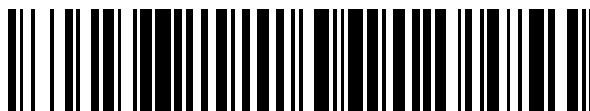


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 791**

51 Int. Cl.:

**C07C 49/743** (2006.01)  
**C07C 49/703** (2006.01)  
**C07C 49/587** (2006.01)  
**A61K 31/12** (2006.01)  
**A61K 31/122** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)  
**C07C 45/78** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)  
**C07C 403/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2008 E 08714807 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2221291**

54 Título: **Compuestos de ciclohexenona de Antrodia camphorata y composiciones farmacéuticas de los mismos útiles para tratar enfermedades autoinmunitarias**

30 Prioridad:

**30.07.2007 CN 200710129871**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.11.2013**

73 Titular/es:

**GOLDEN BIOTECHNOLOGY CORPORATION  
(100.0%)  
L5F, NO.27-6, SEC. 2, JHONG-JHENG E. RD.  
DANSHUEI TOWNSHIP  
TAIPEI HSIEN 25170, TAIWAN, CN**

72 Inventor/es:

**LIU, SHENG-YUNG;  
WEN, WU-CHE y  
KUO, MAO-TIEN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 429 791 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 de *Antrodia camphorata* y composiciones farmacéuticas de los mismos útiles para tratar enfermedades autoinmunitarias

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad, en particular a compuestos de ciclohexenona aislados y purificados de extractos de *Antrodia camphorata* y que pueden usarse en el tratamiento de enfermedad autoinmunitarias tales como lupus sistémico eritematoso (LSE)

10 2. Técnicas anteriores

Existen muchos tipos de enfermedades autoinmunitarias resultantes de una respuesta inmunitaria aberrante del cuerpo y que causan autodestrucción. Los ejemplos destacados incluyen lupus sistémico eritematoso (LSE), artritis reumatoide (AR), escleroderma, polimiositis, dermatomiositis, púrpura anafilactoide, síndrome de Sjögren y similares. Otros tales como cirrosis biliar primaria (CBP), hepatitis activa crónica y tiroiditis de Hashimoto están todos relacionados con enfermedades autoinmunitarias. Entre ellos, el lupus sistémico eritematoso (LSE) es la enfermedad más grave, que es común en mujeres en edad fértil. Los pacientes de LSE producen autoanticuerpos llamados anticuerpos antinucleares (AAN) orientados contra autoantígenos dentro del núcleo celular. Estos autoanticuerpos pueden causar múltiples daños en tejidos y órganos tales como piel, articulaciones, esqueleto, riñón, sistema cardiovascular, sistema de aglutinación, intestinos y estómago, membrana serosa, (pericardio, pleura y peritoneo), sistema neuronal y similares. Algunos de los anticuerpos forman complejos inmunitarios cuando se unen a antígenos, que pueden depositarse en células de diferentes tejidos durante la circulación. Las manifestaciones clínicas incluyen vespertilio, anemia hemolítica, artritis, inflamación de vasos sanguíneos, nefritis y otros. Es un tratamiento estándar de las enfermedades autoinmunitarias la administración de esteroides u otros fármacos químicos. Sin embargo, los pacientes con tratamiento a largo plazo exhibían complicaciones incómodas o efectos secundarios. Por lo tanto, será beneficioso para los pacientes si se usan medicinas de hierbas tradicionales chinas naturales exentas de efectos secundarios para tratar enfermedades autoinmunitarias.

*Antrodia camphorata*, denominada también Chang-Zhi, Niu Chang-Zhi, hongo rojo alcanforado y otros, es un hongo perenne perteneciente a la orden *Aphyllorphales* y la familia *Polyporaceae*. Es una especie endémica de Taiwán que crece en el corazón podrido interno de la pared leñosa de *Cinnamomum kanehirae* Hay. *Cinnamomum kanehirae* Hay está distribuido escasamente y se recolecta en exceso ilegalmente, lo que hace que el crecimiento de *Antrodia camphorata* dentro del árbol se haya vuelto escaso en la naturaleza. El precio de *Antrodia camphorata* es muy alto debido a la velocidad de crecimiento extremadamente lenta de *Antrodia camphorata* natural, que crece solo entre junio y octubre.

Los cuerpos frutales de *Antrodia camphorata* son perennes, sésiles, duros y leñosos, y exhalan un fuerte olor a sasafra (aroma a alcanfor). Las apariencias son variadas, con formas de tipo placa, tipo campana, tipo pezuña o tipo torre. Son de color rojizo y planos cuando son jóvenes y unidos a la superficie de la madera. Después, los bordes del extremo frontal se inclinan y enroscan un poco y se extienden por los alrededores. El color se vuelve marrón rojizo desvaído o marrón amarillento cremoso, con ostiolas por todas partes. Tiene un valor médico muy alto en esta etapa.

