

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 533**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/19** (2006.01)

**A61K 31/22** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

**A61P 3/04** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2008 E 08876930 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2331089**

54 Título: **Usos de derivados de sesquiterpeno**

30 Prioridad:

**11.09.2008 KR 20080089971**

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

**19.02.2016**

73 Titular/es:

**KWANG DONG PHARM. CO., LTD. (100.0%)  
1577-4, Seocho-dong Seocho-gu  
Seoul 137-875, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, TAE-SUN y  
KIM, HA-WON**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 560 533 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**

Usos de derivados de sesquiterpeno

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION****CAMPO DE LA INVENCION**

- 5 La presente invención se refiere a una composición para prevenir o tratar la hiperlipidemia, el hígado graso, la diabetes o la obesidad, que comprende un derivado de sesquiterpeno seleccionado del grupo que consiste en acetato de cedrilo,  $\alpha$ -cedreno,  $\beta$ -cedreno, cedreno epóxido, metil-cedrilo-éter, metil-cedrilo-cetona y cedrerol.

**DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA**

- 10 Cambios en los estilos de vida y entornos de vida dan como resultado un aumento patógeno de la obesidad de grasa visceral en la gente moderna. La aparición frecuente de la obesidad visceral conduce, a su vez, a un rápido aumento en el desarrollo de síndromes metabólicos que van acompañados de diabetes, hipertensión, trastornos del metabolismo lipídico, resistencia a la insulina y similares. Estas enfermedades concomitantes aumentan un factor de riesgo mutuo y son enfermedades comunes que están asociadas con una variedad de cambios metabólicos tales como senescencia, condiciones de estrés, función inmune comprometida y similares.

- 15 De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de 2005, se encontró que el 32% de los adultos coreanos mayores de 20 años de edad padecen obesidad (35,2% de los hombres y 28,3% de las mujeres). Recientemente, la incidencia de la obesidad infantil también se ha disparado en Corea. Según los datos de la encuesta de 2005, al 11,3% de los niños de la escuela primaria, al 10,7% de los estudiantes junior de secundaria y al 16% de los estudiantes senior de secundaria se les diagnosticó obesidad (índice de masa corporal (IMC)  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ). Además, el sobrepeso (IMC  $\geq 23 \text{ kg/m}^2$ ) o el 17% de los menores obesos mostró síndrome metabólico.

- 20 Entonces, un aumento de este tipo en la población con sobrepeso y obesa contribuye a un aumento de la tasa de prevalencia de enfermedades crónicas. Por ejemplo, de acuerdo con los datos de la encuesta de 2005, las tasas de prevalencia de la hipertensión (30,2% de los hombres y 25,6% de las mujeres), la diabetes (9,0% de los hombres y 7,2% de las mujeres) y la hipercolesterolemia (7,5% de los hombres y 8,8% de mujeres) del pueblo coreano mayor de 30 años eran significativamente más altas que en otros países.

- 25 En base a los datos de la encuesta, la obesidad puede resultar en una pérdida socio-económica estimada de aproximadamente 1,017 trillones de won en 2001. Para este fin, el Plan de Salud de Corea de 2010 fue lanzado por el Ministerio de Salud y Bienestar Social como su política de salud pública. De acuerdo con este documento, se establecieron metas principales para lograr una tasa de obesidad en adultos de menos de 20% y una tasa de obesidad juvenil de menos de 15%. Como una estrategia de implementación para lograr estos objetivos, se intentó encontrar un método de definición y medición preciso de la obesidad.

- 30 Los mejores efectos terapéuticos sobre la obesidad sólo pueden lograrse con una combinación de terapia de la dieta, terapia de ejercicio y terapia de modificación de la conducta. Sin embargo, estos métodos terapéuticos requieren mucho tiempo y esfuerzo en unión con una dificultad en la práctica. Por estas razones, se utilizan ampliamente fármacos anti-obesidad o productos de dieta. Sin embargo, orlistat, que se utiliza actualmente como un fármaco anti-obesidad, adolece de efectos secundarios adversos tales como esteatorrea (heces grasas), producción de gas entérico y flatos. También se sabe que otro fármaco anti-obesidad, sibutramina, tiene efectos secundarios adversos tales como dolor de cabeza, sed, anorexia, insomnio, estreñimiento y similares. Además, orlistat inhibe la absorción de las vitaminas D y E, mientras que la administración de fentermina y sibutramina resulta en efectos secundarios adversos tales como aumento del ritmo cardíaco/palpitaciones, vértigo, y similares.

- 35 Recientemente, los valores y demandas de los medicamentos a base de hierbas o naturales están aumentando a la vista de los efectos secundarios adversos de los fármacos sintéticos y las limitaciones de la medicina occidental en el tratamiento de enfermedades crónicas. Para hacer frente a esta tendencia, los autores de la presente invención han rastreado una sustancia anti-obesidad de una diversidad de plantas silvestres o voluntarias y luego prestaron atención a *Cupressus funebris*.

- 40

- 45

*Cupressus funebris* es un árbol alto de hoja perenne que pertenece al género *Cupressus*, que está ampliamente repartido en las regiones templadas cálidas inferior a 2.000 m del centro y el suroeste de China a Vietnam. Su nombre científico se denomina también *Chamaecyparis funebris* y su nombre común es el ciprés llorón chino. Puede crecer en suelo arenoso muy ácido o suelo arcilloso. Requiere un buen drenaje y un suelo seco, pero no puede crecer bien en la sombra. Es un árbol conífero de tamaño mediano que crece hasta 20- 35 m de altura, con un tronco de hasta 2 m de diámetro. Las hojas son de tipo escama de hasta 5 mm de largo en fuertes brotes de color plomo.

