de acuerdo con el modelo *in vitro* de cribado de fármacos anticancerosos del NCI. Las células de cáncer de mama humano, MCF-7 y MDA-MB-231, se cultivaron independientemente en medio que contenía suero de ternera fetal durante 24 horas. Las células que proliferaron se lavaron una vez con PBS, y posteriormente se trataron 1x con tripsina-EDTA y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el aglomerado celular se volvió a suspender en 10 ml de medio de cultivo fresco por agitación suave. Las células se colocaron en una placa de 96 pocillos tras agregar 0,0017 µg/ml de Taxol y se trataron durante 72 horas. A cada uno de los pocillos se agregó respectivamente la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona obtenida en el ejemplo 1 a las siguientes concentraciones: 0 µg/ml (el grupo de control); 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 y 0,03 µg/ml (el grupo experimental). Las células

se incubaron a 37°C en una estufa con CO₂ al 5% durante 48 horas. Se agregó MTT en una concentración de 2,5 mg/ml en cada pocillo en la oscuridad y se incubó durante 4 horas, seguido por la adición de 100 µl de tampón de lisis para detener la reacción. Las placas se leyeron en un lector ELISA a una longitud de onda de 570 nm para determinar las tasas de supervivencia. Se calcularon también los valores de la concentración de semiinhibición (CI₅₀), y se relacionan en la Tabla 2.

Tabla 2 Resultados de la terapia de adición de taxol frente a células de cáncer de mama

Muestras	Resultados
Grupo de control	Tasa de supervivencia celular (%)
MCF-7 (0,0017 µg/ml de Taxol)	65 ± 1
MDA-MB-231 (0,0017 µg/ml de Taxol)	76 ± 3
Grupo experimental	CI ₅₀ (µg/ml)
MCF-7 (0,0017 µg/ml de Taxol + fórmula 2)	0,009
MDA-MB-231 (0,0017 µg/ml de Taxol + fórmula 2)	0,0011

[0024] Según los resultados de la tabla 2, los valores de CI₅₀ de la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona frente a MCF-7 y MDA-MB-231 disminuyeron a 0,009 µg/ml y 0,011 µg/ml respectivamente tras la adición del Taxol. De este modo estos resultados confirman la actividad inhibitoria de la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-etil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona procedente de *Antrodia camphorata* que se puede aplicar para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama, y mostró mejor actividad antitumoral sinérgica para los tumores al combinarlo con el Taxol.

Ejemplo 4

Ensayo de supervivencia *in vitro* para efectos contra el cáncer hepático

[0025] Se adoptó el modelo de cribado de fármacos anticancerosos del NCI para probar el efecto anticancerígeno del compuesto del ejemplo 1 de la invención. El compuesto aislado de la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona procedente del ejemplo 1 se agregó al medio de cultivo de células de cáncer hepático humano, Hep 3B o Hep G2, para un ensayo de supervivencia de células tumorales.

[0026] Las células de cáncer hepático humano, Hep 3B y Hep G2, se cultivaron independientemente en medio que contenía suero de ternera fetal durante 24 horas. Las células que proliferaron se lavaron una vez con PBS, y posteriormente se trataron 1x con tripsina-EDTA y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el aglomerado celular se volvió a suspender en 10 ml de medio de cultivo fresco por agitación suave. Las células se colocaron en una placa de 96 pocillos. A cada uno de los 96 pocillos se agregaron los extractos etanólicos de *Antrodia camphorata* (el grupo de control, los extractos totales de *Antrodia camphorata* sin purificación) en las siguientes concentraciones: 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 y 0,03 µg/ml, respectivamente, mientras que la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona (el grupo experimental) se agregó a cada uno de los 96 pocillos en las siguientes concentraciones: 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 y 0,03 µg/ml, respectivamente. Las células se incubaron a 37°C en una estufa con CO₂ al 5% durante 48 horas. Se agregó MTT en una concentración de 2,5 mg/ml en cada pocillo en la oscuridad y se incubó durante 4 horas, seguido por la adición de 100 µl de tampón de lisis para detener la reacción. Las placas se leyeron en un lector ELISA a una longitud de onda de 570 nm para determinar las tasas de supervivencia. Se calcularon también los valores de la concentración de semiinhibición (CI₅₀), y se relacionan en la Tabla 3.