En la medicina tradicional taiwanesa, *Antrodia camphorata* se usa comúnmente como antídoto, protector hepático y fármaco anticanceroso. *Antrodia camphorata*, como los hongos comestibles y medicinales en general, es rico en numerosos nutrientes incluyendo polisacáridos (tales como  $\beta$ -glucosano), triterpenoides, superóxido dismutasa (SOD), adenosina, proteínas (inmunoglobulinas), vitaminas (tales como vitamina B, ácido nicotínico), oligoelementos (tales como calcio, fósforo y germanio y otros), ácidos nucleicos, aglutinina, aminoácidos, esteroides, ligninas y estabilizadores de la presión sanguínea (tales como ácido antódico) y similares. Estos ingredientes fisiológicamente activos se cree que exhiben efectos tales como: actividades antitumorales, actividades inmunomoduladoras aumentadas, actividades antialérgicas, antibacterianas, antihipertensivas, reductoras del nivel de azúcar sanguíneo, reductoras del nivel colesterol y similares.

Los triterpenoides son el componente más estudiado entre las numerosas composiciones de *Antrodia camphorata*. Los triterpenoides son los términos genéricos para compuestos naturales que contienen 30 átomos de carbono con estructuras pentacíclicas o hexacíclicas. El sabor amargo de *Antrodia camphorata* es por el componente triterpenoide. Se han aislado tres triterpenoides de tipo ergostano novedosos (antcina A, antcina B, antcina C) por Cherng *et al.* a partir de los cuerpos frutales de *Antrodia camphorata* (Cherng, I. H. y Chiang, H. C. 1995. "Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*". *J. Nat. Prod.* 58: 365-371). Se han extraído tres nuevos compuestos, ácido zhankuico A, ácido zhankuico B y ácido zhankuico de los cuerpos frutales de *Antrodia camphorata* con etanol por Chen *et al.* (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 *et al.* han encontrado también otros tres nuevos triterpenoides de los cuerpos frutales de *Antrodia camphorata*, que son sesquiterpenolactona y dos

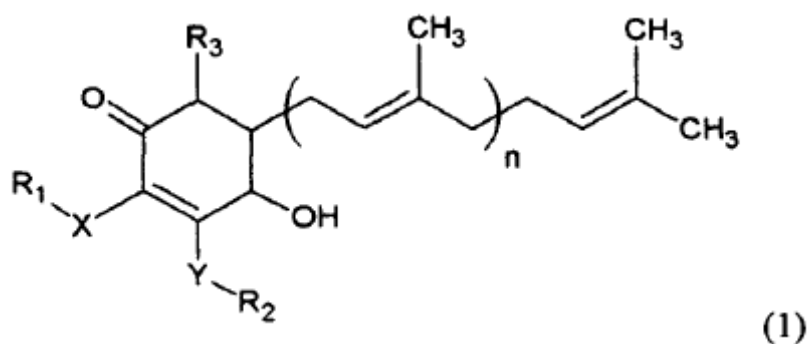
compuestos derivados de bifenilo, 4,7-dimetoxi-5-metil-1,3-benzodioxol y 2,2',5,5'-tetrametoxi-3,4,3',4'-bimetilendioxi-6,6'-dimetilbifenilo (Chiang, H. C., Wu, D. P., Cherng, I. W. y Ueng, C. H. 1995. "A sesquiterpene lactone, phenyl and biphenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*". Phytochemistry, 39: 613-616). En 1996, se aislaron cuatro triterpenoides de tipo ergostano novedosos (antcinas E y F y antcinatos de metilo G y H) por Cherng *et al.* 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 se aislaron dos esteroides relacionados con ergostano, los ácidos zhankuico D y E, junto con tres triterpenos relacionados con lanostano, ácido 15- $\alpha$ -acetildeshidrosulfurénico, ácido deshidroeburicoico y ácido deshidrosulfurénico por Yang *et al.* (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).

Se ha reseñado que los extractos de *Antrodia camphorata* tienen los efectos anteriormente mencionados de los experimentos anteriores, y se han analizado los componentes sucesivamente. Sin embargo, nunca se ha reseñado el uso potencial de extractos de *Antrodia camphorata* en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Son necesarios experimentos adicionales para identificar la composición eficaz para ayudar a tratar afecciones autoinmunitarias. Los componentes naturales de extractos de *Antrodia camphorata* contribuirán en gran medida a grandes efectos beneficiosos en la prevención o el tratamiento de lupus sistémico eritematoso si se encuentra la composición eficaz real. Además, esto ayudará a prevenir los efectos secundarios o complicaciones causados por fármacos químicos tales como esteroides en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

Se dan a conocer composiciones, procedimientos y kits para reducir el estrés oxidativo, y prolongar por tanto la esperanza de vida, en el documento US 2006/0135623 A1. Las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en la misma pueden proteger sustancialmente a individuos del estrés oxidativo, alargando así la esperanza de vida y reduciendo la incidencia de enfermedades relacionadas con la edad resultantes del daño oxidativo. Particularmente, dicho documento está dirigido a composiciones que contienen análogos de geranilgeranilacetona (GGA) y a otros compuestos que tienen actividad antioxidante. Con referencia a los párrafos [0096] a [0100] del documento US 2006/0135623 A1, se dan a conocer análogos de GGA (de clase Xa, Xb y Xc), incluyendo derivados de semiquinona, formas reducidas y oxidadas de coenzima Q10, y estos compuestos pueden sintetizarse mediante procedimientos de síntesis química de la materia. Sin embargo, estos compuestos son estructuralmente diferentes de los compuestos de la presente invención y el efecto terapéutico para diversas enfermedades autoinmunitarias no está aún determinado y requiere investigación adicional.