Se ha utilizado en el tratamiento de hemorroides sangrantes o de un flujo menstrual excesivo en China (J.A. Duke y E.S. Ayensu, *Medicinal Plants of China*, pág. 705, Reference Publications, Inc., 1985). Se ha utilizado en la fabricación de perfume, ingrediente de aceite esencial, perfume de jabón y champú en Vietnam (Luu y Thomas, 2004. págs. 20-22, *Conifers of Vietnam*, Darwin Initiative). Los aceites esenciales mediante destilación al vapor de la madera de *Cupressus funebris* se han utilizado en el ingrediente de perfume, y existen muchos monoterpenos en la hoja, pero la madera contiene principalmente sesquiterpenos. Los sesquiterpenos son una clase de terpenos que consiste en tres unidades de isopreno y tienen la fórmula molecular  $C_{15}H_{24}$ . Aunque los sesquiterpenos comprenden 0, 1, 2 ó 3 anillos, los principales sesquiterpenos en *Cupressus funebris* son compuestos tricíclicos. Existen muchas clases de sesquiterpenos en la madera de *Cupressus funebris* tales como thujopseno (29,9%), alfa-cedreno (26,4%), beta-cedreno (9,2%), cedrol (9,6%), widdrol (9,5%), alfa-funebreno (0,7%), beta-funebreno (0,2%), acetato de cedrilo (0,1%) (Duquesnoy et al, 2006, *Flavour and Fragrance Journal*, 21: 453-457; Adams, 1991, *Modern Methods of Plant Analysis New Series*, vol. 12, págs. 159-173).

También se informó que muchos tipos de plantas que pertenecen al género *Cupressus* tal como *Cupressus macnabiana* (Laurence G. Cool, *Phytochemistry*, 58(6): 969-972 (2001)), *Cupressus nootkatensis* (Erdtman, H. et al., *Acta Chem. Scand.*, 11:1157-1161 (1957)), *Cupressus sempervirens* (Seyyed Ahmad Emami et al., *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2):103-108 (2006)), *Cupressus macrocarpa* (Srikrishna et al., *Synthetic Communications*, 37 (17): 2855-2860 (2007)), *Cupressus bakeri* (Koon-Sin Ngo et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 189-194 (2000)) incluyen sesquiterpenos.

Diversos derivados de sesquiterpeno tricíclicos pueden ser sintetizados mediante un método de síntesis orgánica, y la mayoría de los derivados pueden ser sintetizados mediante el método semi-sintético. Derivados de sesquiterpeno sintéticos o semi-sintéticos representativos son cedreno epóxido ( $C_{15}H_{24}O$ ), formiato de cedrilo ( $C_{16}H_{26}O_2$ ), metil-cedrilo-éter ( $C_{16}H_{28}O$ ), cloveno ( $C_{15}H_{24}$ ), neocloveno ( $C_{15}H_{24}$ ), 8(15)-cedren-9-ol ( $C_{15}H_{24}O$ ), sativeno ( $C_{15}H_{24}$ ), epicedrol ( $C_{15}H_{26}O$ ), metil-cedrilo-cetona ( $C_{17}H_{26}O$ ) y cedrenol ( $C_{15}H_{24}O$ ).

La patente de EE.UU. N° 7071195 describe un método para tratar la obesidad con derivados de amina o amida que actúan como ligandos para el neuropéptido Y Y5. La patente de EE.UU. N° 702722 describe un derivado de tiazolidindiona para tratar la diabetes, la hiperlipidemia o la obesidad.

La patente de EE.UU. N° 6987131 describe una composición para el tratamiento de la hiperlipidemia, que incluye fenilacetilglutamina, fenilacetilisoglutamina o ácido fenilacético. La patente de EE.UU. N° 6942967 sugiere la proteína apobec-1 como una molécula diana para el tratamiento de la arteriosclerosis, la hiperlipidemia, la obesidad y la diabetes.

El documento WO 99/07394 A1 describe extractos de *Cupressus sempervirens*, utilizados para prevenir o tratar la hipercolesterolemia y perturbaciones de lípidos en seres humanos y animales, y describe terpenoides que incluyen  $\alpha$ -cedrol entre los extractos arriba mencionados. Además de ello, el documento reseña que la administración de los extractos dio como resultado una reducción importante del nivel de colesterol, nivel de lipoproteínas de baja densidad (LDL), así como casos de lesión ateromática.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE ESTA INVENCIÓN

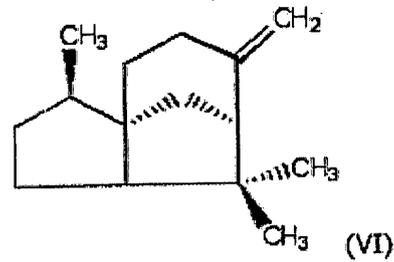
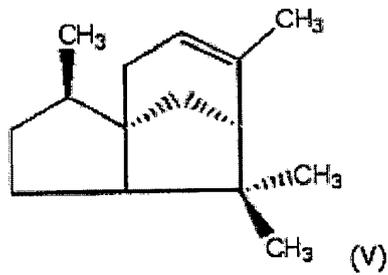
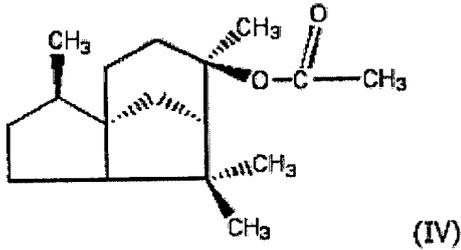
Los autores de la presente invención han realizado intensas investigaciones para desarrollar un compuesto natural que tiene eficacias anti-obesidad, anti-hiperlipidemia y/o anti-diabetes. Se describe en esta memoria un extracto de *Cupressus funebris* o *Chamaecyparis funebris* pertenecientes al género *Cupressus*, un derivado de sesquiterpeno de *Cupressus funebris* o *Chamaecyparis funebris* y un derivado de sesquiterpeno sintético con una estructura similar a un derivado del mismo que tienen eficacias arriba descritas.

Se describe en esta memoria una composición que comprende un derivado de sesquiterpeno como un ingrediente activo para prevenir o tratar la hiperlipidemia, hígado graso, diabetes o la obesidad.