Tabla 3 Resultados del ensayo de supervivencia *in vitro* para la inhibición de células de cáncer hepático

Muestras	CI ₅₀ (µg/ml)
Grupo de control (extractos totales de <i>Antrodia camphorata</i>)	
Hep 3B	5,121
Hep G2	18,631
Grupo experimental (fórmula 2)	
Hep 3B	0,005
Hep G2	1,679

[0027] Según los resultados de la tabla 3, la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona es un potente inhibidor del crecimiento de la línea celular del cáncer hepático humano. Los valores de CI₅₀ de la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona frente a Hep 3B y

Hep G2 son 0,005 $\mu\text{g/ml}$ y 1,679 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, que son significativamente inferiores a los de los extractos totales de *Antrodia camphorata*. De este modo, la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-etil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona procedente de *Antrodia camphorata* se puede aplicar para inhibir el crecimiento de células de cáncer hepático.

5

Ejemplo 5

Estudio de adición *in vitro* frente a terapia con adyuvante en células de cáncer hepático

10 **[0028]** El experimento también se llevó a cabo de acuerdo con el modelo *in vitro* de cribado de fármacos anticancerosos del NCI. Las células de cáncer hepático humano, Hep 3B y Hep G2 y MDA-MB-231 se cultivaron independientemente en medio que contenía suero de ternera fetal durante 24 horas. Las células que proliferaron se lavaron una vez con PBS, y posteriormente se trataron 1x con tripsina-EDTA y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el aglomerado celular se volvió a suspender en 10 ml de medio de cultivo

15 fresco por agitación suave. Las células Hep 3B se trataron con 0,0043 $\mu\text{g/ml}$ de Lovastatina durante 72 horas y las células Hep G2 se trataron con 0,0017 $\mu\text{g/ml}$ de Taxol durante 72 horas antes de colocarlas en una placa de 96 pocillos. A cada uno de los pocillos se agregó respectivamente la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona obtenida en el ejemplo 1 a las siguientes concentraciones: 0 $\mu\text{g/ml}$ (el grupo de control); 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$ (el grupo experimental). Las células se incubaron a 37°C en una estufa

20 con CO₂ al 5% durante 48 horas. Se agregó MTT en una concentración de 2,5 mg/ml en cada pocillo en la oscuridad y se hizo reaccionar durante 4 horas, seguido por la adición de 100 μl de tampón de lisis para detener la reacción. Las placas se leyeron en un lector ELISA a una longitud de onda de 570 nm para determinar las tasas de supervivencia. Se calcularon también los valores de la concentración de semiinhibición (CI₅₀), y se relacionan en la Tabla 4.

25

Tabla 4 Resultados de la terapia de adición <i>in vitro</i> frente a células de cáncer hepático	
Muestras	Resultados
Grupo de control	Tasa de supervivencia celular
Hep 3B (0,0043 $\mu\text{g/ml}$ de Lovastatina)	61 \pm 3
Hep G2 (0,0017 $\mu\text{g/ml}$ de Taxol)	81 \pm 2
Grupo experimental	CI ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Hep 3B (0,0043 $\mu\text{g/ml}$ de Lovastatina I + fórmula 2)	0,002
Hep G2 (0,0017 $\mu\text{g/ml}$ de Taxol + fórmula 2)	0,008

30 **[0029]** Según los resultados de la tabla 4, los valores de CI₅₀ de la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona frente a Hep 3B and Hep G2 disminuyeron a 0,002 $\mu\text{g/ml}$ y 0,008 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente con las actividades sinérgicas agregadas de Lovastatina y Taxol. De este modo estos resultados confirman la actividad inhibitoria de la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona procedente de *Antrodia camphorata* que se puede aplicar para inhibir el crecimiento de células de cáncer hepático, y muestra mejor actividad antitumoral sinérgica para los tumores cuando se combina con el Taxol.

Ejemplo 6

Ensayo de supervivencia *in vitro* para efectos contra el cáncer de próstata

40 **[0030]** Se adoptó el modelo de cribado de fármacos anticancerosos del NCI para probar el efecto anticancerígeno del compuesto aislado del ejemplo 1 de la invención. El compuesto aislado de la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona procedente del ejemplo 1 se agregó al medio de cultivo de células de cáncer hepático humano, LNCaP o DU-145, para un ensayo de supervivencia de células tumorales.