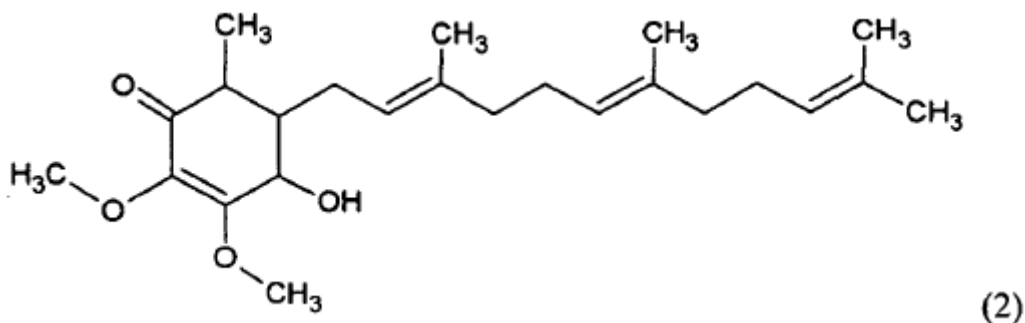
### 30 SUMARIO DE LA INVENCION

Para identificar cuáles son los compuestos que previenen o tratan enfermedades autoinmunitarias tales como LSE de los extractos de *Antrodia camphorata*, se aisló el compuesto de fórmula (1) y se purificó en la presente invención,



en la que X e Y pueden ser oxígeno o azufre; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son cada uno un átomo de hidrógeno, metilo o (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub> y m= 1-12; n= 1-12.

Es un compuesto preferido de fórmula general (1) 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)ciclohex-2-enona como se muestra en la fórmula (2), de fórmula molecular C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>, apariencia de polvo amarillo pálido y peso molecular de 390.



Los compuestos de ciclohexenona que tienen las estructuras de fórmula (1) y fórmula (2) se purifican de la extracción acuosa o extracción orgánica de *Antrodia camphorata*. Los disolventes orgánicos usados incluyen, pero sin limitación, alcoholes tales como metanol, etanol o propanol, ésteres tales como acetato de etilo, alcanos tales como hexano o alcanos halogenados tales como clorometano o cloroetano. Entre ellos, se prefiere alcohol, prefiriéndose particularmente etanol.

La presente invención proporciona compuestos de ciclohexenona de fórmula (1) y fórmula (2) para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como LSE. Los niveles de proteinuria de mamíferos con LSE se reducían, lo que puede ser debido al retardo de la progresión patológica de la nefritis; y los títulos de anticuerpos antinucleares en sangre se reducían también eficazmente, aliviando adicionalmente las autolesiones causadas por los anticuerpos antinucleares, cuando se suplementaban compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* a mamíferos con la enfermedad LSE. Además, la sustancia natural extraída de *Antrodia camphorata* puede usarse para aliviar las complicaciones y efectos secundarios causados por fármacos químicos tales como esteroides y mitigar los síntomas incómodos.

Por otro lado, los compuestos de fórmula (1) y/o fórmula (2) de la presente invención pueden incorporarse a composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como LSE para mejorar los síntomas de enfermedades autoinmunitarias en mamíferos tales como seres humanos. Las composiciones farmacéuticas incluyen no solo los compuestos de fórmula (1) y/o fórmula (2), sino también portadores farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de dichos portadores incluyen, pero sin limitación, excipientes tales como agua, cargas tales como sacarosa o almidón, aglutinantes tales como derivados de celulosa, diluyentes, disgregantes, potenciadores de la absorción o edulcorantes. Las composiciones farmacéuticas pueden fabricarse mezclando los compuestos de fórmula (1) y/o fórmula (2) con al menos uno de los portadores mediante procedimientos convencionales conocidos en el campo técnico farmacéutico, que pueden formularse, pero sin limitación, como polvos, comprimidos, cápsulas, aglomerados, gránulos u otra formulación líquida.

La presente invención se explica adicionalmente con la siguiente realización y ejemplos.

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra los efectos de los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* sobre los cambios de proteinuria en ratones NZB/WF1 hembra con LSE.

La Fig. 2 muestra los efectos de los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* sobre los cambios en los títulos de anticuerpos antinucleares anti-ADNbc en ratones NZB/WF1 hembra con LSE a diferentes puntos temporales. Panel (A): semana 0; panel (B): semana 4; panel (C): semana 8.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

Se extraen en primer lugar los micelios, cuerpos frutales o mezcla de ambos de *Antrodia camphorata* con agua o disolventes orgánicos, obteniéndose el extracto acuoso o extracto de disolvente orgánico de *Antrodia camphorata*, usando procedimientos bien conocidos en la materia. Los disolventes orgánicos incluyen, pero sin limitación, alcoholes tales como metanol, etanol o propanol; ésteres tales como acetato de etilo; alcanos tales como hexano o alcanos halogenados tales como clorometano y cloroetano. Entre ellos, se prefiere el alcohol, prefiriéndose particularmente etanol.