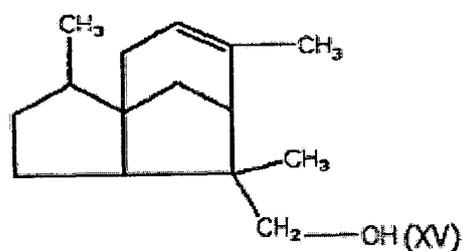
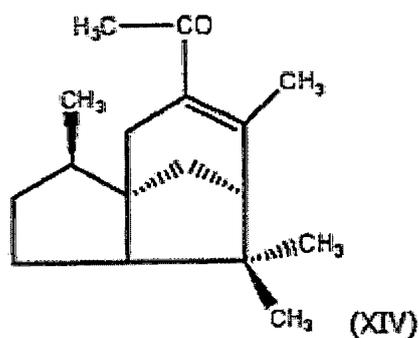
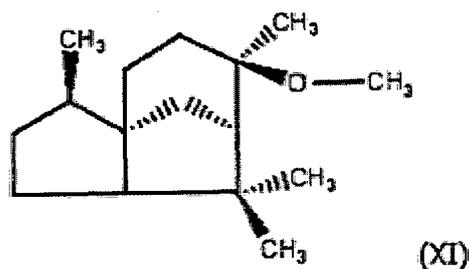
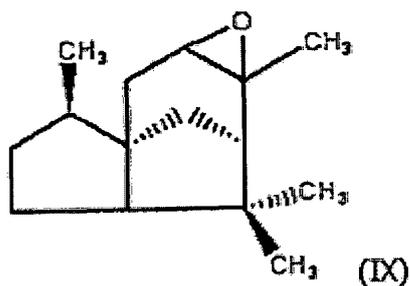
Se describe en esta memoria un método para preparar un derivado de sesquiterpeno del género *Cupressus*.

Otros objetos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada junto con las reivindicaciones y dibujos adjuntos.

- 5 En un aspecto de esta invención, se proporciona una composición para uso en la prevención o tratamiento de la hiperlipidemia, hígado graso, diabetes u obesidad, que comprende un derivado de sesquiterpeno seleccionado del grupo que consiste en acetato de cedrilo representado por la siguiente fórmula IV,  $\alpha$ -cedreno representado por la siguiente fórmula V y  $\beta$ -cedreno representado por la siguiente fórmula VI como un ingrediente activo.



- 10 En otro aspecto de esta invención, se proporciona una composición para uso en prevenir o tratar la hiperlipidemia, hígado graso, diabetes u obesidad, que comprende un derivado de sesquiterpeno seleccionado del grupo que consiste en cedreno epóxido representado por la siguiente formula IX, metil-cedrilo-éter representado por la siguiente formula XI, metil-cedrilo-cetona representada por la siguiente formula XIV y cedrenol representado por la siguiente formula XV, como un ingrediente activo:



Derivados de sesquiterpenos distintos de los de las fórmulas (IV), (V), (VI), (IX), (XI), (XIV) y (XV) de arriba se mencionan en esta memoria sólo como referencia y/o comparación.

5 Los autores de la presente invención han realizado intensas investigaciones para desarrollar un compuesto natural que tenga eficacias anti-obesidad, anti-hiperlipidemia y/o anti-diabetes. Se describe en esta memoria un extracto de *Cupressus funebris* o *Chamaecypris funebris* pertenecientes al género *Cupressus*, un derivado de sesquiterpeno de *Cupressus funebris* o *Chamaecypris funebris* y un derivado de sesquiterpeno sintético con una estructura similar a un derivado del mismo tienen eficacias arriba descritas.

10 El compuesto representado por las fórmulas anteriores exhibe eficacias de prevención o tratamiento en la hiperlipidemia, hígado graso y la obesidad. Tal como se demuestra en los ejemplos que figuran más adelante, los derivados de sesquiterpeno contribuyen a una disminución en el peso de grasa corporal, peso de grasa visceral, niveles de colesterol total y nivel de triglicéridos en el plasma e hígado, exhibiendo finalmente eficacias de prevención o tratamiento en la hiperlipidemia, hígado graso y obesidad. Además, los derivados de sesquiterpeno contribuyen a reducir significativamente tanto los niveles de glucosa en sangre como de insulina en sangre en un

estado de ayuno, exhibiendo eficacias de mejora en la diabetes de tipo II o resistencia a la insulina y la inflamación metabólica estrechamente asociadas a las mismas.

De acuerdo con una realización preferible, los derivados de sesquiterpeno están contenidos en extractos o fracciones del género *Cupressus*.

- 5 El género *Cupressus*, un árbol de hoja perenne y alto, es uno de varios géneros dentro de la familia Cupressaceae que tienen el nombre común de ciprés. Aproximadamente 20 especies pertenecen a *Cupressus*, que se cultivan como árboles decorativos o se cultivan por su madera. Son nativos de localidades dispersas en las regiones principalmente templadas cálidas en el hemisferio norte, incluyendo Asia, Europa y América del Norte. Son grandes arbustos que crecen hasta 25 m de altura, especialmente en forma de pirámide cuando son jóvenes.
- 10 El árbol *Cupressus*, útil en la presente invención, puede incluir cualquiera de los derivados de sesquiterpeno *Cupressus* que contienen, pero no se limitan a, preferiblemente *Cupressus macnabiana* (Laurence G. Cool, *Phytochemistry*, 58(6): 969-972 (2001)), *Cupressus nootkatensis* (Erdtman, H. et al., *Acta Chem. Scand.*, 11: 1157-1161 (1957)), *Cupressus sempervirens* (Seyyed Ahmad Emami et al., *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2):103-108 (2006)), *Cupressus macrocarpa* (Srikrishna et al., *Synthetic Communications*, 37 (17): 2855-2860 (2007)), *Cupressus bakeri* (Koon-Sin Ngo et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 189-194 (2000)) o *Cupressus funebris*, y lo más preferiblemente *Cupressus funebris*.
- 15

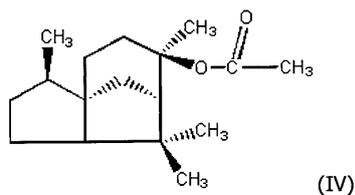
El extracto de *Cupressus* sp., que contiene derivados de sesquiterpeno como ingredientes activos, se puede obtener mediante la extracción de *Cupressus* sp. (preferiblemente el xilema de *Cupressus* sp.) con diversos disolventes de extracción: preferiblemente, (a) alcohol inferior absoluto o portador de agua que contiene 1-4 átomos de carbono (metanol, etanol, propanol, butanol, *n*-propanol, iso-propanol y *n*-butanol etc.), (b) mezcla de alcohol inferior y agua, (c) acetona, (d) acetato de etilo, (e) cloroformo, (f) 1,3-butilenglicol, (g) hexano, (h) éter dietílico, (i) acetato de butilo y (j) agua.