45 **[0031]** Las células de cáncer hepático humano, LNCaP y DU-145, se cultivaron independientemente en medio que contenía suero de ternera fetal durante 24 horas. Las células que proliferaron se lavaron una vez con PBS, y posteriormente se trataron 1x con tripsina-EDTA y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el aglomerado celular se volvió a suspender en 10 ml de medio de cultivo fresco por agitación suave. Las células se colocaron en una placa de 96 pocillos. A cada uno de los 96 pocillos se agregaron los extractos etanólicos de *Antrodia camphorata* (el grupo de control, los extractos totales de *Antrodia camphorata* sin purificación)

50 en las siguientes concentraciones: 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, mientras que la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona (el grupo experimental) se agregó a cada uno de los 96 pocillos en las siguientes concentraciones: 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Las células se incubaron a 37°C en una estufa con CO₂ al 5% durante 48 horas. Se agregó MTT en una concentración de 2,5 mg/ml en cada pocillo en la oscuridad y se incubó durante 4 horas, seguido por la adición de 100 μl de

55 tampón de lisis para detener la reacción. Las placas se leyeron en un lector ELISA a una longitud de onda de 570

nm para determinar las tasas de supervivencia. Se calcularon también los valores de la concentración de semiinhibición (CI_{50}), y se relacionan en la Tabla 5.

Tabla 5 Resultados del ensayo de supervivencia *in vitro* para la inhibición de células de cáncer de próstata

Muestras	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Grupo de control (extractos totales de <i>Antrodia camphorata</i>)	
LNCaP	11,491
DU-145	41,392
Grupo experimental (fórmula 2)	
LNCaP	2,378
DU-145	1,812

5

[0032] Según los resultados de la tabla 5, la hidrox-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona es un potente inhibidor del crecimiento de la línea celular del cáncer de próstata humano. Los valores de CI_{50} de la 4-hidrox-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona respecto de LNCaP y DU-145 son 2,378 $\mu\text{g/ml}$ y 1,812 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente que son significativamente inferiores a los de los extractos totales de *Antrodia camphorata*. De este modo, la 4-hidrox-2,3-dimetoxi-6-etil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona procedente de *Antrodia camphorata* se puede aplicar para inhibir el crecimiento de células de cáncer de próstata.

Ejemplo 7

15

Estudio de adición *in vitro* frente a terapia con adyuvante en células de cáncer de próstata

[0033] El experimento también se llevó a cabo de acuerdo con el modelo *in vitro* de cribado de fármacos anticancerosos del NCI. Las células de cáncer de próstata humano, LNCaP y DU-145 se cultivaron independientemente en medio que contenía suero de ternera fetal durante 24 horas. Las células que proliferaron se lavaron una vez con PBS, y posteriormente se trataron 1x con tripsina-EDTA y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el aglomerado celular se volvió a suspender en 10 ml de medio de cultivo fresco por agitación suave. Las células LNCaP se trataron con 0,0017 $\mu\text{g/ml}$ de Taxol durante 72 horas y las células DU-145 se trataron con 0,0043 $\mu\text{g/ml}$ de Taxol durante 72 horas antes de colocarlas en una placa de 96 pocillos. A cada uno de los 96 pocillos se agregaron los extractos etanólicos de *Antrodia camphorata* (el grupo de control, los extractos totales de *Antrodia camphorata* sin purificación) en las siguientes concentraciones: 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, mientras que la 4-hidrox-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona (el grupo experimental) se agregó a cada uno de los 96 pocillos en las siguientes concentraciones: 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Las células se incubaron a 37°C en una estufa con CO_2 al 5% durante 48 horas. Se agregó MTT en una concentración de 2,5 mg/ml en cada pocillo en la oscuridad y se incubó durante 4 horas, seguido por la adición de 100 μl de tampón de lisis para detener la reacción. Las placas se leyeron en un lector ELISA a una longitud de onda de 570 nm para determinar las tasas de supervivencia. Se calcularon también los valores de la concentración de semiinhibición (CI_{50}), y se relacionan en la Tabla 6.