Se sometieron los extractos acuoso o de disolvente orgánico de *Antrodia camphorata* a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para aislamiento y purificación. Se recuperó cada fracción y se aplicó al ensayo de los niveles de proteinuria, títulos de anticuerpos antinucleares y similares después del tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria tal como LSE. Se analizó la composición de las fracciones con función potente de alivio de síntomas y se ensayaron adicionalmente con ensayos bioquímicos relacionados. El enfoque anterior condujo entonces a la identificación de compuestos de fórmula (1) y/o fórmula (2) para uso en la reducción de los niveles de proteína de orina y anticuerpos antinucleares, y para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como LSE y enfermedades relacionadas con el riñón. Además, los compuestos de fórmula (1) y/o fórmula (2) pueden

incorporarse a composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como LSE para dejar que esta sustancia natural mejore significativamente los síntomas de enfermedades autoinmunitarias sin desencadenar efectos secundarios ni complicaciones.

- 5 El compuesto 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)-ciclohex-2-enona de fórmula (2) se explica a continuación como ejemplo de la presente invención. Se evaluaron los efectos en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como LSE alimentando a ratones NZB/WF1 hembra del modelo de lupus con el compuesto de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* anteriormente mencionado y ensayando los niveles de proteinuria y anticuerpos antinucleares. Los ensayos anteriores han probado que la 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)ciclohex-2-enona de *Antrodia camphorata* puede usarse para retardar la nefritis y el daño renal, para reducir el nivel de proteinuria y para inhibir o retardar eficazmente la síntesis de anticuerpos antinucleares en mamíferos tales como seres humanos para aliviar las autolesiones causadas por anticuerpos antinucleares y tratar adicionalmente LSE. Se describen a continuación los detalles de los ejemplos:

#### Ejemplo 1

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

- 15 Se dispusieron en un matraz 100 g de micelios, cuerpos frutales o mezclas de ambos de *Antrodia camphorata*. Se añadió una cantidad apropiada de agua y alcohol (disolución alcohólica al 70-100%) al matraz y se agitó a 20-25°C durante al menos 1 hora. Se filtró la disolución a través de un filtro y una membrana de 0,45 µm y se recogió el filtrado como extracto.

- 20 Se sometió el filtrado de *Antrodia camphorata* a un análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se efectuó la separación en una columna RP18, consistiendo la fase móvil en metanol (A) y ácido acético al 0,1-0,5% (B), con condiciones de gradiente de 0-10 min al 95%-20% de B, 10-20 min al 20%-10% de B, 20-35 min al 10%-10% de B, 35-40 min al 10%-95% de B, a un caudal de 1 ml/min. Se monitorizó el efluente de la columna con un detector de UV-visible.

- 25 Se recogieron las fracciones eluidas a 25-30 min y se concentraron, proporcionando 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)ciclohex-2-enona, un producto en polvo amarillo pálido. El análisis de 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)ciclohex-2-enona mostró la fórmula molecular  $C_{24}H_{38}O_4$ , un peso molecular de 390 y un punto de fusión de 48°C-52°C. La investigación de los espectros de RMN mostró: RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 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; RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 12,31, 16,1, 16,12, 17,67, 25,67, 26,44, 26,74, 27,00, 39,71, 39,81, 40,27, 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.

#### Ejemplo 2

##### Evaluación de los efectos para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como LSE con los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata*

- 35 Los pacientes autoinmunitarios muestran manifestaciones clínicas de aumento obvio de autoanticuerpos y complejos inmunitarios, cuyos antígenos son proteínas normales ampliamente extendidas en núcleo celular, citoplasma o membrana celular. La presencia de anticuerpos antinucleares (AAN) se usa por lo tanto con importancia de diagnóstico para el cribado de enfermedad autoinmunitaria. Los anticuerpos antinucleares relacionados con lupus sistémico eritematoso (LSE) se orientan a ADNbc (ADN bicatenario), ribonucleoproteínas relacionadas con el ARN tales como Sm, Ro, La, RNP, fosfolípidos y P ribosómico y otros. Entre ellos, los anti-ADNbc, anti-Sm y aPL (antifosfolípidos) muestran la mayor importancia patológica. Los anticuerpos anti-ADNbc son altamente específicos de LSE y se correlacionan con el daño renal. Por lo tanto, la presente invención evalúa los efectos de los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* en la prevención o tratamiento de LSE mediante el establecimiento de un modelo animal de LSE, detectando el título de anticuerpos antinucleares anti-ADNbc en sangre y el nivel de proteinuria de los modelos animales. Se describen a continuación los detalles de las etapas:

- 45 (1) Establecimiento de un modelo animal para LSE

Los ratones NZB/WF1 hembra desarrollan espontáneamente síndromes de tipo LSE, tales como la generación de anticuerpos antinucleares, proteinuria y toxicidad renal que causa la muerte. La enfermedad es más grave en ratones hembra que en ratones macho; la morbilidad de los ratones hembra es también mayor que la de los ratones macho. Por lo tanto, se usaron ratones NZB/WF1 hembra para el cribado de fármacos anti-LSE en este estudio.