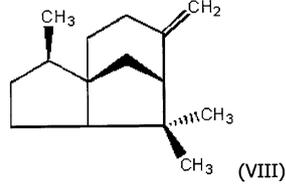
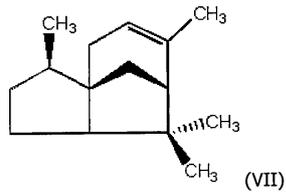
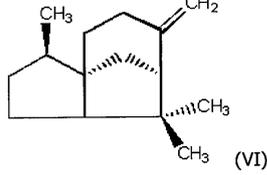
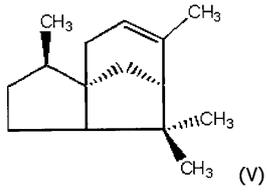
20

La fracción del género *Cupressus* que contiene derivados de sesquiterpeno se refiere a una forma aislada o purificada obtenida mediante un aislamiento o purificación ulterior de extractos de *Cupressus* sp. Por ejemplo, se podría apreciar que cualquier fracción obtenida utilizando una diversidad de métodos de purificación adicionales tales como una ultrafiltración, con un valor definido de corte del peso molecular y diversas cromatografías (diseñadas para la purificación dependiente del tamaño, carga, hidrofobicidad y afinidad) está incluida en las presentes fracciones. Los derivados de sesquiterpeno obtenidos a partir de las fracciones utilizadas en la presente invención pueden incluir cualquier derivado de sesquiterpeno, pero no se limitan a, preferiblemente acetato de cedrilo representado por la siguiente fórmula IV,  $\alpha$ -cedreno representado por la siguiente fórmula V,  $\beta$ -cedreno representado por la siguiente fórmula VI,  $\alpha$ -funebreno representado por la siguiente fórmula VII o  $\beta$ -funebreno representado por la siguiente fórmula VIII, y más preferiblemente acetato de cedrilo,  $\alpha$ -cedreno o  $\beta$ -cedreno.

25

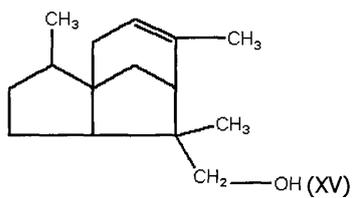
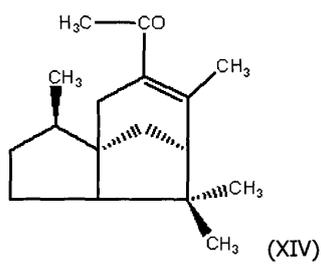
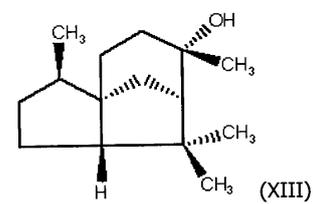
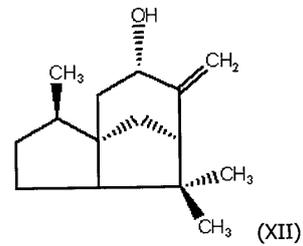
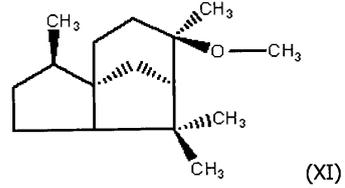
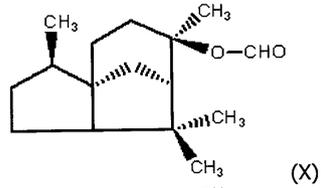
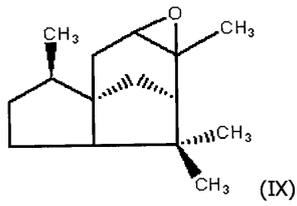
30





Además, los derivados de sesquiterpeno se pueden sintetizar químicamente.

5 Los derivados de sesquiterpeno comprenden cedreno epóxido representado por la siguiente fórmula IX, formiato de cedrilo representado por la siguiente fórmula X, metil-cedriloéter representado por la siguiente fórmula XI, 8(15)-cedren-9-ol representado por la siguiente fórmula XII), epicedrol representado por la siguiente fórmula XIII), metil-cedrilo-cetona representada por la siguiente fórmula XIV) o cedrenol representado por la siguiente fórmula XV. Lo más preferiblemente, los derivados de sesquiterpeno comprenden cedreno epóxido, metil-cedriloéter, metil-cedrilo-cetona o cedrenol.



5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica o una composición alimenticia para prevenir o tratar la hiperlipidemia, hígado graso, diabetes o la obesidad, que comprende un derivado de sesquiterpeno tal como se define arriba en calidad de un ingrediente activo.