35

Tabla 6 Resultados de la terapia de adición de taxol frente a células de cáncer hepático

Muestras	Resultados
Grupo de control (extracto de <i>Antrodia camphorata</i>)	Tasa de supervivencia celular
Hep 3B (0,0017 $\mu\text{g/ml}$ de Taxol)	56 \pm 3
Hep G2 (0,0017 $\mu\text{g/ml}$ de Taxol)	70 \pm 2
Grupo experimental	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Hep 3B (0,0017 $\mu\text{g/ml}$ de Taxol + fórmula 2)	0,961
Hep G2 (0,0017 $\mu\text{g/ml}$ de Taxol + fórmula 2)	0,515

[0034] Según los resultados de la tabla 6, los valores de CI_{50} de la 4-hidrox-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona frente a las células de cáncer de próstata MCF-7 y MDA-MB-231 disminuyeron a 0,961 $\mu\text{g/ml}$ y 0,515 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente tras combinación con el Taxol. De este modo estos resultados confirman la actividad inhibitoria de la 4-hidrox-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona procedente de *Antrodia camphorata* que se puede aplicar para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama, y mostró mejor actividad antitumoral sinérgica al combinarlo con el Taxol.

40

Ejemplo 8Estudio in vitro de la actividad antioxidante

5 **[0035]** La lipoproteína de baja densidad (LDL) humana oxidada con ión cobre (Cu^{2+}) se ha utilizado ampliamente para evaluar las actividades antioxidantes de las muestras a ensayar. La actividad antioxidante de una muestra se determina por el contenido en dienos de la LDL tras la oxidación y se expresa en equivalentes Trolox utilizando una curva patrón calculada a partir de patrones de Trolox, un análogo hidrosoluble de la vitamina E (el valor de la capacidad antioxidante de 1 se expresa en términos de 2 μM de Trolox).

10

[0036] Se prepararon las siguientes disoluciones previamente: agua doblemente destilada (el grupo de control negativo), tampón fosfato de sodio 5 mM (SPB), disolución de Trolox 1 μM y 2 μM (el grupo de control positivo), y 40 $\mu\text{g/ml}$ de 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona aislada del ejemplo 1. La concentración de colesterol LDL (LDL-C) se determinó usando el procedimiento de reacción con enzima, que se diluyó hasta 0,1-0,25 mg/ml con SPB 5 mM. Se agregaron cien μl de LDL a cada pocillo de la placa de cuarzo de 96 pocillos, seguido por la adición del Trolox anteriormente mencionado y el compuesto aislado del ejemplo 1. El agente oxidante normalizado CuSO_4 se aportó para inducir la oxidación a una concentración final de 5 μM en cada pocillo de 250 μl . La placa se leyó en un lector ELISA a 232 nm a 37°C durante 12 horas. El tiempo de muestreo fue de 15 min. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

20

Tabla 7 Resultados del estudio de actividad antioxidante *in vitro*

Muestras	Tlag(min)	$\Delta\text{Tlag}(\text{min})$	Valores de capacidad
<u>Control negativo</u>			
H ₂ O (Tlag ₀)	185		
<u>Control positivo</u>			
Trolox 1 μM	266	81	0,48
Trolox 2 μM	344	159	1,00
<u>Grupo experimental</u>			
40 $\mu\text{g/ml}$ de fórmula 2	439	208	1,30

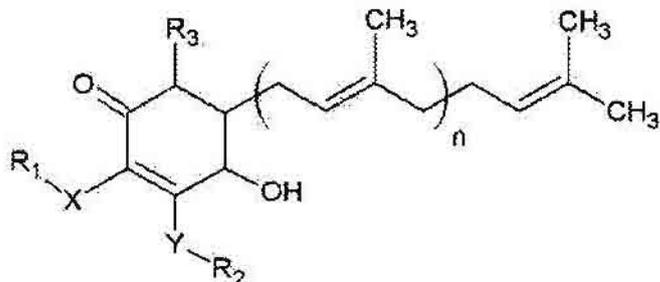
Nota 1: La duración de la fase latente (Tlag, min), se define como la intersección de la fase latente con la fase de propagación para la absorbancia a 234 nm. Δlag (min) se define como la diferencia de tiempo entre Tlag y Tlag₀ para cada muestra.