- 50 Se analizaron cada dos semanas 30 ratones NZB/WF1 hembra (adquiridos en Jackson Lab, EE.UU.) de entre 12-24 semanas de edad para determinar los niveles de proteinuria y una vez al mes para evaluar los títulos de autoanticuerpo antinuclear (AAN). Los títulos aumentados de AAN y la respuesta positiva implicaban que los ratones NZB/WF1 hembra iban a desarrollar LSE y estaban listos para agrupamiento. A las 22 semanas de edad, se dividieron aleatoriamente los ratones que mostraban los síndromes anteriormente mencionados en 3 grupos (10 ratones por grupo, se administró agua al grupo de control negativo, se dio esteroide al grupo de control positivo y se administraron compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* al grupo experimental) y se fijó el tiempo de

inicio del experimento como semana 0. Además, 10 ratones B6 (adquiridos en el National Laboratory Animal Center, Taiwán) sin síndrome de LSE, que eran ratones normales, sirvieron como grupo de referencia. Se tratan todos los grupos como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamiento de los grupos de animales

Cepa de ratón	Grupo	Administración oral		
		Agua	Prednisolona 1,25 mg/kg	Cyc 50 mg/kg
B6	Blanco	-	-	-
Ratones NZB/WF1 hembra (LSE)	Control negativo	+	-	-
	Control positivo	-	+	-
	Experimental	-	-	+

5

El grupo de referencia de la Tabla 1 eran ratones B6 sin síndrome de LSE, que no recibieron tratamiento y sí una dieta normal para crecimiento natural. Los ratones NZB/WF1 hembra que podían expresar síndromes de LSE sirvieron como grupos de control negativo y de control positivo. Los ratones del primer grupo recibieron agua normal, en el segundo se medicaron por vía oral con 1,25 mg/kg de prednisolona, el fármaco de LSE. Los ratones del grupo experimental se medicaron por vía oral con 50 mg/kg de compuestos de ciclohexenona del ejemplo 1. Se alimentaron los ratones con las sustancias anteriormente mencionadas una vez al día a partir de las 23 semanas de edad, y se hace referencia a este periodo de tiempo como la primera semana de este experimento. El experimento consistía en 48 semanas; se recogieron muestras de sangre y orina rutinariamente para evaluar el efecto de los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* sobre la enfermedad de LSE.

10

15 (2) Efectos de los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* sobre los cambios de proteinuria en ratones NZB/WF1 hembra con LSE

Los pacientes con LSE desarrollan inflamación y daño renal que causan fugas de proteína del riñón al fluido. Esto conduce a un aumento de la proteinuria. Los cambios de proteinuria pueden usarse para evaluar los efectos de los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* sobre el LSE. Se recogieron las muestras de orina de los ratones dos veces por semana. Se ensayaron 10 µl de orina con Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.) y se leyeron a 450 nm con un analizador ELISA para determinar la concentración de proteína con una curva patrón. Los resultados de muestran en la Fig. 1.

20

La Fig. 1 muestra los cambios de proteinuria en ratones NZB/WF1 hembra con LSE después del uso de compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* en diferentes grupos. Las concentraciones de proteína en la orina de ratones del grupo de referencia en la semana 6 eran similares a los de la semana 0 (a las 28 semanas de edad), que estaban dentro de los niveles normales de 65 mg/dl-75 mg/dl, mientras que los ratones en el grupo de control negativo mostraron un aumento de 2,76 veces en los niveles de proteinuria después de 6 semanas de experimento (89,16 mg/dl frente a 246 mg/dl). Se mostró el síntoma de LSE típico de un aumento brusco de la excreción de proteína debido a daño renal. Se mostró un bajo nivel de proteinuria de 32,6 mg/dl en ratones a los que se dio prednisolona del grupo de control positivo. El nivel de proteinuria alcanzó 118,2 mg/dl después de 6 semanas de experimento para los ratones administrados por vía oral con 50 mg/kg de compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* en el grupo experimental, que era un aumento de 1,3 veces de antes del experimento. Por lo tanto, los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* podían inhibir eficazmente el daño e inflamación renales causados por LSE, y aliviaban adicionalmente los síntomas de proteinuria en ratones con LSE después de 6 semanas de alimentación. Además, la ciclohexenona de *Antrodia camphorata* podía aplicarse también para tratar la proteinuria en exceso causada por enfermedades renales relacionadas, pero no está limitada a ello.

25

30

35

(3) Efectos de los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* sobre los cambios de anticuerpos antinucleares en ratones NZB/WF1 hembra con LSE

Se determinaron los niveles de anticuerpos antinucleares de ADNbc en este estudio para evaluar los efectos de los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* sobre ratones con LSE. Se recogieron muestras de sangre de los ratones de las cuencas oculares cada cuatro semanas. Se separaron las células sanguíneas y plasma después de centrifugación. Se ensayaron 10 µl de plasma con el kit Mouse Anti-dsDNA IgG ELISA (adi Alpha Diagnostic, EE.UU.) para determinar los títulos de anticuerpos. Los resultados se muestran en la Fig. 2.