- La composición farmacéutica puede contener un soporte farmacéuticamente aceptable. En las composiciones farmacéuticas de esta invención, el soporte farmacéuticamente aceptable puede ser uno convencional para la formulación, incluidos lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, caucho cultivable, fosfato de potasio, arginato, gelatina, silicato de potasio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabes, metilcelulosa, metilhidroxi benzoato, propilhidroxi benzoato, talco, estearato de magnesio y aceites minerales, pero no limitado a ellos. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede incluir, además, un lubricante, un humectante, un edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, un agente de suspensión y un conservante. Detalles de soportes farmacéuticamente aceptables adecuados y formulaciones se pueden encontrar en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19<sup>a</sup> ed., 1995).
- La composición farmacéutica de esta invención se puede administrar por vía oral o parenteral, y preferiblemente por vía oral.
- Una dosis adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar dependiendo de los métodos de formulación farmacéuticos, métodos de administración, de la edad del paciente, peso corporal, sexo, gravedad de la enfermedad, dieta, tiempo de administración, vía de administración, una tasa de excreción y la sensibilidad para una composición farmacéutica utilizada. Los médicos de experiencia ordinaria en la técnica pueden determinar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica para el tratamiento deseado. Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención se administra con una dosis diaria de 0,001-100 mg/kg (peso corporal).
- De acuerdo con las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, la composición farmacéutica se puede formular con un soporte y/o vehículo farmacéuticamente aceptable tal como se describe anteriormente, proporcionando finalmente varias formas, incluyendo una forma de dosis unitaria y una forma de dosis múltiples. Ejemplos no limitantes de formulaciones incluyen, pero no se limitan a una disolución, una suspensión o una emulsión en aceite o medio acuoso, un extracto, un elixir, un polvo, un gránulo, un comprimido y una cápsula, y pueden comprender, además, un agente de dispersión o un estabilizador.
- La composición alimenticia puede contener ingredientes adicionales utilizados en composiciones alimenticias convencionales, así como el extracto de *Cupressus* sp. La composición alimenticia puede comprender aditivos convencionales para la preparación de composiciones de alimentos, p. ej., proteínas, hidratos de carbono, lípidos, sustancias nutritivas y sabores. Ejemplos no limitantes de hidratos de carbono naturales incluyen, pero no se limitan a monosacárido (p. ej., glucosa y fructosa), disacárido (p. ej., maltosa y sacarosa), oligosacárido, polisacárido (p. ej., dextrina y ciclodextrina) y azúcar-álcohol (p. ej., xilitol, sorbitol y eritritol). Ejemplos no limitantes de sabores incluyen, pero no se limitan a sabores naturales (p. ej., taumatina y extracto de *Stevia*) y sabores sintéticos (p. ej., sacarina y aspartamo).
- Por ejemplo, en los casos en los que la composición alimenticia descrita en esta memoria es una bebida, ésta puede comprender, además, ácido cítrico, fructosa licuada, sacarosa, glucosa, ácido acético, ácido málico, zumos de frutas, extractos de *Eucommia ulmoides*, extractos de azufaiya y/o extractos de regaliz, así como el extracto de *Cupressus* sp. como un ingrediente activo.
- Las composiciones de acuerdo con la presente invención conducen a disminuciones en el peso de grasa corporal, peso de grasa visceral y niveles totales de colesterol, niveles de triglicéridos en el plasma y el hígado y niveles de glucosa en sangre y de insulina en sangre en un estado de ayuno, exhibiendo finalmente eficacias de prevención o tratamiento en la hiperlipidemia, hígado graso y obesidad.
- El término utilizado en esta memoria "hiperlipidemia" se refiere a enfermedades inducidas por niveles de grasa en sangre elevados asociados con anomalías en el metabolismo de las grasas para triglicéridos y colesterol. Más específicamente, la hiperlipidemia se refiere a condiciones con niveles elevados de lípidos tales como triglicéridos, colesterol LDL, fosfolípidos y ácidos grasos y, a menudo, se denomina hipercolesterolemia.
- La expresión utilizada en esta memoria "hígado graso" significa estados con una acumulación excesiva de grasas en el hígado que resultan de lesiones del metabolismo de las grasas. Este estado es una causa patológica para diversas enfermedades tales como angina de pecho, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis y pancreatitis.
- El término "diabetes" utilizado en esta memoria se refiere a enfermedades crónicas provocadas por insuficiencia relativa o absoluta de insulina que conduce a la intolerancia de la glucosa. El término "diabetes" se utiliza para intentar abarcar todos los tipos de diabetes, p. ej., diabetes de tipo I, diabetes de tipo II y diabetes hereditaria. La

diabetes de tipo I es la diabetes insulino-dependiente provocada principalmente por la interrupción de células  $\beta$ , la diabetes de tipo II es la diabetes insulino-independiente provocada por la secreción insuficiente de insulina después de la dieta o la resistencia a la insulina.

5 De acuerdo con una realización preferible, la presente composición se utiliza en la prevención o el tratamiento de la diabetes de tipo II, y más preferiblemente de la diabetes de tipo II asociada con resistencia a la insulina.

Un método para preparar los derivados de sesquiterpeno comprende las etapas de: (a) poner en contacto un disolvente de extracción con el género *Cupressus* para obtener un extracto con efectos anti-obesidad; y (b) fraccionar el extracto y seleccionar una fracción con efectos anti-obesidad para aislar el derivado de sesquiterpeno.

El presente método se describirá con más detalle como sigue:

10 (a) Preparación de extractos del género *Cupressus*

El árbol *Cupressus* sp., útil en la presente invención, puede incluir cualquier árbol *Cupressus* sp., preferiblemente, *Cupressus macnabiana*, *Cupressus nootkatensis*, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus macrocarpa*, *Cupressus bakeri* o *Cupressus funebris*, más preferiblemente *Cupressus funebris*, y lo más preferiblemente el xilema de *Cupressus funebris*.

15 El disolvente de extracción puede incluir cualquier disolvente conocido para un experto en la técnica. Preferiblemente, el disolvente de extracción es un disolvente no polar, más preferiblemente uno seleccionado del grupo que consiste en diclorometano, hexano, cloroformo y etiléter, y lo más preferiblemente diclorometano.

De acuerdo con una realización preferible, la filtración y concentración de los extractos se llevan a cabo después de la extracción.

20 Efectos anti-obesidad del extracto se confirman a través de ensayos anti-obesidad utilizando *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

(b) Aislamiento de Derivados de Sesquiterpeno mediante Fraccionamiento de Extractos

25 El fraccionamiento de extractos del árbol *Cupressus* sp. se puede realizar de acuerdo con procesos de fraccionamiento o purificación convencionales. Lo más preferiblemente, el fraccionamiento se lleva a cabo mediante la aplicación del extracto del árbol *Cupressus* sp. a una columna de gel de sílice.