Nota 2: Se define que un compuesto tiene capacidad antioxidante cuando el valor de la capacidad antioxidante supera 0,5

25 **[0037]** Según los resultados de la tabla 7, el valor de la capacidad antioxidante de la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona es 1,3, que es mucho más elevado que el valor del patrón de 0,5. De este modo los compuestos de la invención poseen actividad antioxidante, que se puede usar como suplementos para alimentos dietas y bebidas saludables, productos médicos y cosméticos, y contribuyen a un gran efecto beneficioso sobre la salud humana por su capacidad para prevenir dolencias cardiovasculares o la mutación de las células.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula (1)



(1)

5

en la que X e Y pueden ser oxígeno o azufre, R₁, R₂ y R₃ son cada uno un átomo de hidrógeno, metilo o (CH₂)_m-CH₃, y m=1-12, n=1-12.

10 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto se ha aislado a partir de *Antrodia camphorata*.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el compuesto se ha aislado a partir de los extractos en disolventes orgánicos de *Antrodia camphorata*.

15

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en el que los disolventes orgánicos se seleccionan entre el grupo constituido por alcoholes, ésteres, alcanos y haluros de alquilo.

5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el alcohol es etanol. 1.

20

6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el compuesto se ha aislado a partir de extractos acuosos de *Antrodia camphorata*.

7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5(3,7,11-trimetil-dodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona.

25

8. Un compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 7 usado para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama.

30 9. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el compuesto se ha aislado a partir de *Antrodia camphorata*.

10. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el compuesto se ha aislado a partir de los extractos en disolventes orgánicos de *Antrodia camphorata*.

35

11. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación 10 en el que los disolventes orgánicos se seleccionan entre el grupo constituido por alcoholes, ésteres, alcanos y haluros de alquilo.

12. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el disolvente orgánico es etanol.

40

13. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación 9, el compuesto se ha aislado a partir de los extractos acuosos de *Antrodia camphorata*.

14. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación 8, en el que las células de cáncer de mama proceden de las líneas celulares MCF-7 o MDA-MB-231.

45

15. Un compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 7 usado para inhibir el crecimiento de células de cáncer hepático.

50 16. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el compuesto se ha aislado a partir de *Antrodia camphorata*.

17. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación **16**, en el que el compuesto se ha aislado a partir de los extractos de disolventes orgánicos de *Antrodia camphorata*.
- 5 18. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación **17**, en el que los disolventes orgánicos se seleccionan entre el grupo constituido por alcoholes, ésteres, alcanos y haluros de alquilo.
19. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación **18**, en el que el disolvente orgánico es etanol.
- 10 20. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación **16**, en el que el compuesto se ha aislado a partir de los extractos acuosos de *Antrodia camphorata*.
21. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación **15**, en el que las células de cáncer hepático proceden de las líneas celulares Hep 3B o Hep G2.
- 15 22. Un compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación **1** o la reivindicación **7** usado para inhibir el crecimiento de células de cáncer de próstata.
23. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación **22**, en el que el compuesto se ha aislado a partir de *Antrodia camphorata*.
- 20 24. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación **23**, en el que el compuesto se ha aislado a partir de los extractos en disolventes orgánicos de *Antrodia camphorata*.
- 25 25. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación **24**, en el que los disolventes orgánicos se seleccionan entre el grupo constituido por alcoholes, ésteres, alcanos y haluros de alquilo.
26. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación **25**, en el que el disolvente orgánico es etanol.
- 30 27. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación **23**, en el que el compuesto se ha aislado a partir de los extractos acuosos de *Antrodia camphorata*.
28. El compuesto de ciclohexenona de acuerdo con la reivindicación **22**, en el que las células del cáncer de próstata proceden de las líneas celulares LNCaP o DU145.
- 35 29. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación **1** o **7**, que presenta actividad antioxidante.
30. Una composición farmacéutica para inhibir el crecimiento de células tumorales que comprende una dosis activa del compuesto de acuerdo con la reivindicación **1** y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que las células tumorales se han seleccionado del grupo constituido por cáncer de mama, cáncer hepático y cáncer de próstata.
- 40