40

La Fig. 2 muestra los títulos de anticuerpos antinucleares anti-ADNbc durante la semana 0, la semana 4 y la semana 8 en diferentes grupos de ratones NZB/WF1 hembra con LSE después del uso de compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata*. Los ratones del grupo de referencia que no tienen síntomas de LSE no mostraron anticuerpos antinucleares anti-ADNbc de la semana 0 a la semana 8 del experimento (de 22 a 30 semanas de edad), mientras

45

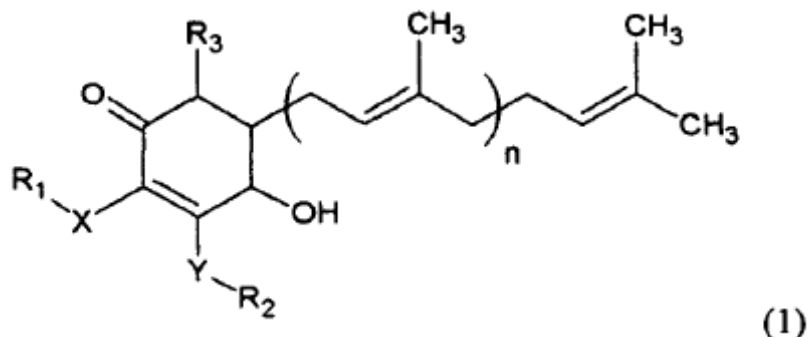
que los títulos de anticuerpos antinucleares anti-ADNbc para ratones en el grupo de control negativo aumentaron de menos de 10 mg/dl a más de 150 mg/dl al cabo de 8 semanas. Los títulos de anticuerpos antinucleares anti-ADNbc para ratones en el grupo positivo administrados con prednisolona se redujeron aproximadamente un 50% en la semana 8; mientras que los ratones en el grupo experimental administrado con compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* mostraron títulos significativamente menores de anticuerpos antinucleares anti-ADNbc que aquellos del grupo negativo durante las 8 semanas del experimento. El título de anticuerpos antinucleares se redujo un 34% en la semana 8 para los ratones del grupo experimental. Por lo tanto, los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* podían inhibir o retardar eficazmente la síntesis de anticuerpos antinucleares en mamíferos con LSE, y aliviaban adicionalmente las autolesiones por anticuerpos antinucleares en el tratamiento de enfermedad de LSE.

Por otro lado, puesto que los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* pueden usarse para inhibir o retardar la síntesis masiva de anticuerpos antinucleares causada por enfermedades autoinmunitarias tales como LSE, así como reducir el nivel de proteinuria debido a lesión renal, pueden por lo tanto aplicarse a enfermedades que formarán anticuerpos antinucleares y causarán daños renales, tales como escleroderma, síndrome de Sjögren, púrpura anafilactoide, nefritis reumatoide u otras enfermedades autoinmunitarias que causarán daños a tejidos y órganos incluyendo, pero sin limitación, piel, articulaciones, esqueleto, riñón, sistema cardiovascular, sistema de aglutinación, intestinos y estómago, membrana serosa (pericardio, pleura, peritoneo) y sistema neuronal. Además, los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* pueden usarse para reducir los anticuerpos anti-ADNbc, aliviando adicionalmente el daño renal eficazmente y protegiendo el riñón.

En resumen, el compuesto 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)ciclohex-2-enona aislado de *Antrodia camphorata* según la invención puede usarse para tratar eficazmente síntomas tales como altos niveles de proteinuria y anticuerpos antinucleares en enfermedades autoinmunitarias, además de aliviar las autolesiones en tejidos y órganos causadas por estas enfermedades en mamíferos tales como seres humanos. Además, el compuesto puede retardar los daños corporales debidos a enfermedad renal basándose en los efectos protectores. Por otro lado, los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* son de un extracto natural, que no inducirá efectos secundarios incómodos, toxicidad ni complicaciones. Pueden combinarse con fármacos químicos para tener menores dosis de esteroides y menores efectos secundarios tóxicos. Además, pueden incorporarse a composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas incluyen no solo los compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata*, sino también portadores farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de dichos portadores incluyen, pero sin limitación, excipientes tales como agua, cargas tales como sacarosa o almidón, aglutinantes tales como derivados de celulosa, diluyentes, disgregantes, potenciadores de la absorción o edulcorantes. Las composiciones farmacéuticas pueden fabricarse mezclando compuestos de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* con al menos uno de los portadores mediante procedimientos convencionales conocidos en el campo técnico farmacéutico, que pueden formularse en forma de polvo, comprimidos, cápsulas, aglomerados, gránulos u otras formulaciones líquidas, pero sin limitación. Puede lograrse entonces el fin de la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como LSE y enfermedades renales en mamíferos tales como seres humanos.