30 De acuerdo con una realización preferida, la etapa (b) se lleva a cabo aplicando el extracto de la etapa (a) a una primera columna de gel de sílice y realizando una elución en condiciones para eluir preferentemente componentes con baja polaridad para obtener una fracción que tenga actividad anti-obesidad. La elución puede incluir cualquier disolvente conocido para un experto en la técnica. Preferiblemente, el disolvente de extracción es el disolvente no polar, más preferiblemente, uno seleccionado del grupo que consiste en diclorometano, hexano, cloroformo y etiléter, y lo más preferiblemente diclorometano y/o hexano normal. Por ejemplo, el fraccionamiento puede llevarse a cabo mediante gradiente de diclorometano (a partir de hexano normal y luego con gradiente de diclorometano).

Las características y ventajas de la presente invención se pueden resumir como sigue:

35 (a) La presente invención proporciona una composición para prevenir o tratar la hiperlipidemia, hígado graso, diabetes o la obesidad, que comprende un derivado de sesquiterpeno representado por las fórmulas (IV), (V), (VI), (IX), (XI), (XIV) y (XV) como un ingrediente activo.

(b) La presente composición puede prepararse a partir del género *Cupressus* o sintetizarse químicamente.

40 (c) Las presentes composiciones que comprenden el derivado de sesquiterpeno como un ingrediente activo conducen a una disminución en el peso de grasa corporal, peso de grasa visceral y los niveles de colesterol total, niveles de triglicéridos en el plasma y el hígado, y los niveles de glucosa en sangre y de insulina en sangre en un estado en ayunas, exhibiendo finalmente eficacias de prevención o tratamiento en la hiperlipidemia, hígado graso, diabetes o la obesidad.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Fig. 1 representa los efectos de derivados de sesquiterpeno aislados del género *Cupressus* en los niveles de grasa corporal de *C. elegans*. Los números en la fotografía representan el contenido en grasa teñido mediante rojo Nilo. Un bajo contenido en grasa se indicó por +1, mientras que a un alto contenido en grasa se le asignó +4.

5 La Fig. 2 representa efectos de los derivados de sesquiterpeno sintetizados químicamente en los niveles de grasa corporal de *C. elegans*. Los números en la fotografía son el contenido en grasa teñido mediante rojo Nilo. Un bajo contenido en grasa se indicó por +1, mientras que a un alto contenido en grasa se le asignó +4.

La presente invención se describirá ahora con más detalle mediante ejemplos.

Derivados de sesquiterpeno distintos de los de las fórmulas (IV), (V), (VI), (IX), (XI), (XIV) y (XV) anteriores se mencionan en esta memoria sólo como referencia y/o comparación.

## 10 EJEMPLOS

### EJEMPLO 1: Fraccionamiento de Extracto de *Cupressus* sp. y Aislamiento de Derivados de Sesquiterpeno

15 El xilema de *Cupressus funebris* perteneciente a *Cupressus* sp. se secó por completo en la sombra, y luego se molió en polvo mediante una trituradora. Cuarenta y cinco L de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) se añadió a 10 kg del polvo para la extracción a 25°C durante 14 días. El proceso de extracción se repitió dos veces. El extracto primario y el extracto secundario se combinaron y filtraron, y el filtrado resultante se concentró en un baño de agua a 50°C en vacío para proporcionar 140 g de un extracto total. Después de la evaluación del efecto anti-obesidad del extracto total en *Caenorhabditis elegans*, el extracto se fraccionó adicionalmente utilizando una columna de gel de sílice preparativa de masa. Los 140 g del extracto total se fraccionaron utilizando la columna que tiene un diámetro de 6,5 cm y una altura de 80 cm y está empaquetada con gel de sílice (malla 230-400, Merck, Alemania). Se aislaron un total de seis compuestos (Compuesto-1, Compuesto 2, Compuesto-3, Compuesto-4, Compuesto-5 y Compuesto-6), utilizando un disolvente de desarrollo (comenzando con hexano normal y luego con gradiente de diclorometano de 0,1% a 1%). Se evaluaron los efectos anti-obesidad de los compuestos.

### EJEMPLO 2: Análisis Estructural de los Compuestos Aislados de *Cupressus Funebris*

25 El análisis de masas,  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN de los 6 compuestos demostró que el Compuesto-1 es acetato de cedrilo, el Compuesto-2 es (-)- $\alpha$ -cedreno, el Compuesto 3-es (+)- $\beta$ -cedreno, el Compuesto 4-es (+)-cedrol, el Compuesto-5 es (+)- $\alpha$ -funebreno y el Compuesto-6 es (+)- $\beta$ -funebreno. Los análisis instrumentales y las estructuras químicas de los compuestos se muestran a continuación.

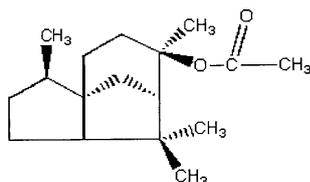
#### Análisis estructural del Compuesto-1

30 Las características físicas del compuesto-1 eran polvo de cristal, un punto de fusión de 44-46°C, una fórmula química de  $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_2$  y un peso molecular de 264 por el análisis de masas.

Se llevó a cabo el análisis de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto-1:  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz en  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,83 (d, J = 7,2, 3H), 0,97 (s, 3H), 1,17 (s, 3H), 1,25-1,29 (1H), 1,30-1,45 (4H), 1,52 (s, 3H), 1,61-1,68 (1H), 1,78-1,82 (1H), 1,85-1,91 (1H), 1,95 (s, 3H), 2,00-2,03 (1H), 2,38-2,42 (1H).

35 Además, se obtuvieron los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN para el compuesto-1:  $^{13}\text{C}$ -RMN (150 MHz en  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 25,8 (C1), 37,0 (C2), 41,0 (C3), 54,0 (C3a), 31,2 (C4), 33,2 (C5), 86,2 (C6), 56,9 (C7), 43,4 (C8), 56,7 (C8a), 41,3 (C9), 15,5 (C10), 25,3 (C11), 170,3 (C12), 22,8 (C13), 26,9 (C14), 28,4 (C15).

Se identificó que el Compuesto-1 tenía la fórmula química de  $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_2$  (acetato de cedrilo) por el análisis instrumental de arriba. La estructura química del compuesto-1 está representada por la siguiente fórmula.