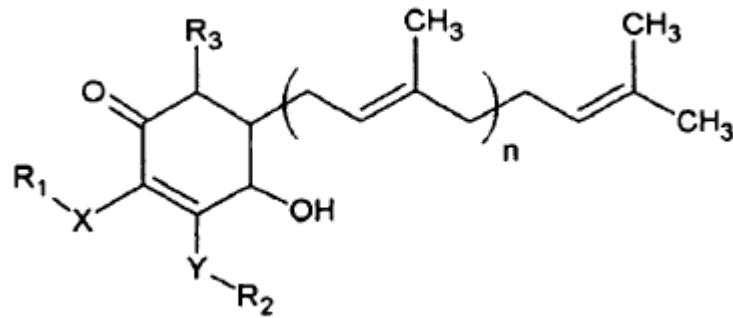
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de ciclohexenona de *Antrodia camphorata* para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, que tiene la siguiente fórmula:



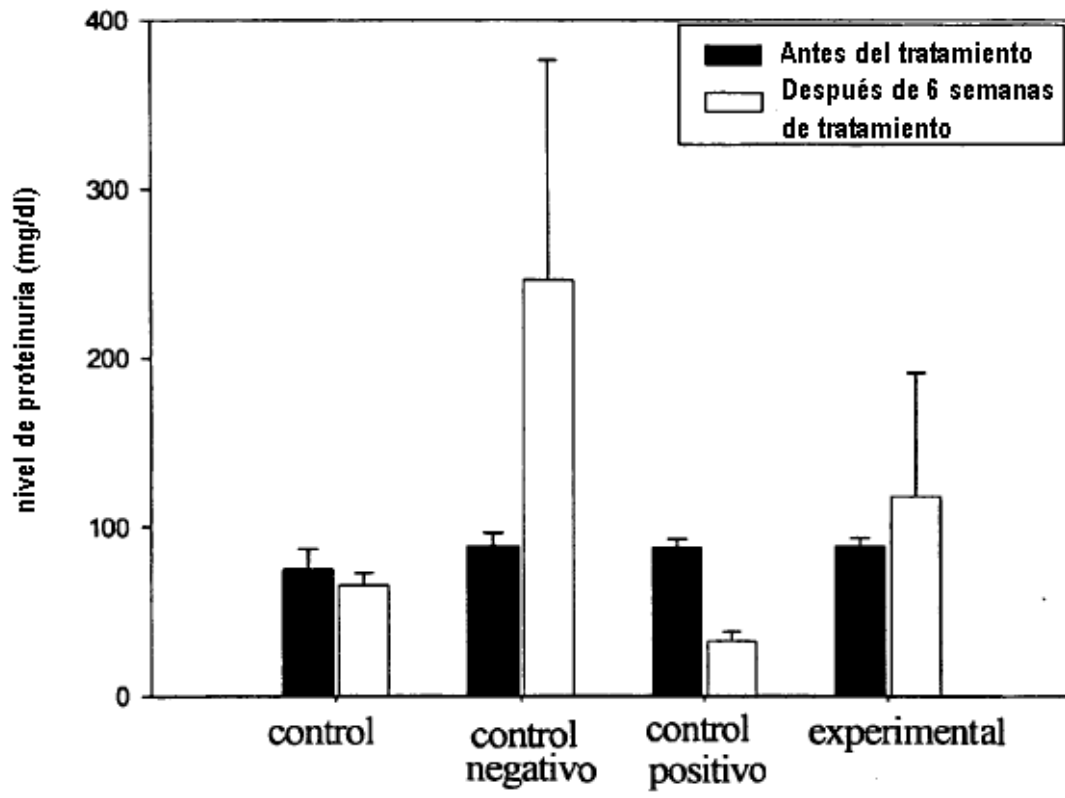
- 5 en la que X e Y pueden ser oxígeno o azufre; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son cada uno un átomo de hidrógeno, metilo o (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub> y m= 1-12; n= 1-12.
2. El compuesto de ciclohexenona para uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto se aísla de extractos de disolvente orgánico de *Antrodia camphorata*.
- 10 3. El compuesto de ciclohexenona para uso según la reivindicación 2, en el que los disolventes orgánicos se seleccionan del grupo consistente en alcoholes, ésteres, alcanos y alcanos halogenados.
4. El compuesto de ciclohexenona para uso según la reivindicación 3, en el que el alcohol es etanol.
5. El compuesto de ciclohexenona para uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto se aísla de extractos acuosos de *Antrodia camphorata*.
- 15 6. El compuesto de ciclohexenona para uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto es 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)ciclohex-2-enona.
7. El compuesto de ciclohexenona para uso según la reivindicación 6, en el que el compuesto puede aliviar el daño renal causado por enfermedades autoinmunitarias en mamíferos y los daños en órganos y tejidos causados por anticuerpos antinucleares.
- 20 8. El compuesto de ciclohexenona para uso según la reivindicación 7, en el que el mamífero es un ser humano.
9. El compuesto de ciclohexenona para uso según la reivindicación 8, en el que la enfermedad autoinmunitaria es lupus sistémico eritematoso (LSE).
10. El compuesto de ciclohexenona para uso según la reivindicación 9, en el que el compuesto puede aliviar el daño renal causado por LSE basándose en la reducción de la proteinuria en mamíferos.
- 25 11. El compuesto de ciclohexenona para uso según la reivindicación 9, en el que el compuesto puede aliviar los daños de órganos y tejidos causados por LSE basándose en la reducción de los títulos de anticuerpos antinucleares (AAN) en mamíferos.
12. El compuesto de ciclohexenona para uso según la reivindicación 11, en el que los anticuerpos antinucleares son anticuerpos antinucleares anti-ADNbc.
- 30 13. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias que comprende al menos un ingrediente activo del compuesto que tiene la siguiente fórmula y un portador farmacéuticamente aceptable



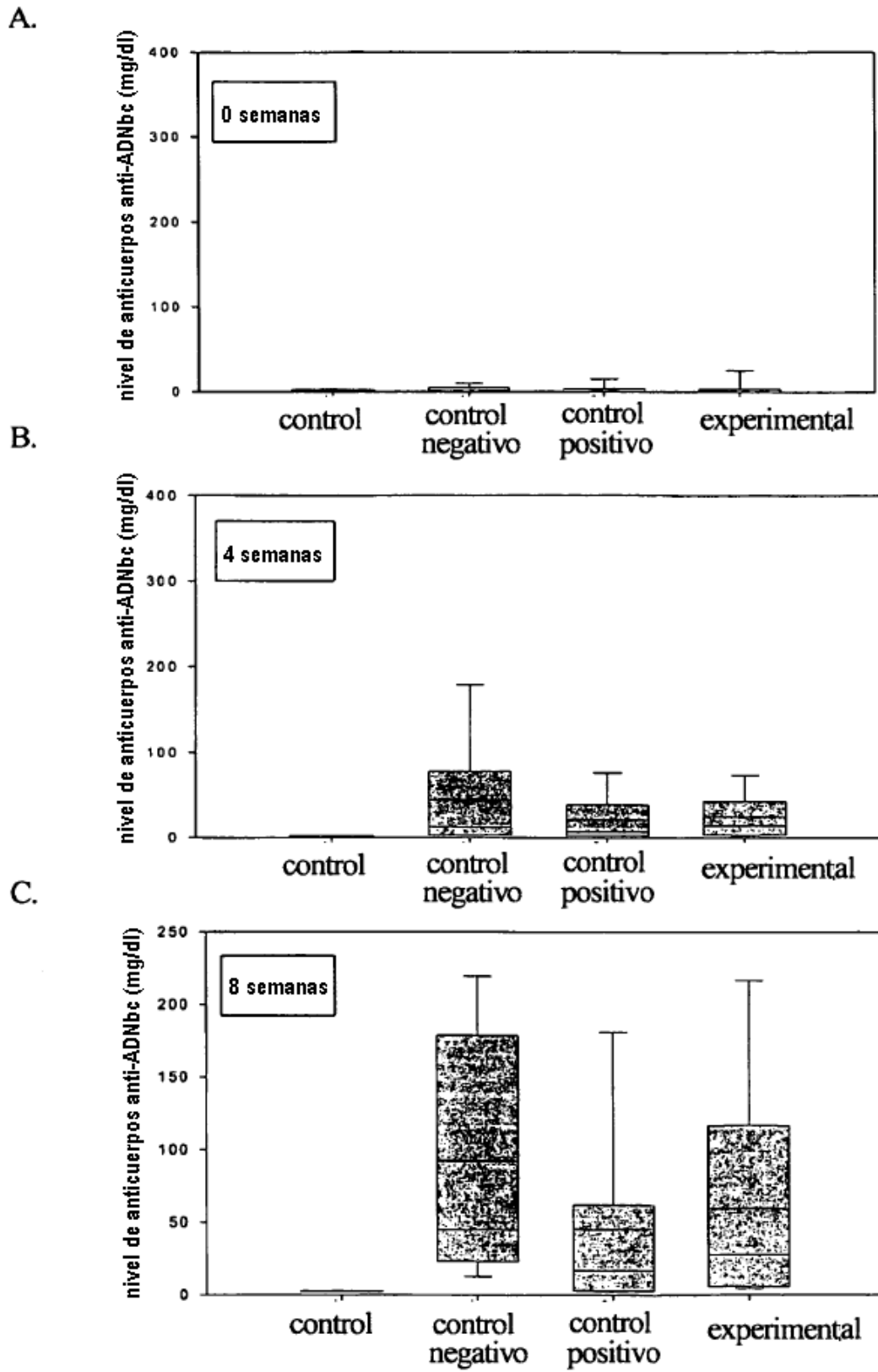


en la que X e Y pueden ser oxígeno o azufre; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son cada uno un átomo de hidrógeno, metilo o (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub> y m= 1-12; n= 1-12.

- 5 14. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 13, en la que la enfermedad autoinmunitaria es lupus sistémico eritematoso (LSE).
15. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias que comprende al menos un ingrediente activo 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)ciclohex-2-enona y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 16. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 15, en la que la enfermedad autoinmunitaria es lupus sistémico eritematoso (LSE).



**FIG 1**



**FIG 2**