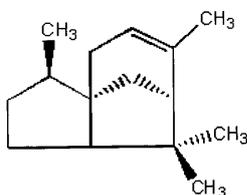
**Análisis estructural del Compuesto-2**

Las características físicas del compuesto-2 eran estado líquido, una fórmula química de  $C_{15}H_{24}$  y un peso molecular de 204 por el análisis de masas.

- 5 Se llevó a cabo el análisis de  $^1H$ -RMN del compuesto-2:  $^1H$ -RMN (400 MHz en  $CDCl_3$ )  $\delta$  0,84 (d, J = 7,2, 3H), 0,95 (s, 3H), 1,02 (s, 3H), 1,33-1,42 (3H), 1,55-1,62 (1H), 1,63-1,64 (1H), 1,66-1,67 (3H), 1,69-1,71 (1H), 1,73-1,76 (1H), 1,78-1,87 (2H), 2,14-2,19 (1H), 5,22 (1H).

Además, se obtuvieron los espectros de  $^{13}C$ -RMN para el compuesto-2:  $^{13}C$ -RMN (100 MHz en  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 24,8 (C1), 36,1 (C2), 41,5 (C3), 53,9 (C3a), 38,1 (C4), 119,2 (C5), 140,3 (C6), 54,9 (C7), 48,1 (C8), 59,0 (C8a), 40,7 (C9), 15,4 (C10), 24,7 (C11), 25,6 (C12), 27,7 (C13).

- 10 Se identificó que el Compuesto-2 tenía la fórmula química de  $C_{15}H_{24}$  ((-)- $\alpha$ -Cedreno) por el análisis instrumental de arriba. La estructura química del compuesto-2 está representada por la siguiente fórmula.

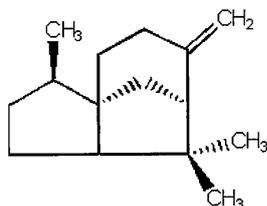
**Análisis estructural del Compuesto-3**

- 15 Las características físicas del compuesto-3 eran estado líquido, una fórmula química de  $C_{15}H_{24}$  y un peso molecular de 204 por el análisis de masas.

Se llevó a cabo el análisis de  $^1H$ -RMN del compuesto-3:  $^1H$ -RMN (400 MHz en  $CDCl_3$ )  $\delta$  0,84 (d, J = 7,2, 3H), 0,94 (s, 3H), 0,97 (s, 3H), 1,18-1,21 (1H), 1,28-1,34 (1H), 1,36-1,45 (1H), 1,47-1,49 (1H), 1,51-1,58 (2H), 1,66-1,72 (1H), 1,75-1,83 (2H), 1,85-1,90 (1H), 2,19 (1H), 2,31-2,34 (2H), 4,58 (1H), 4,59 (1H).

- 20 Además, se obtuvieron los espectros de  $^{13}C$ -RMN para el compuesto-3:  $^{13}C$ -RMN (150 MHz en  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 25,7 (C1), 37,0 (C2), 42,1 (C3), 54,4 (C3a), 33,7 (C4), 29,7 (C5), 151,9 (C6), 60,7 (C7), 42,3 (C8), 56,4 (C8a), 45,1 (C9), 15,4 (C10), 107,6 (C11), 25,9 (C12), 26,6 (C13).

Se identificó que el Compuesto-3 tenía la fórmula química de  $C_{15}H_{24}$  ((+)- $\beta$ -cedreno) por el análisis instrumental de arriba. La estructura química del compuesto-3 está representada por la siguiente fórmula.

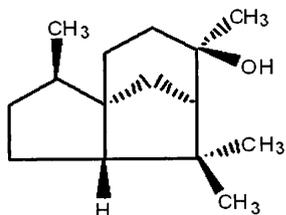
**Análisis estructural del Compuesto-4**

Las características físicas del compuesto-4 eran polvo de cristal, un punto de fusión de 55-59°C, una fórmula química de  $C_{15}H_{26}O$  y un peso molecular de 222 por el análisis de masas.

Se llevó a cabo el análisis de  $^1H$ -RMN del compuesto-4:  $^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  0,85 (3H), 1,00 (3H), 1,26 (3H), 1,27-1,29 (1H), 1,32 (3H), 1,35-1,43 (4H), 1,51-1,58 (3H), 1,61-1,71 (3H), 1,78-1,89 (3H).

Además, se obtuvieron los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN para el compuesto-4:  $^{13}\text{C}$ -RMN (150 MHz en  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 25,4 (C1), 37,0 (C2), 41,5 (C3), 54,1 (C3a), 31,6 (C4), 35,4 (C5), 75,1 (C6), 61,1 (C7), 43,4 (C8), 56,5 (C8a), 42,0 (C9), 15,6 (C10), 30,2 (C11), 27,7 (C12), 28,9 (C13).

5 Se identificó que el Compuesto-4 tenía la fórmula química de  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$  ((+)-Cedrol) por el análisis instrumental de arriba. La estructura química del compuesto-4 se representa por la siguiente fórmula.



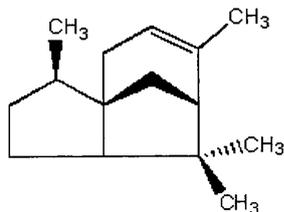
#### **Análisis estructural del Compuesto-5**

Las características físicas del compuesto-5 eran estado líquido, una fórmula química de  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$  y un peso molecular de 204 por el análisis de masas.

10 Se llevó a cabo el análisis de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto-5:  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,81-0,95 (6H), 1,06 (s, 3H), 1,25-1,31 (1H), 1,32-1,46 (3H), 1,54-1,61 (2H), 1,61-1,64 (3H), 1,74-1,82 (1H), 1,92-1,99 (1H), 2,07-2,10 (1H), 2,15-2,32 (2H), 5,11 (1H).

15 Además, se obtuvieron los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN para el compuesto-5:  $^{13}\text{C}$ -RMN (150 MHz en  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 21,8 (C1), 34,1 (C2), 37,2 (C3), 55,5 (C3a), 36,4 (C4), 119,0 (C5), 141,8 (C6), 58,1 (C7), 37,3 (C8), 61,2 (C8a), 36,6 (C9), 18,1 (C10), 18,4 (C11), 24,3 (C12), 24,3 (C13).

Se identificó que el Compuesto-5 tenía la fórmula química de  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$  ((+)- $\alpha$ -Funebreno) por el análisis instrumental de arriba. La estructura química del compuesto-5 se representa por la siguiente fórmula.



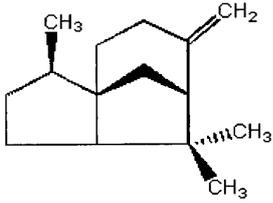
#### **Análisis estructural del Compuesto-6**

20 Las características físicas del compuesto-6 eran estado líquido, una fórmula química de  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$  y un peso molecular de 204 por el análisis de masas.

Se llevó a cabo el análisis de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto-6:  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,82-0,90 (6H), 1,06 (s, 3H), 1,18-1,24 (1H), 1,24-1,35 (2H), 1,35-1,41 (1H), 1,41-1,50 (1H), 1,12 (1H), 1,62-1,68 (1H), 1,71-1,80 (1H), 1,91-1,95 (1H), 2,22-2,38 (2H), 2,55-2,58 (1H), 4,57 (1H), 4,58 (1H).

25 Además, se obtuvieron los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN para el compuesto-6:  $^{13}\text{C}$ -RMN (150 MHz en  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 19,4 (C1), 34,1 (C2), 35,1 (C3), 55,6 (C3a), 32,5 (C4), 27,6 (C5), 152,5 (C6), 62,9 (C7), 37,3 (C8), 59,7 (C8a), 36,6 (C9), 18,3 (C10), 106,6 (C11), 21,6 (C12), 21,6 (C13).

Se identificó que el Compuesto-6 tenía la fórmula química de  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$  ((+)- $\beta$ -Funebreno) por el análisis instrumental de arriba. La estructura química del compuesto-6 se representa por la siguiente fórmula.

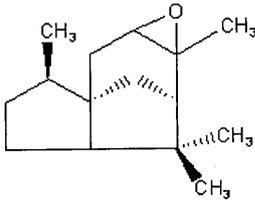


**EJEMPLO 3: Estructuras de los Compuestos Químicos Sintéticos Similares a Compuestos de Sesquiterpeno Aislados de *Cupressus Funebri***

5 Se evaluaron los efectos anti-obesidad de los sesquiterpenos sintéticos similares a 6 compuestos aislados de *Cupressus Funebris*. Las estructuras químicas de los compuestos de sesquiterpenos sintéticos evaluados figuran a continuación. Los compuestos de sesquiterpeno sintéticos se adquirieron de las compañías, que se enumeran a continuación.

**Análisis estructural del Compuesto-7**

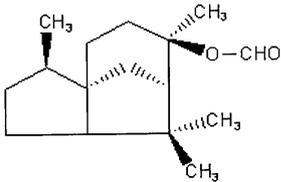
Cedreno epóxido (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>), Zhejiang HuangYan Spice Co., Ltd. (China)



10

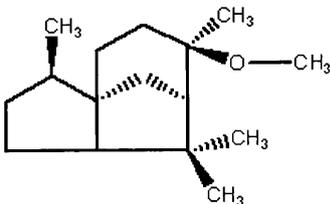
**Análisis estructural del Compuesto-8**

Formiato de cedrilo (C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>), Sigma (EE.UU.)



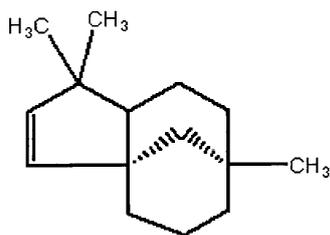
**Análisis estructural del Compuesto-9**

15 Metil-cedrilo-éter (C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>O), Zhejiang HuangYan Spice Co., Ltd. (China)



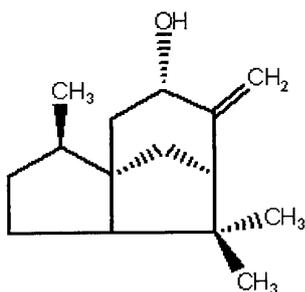
**Análisis estructural del Compuesto-10**

(-)-Cloveno (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>), Sigma (EE.UU.)



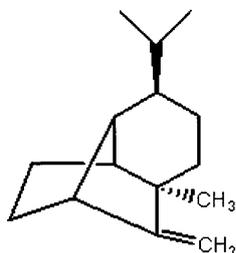
**Análisis estructural del Compuesto-11**

(+)-8(15)-Cedren-9-ol (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O), Sigma (EE.UU.)



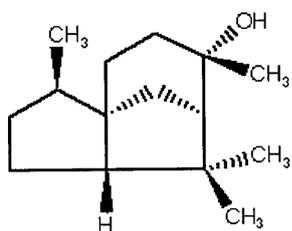
5 **Análisis estructural del Compuesto-12**

(+)-sativene (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>), Sigma (EE.UU.)



**Análisis estructural del Compuesto-13**

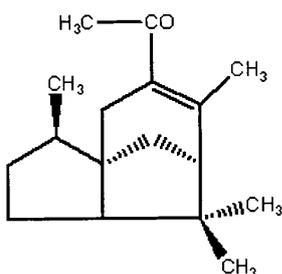
(-)-epicedrol (C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O), Sigma (EE.UU.)



10

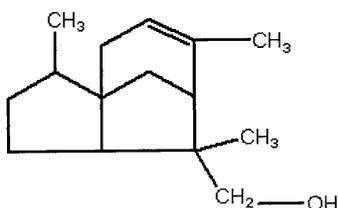
**Análisis estructural del Compuesto-14**

Metil-cedril-cetona, Zhejiang HuangYan Spice Co., Ltd. (China)



### Análisis estructural del Compuesto-15

Cedrenol (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O), Jiangxi Zhangshu Crown Capital Fragrance Limited (China)



#### 5 EJEMPLO 4: Evaluación de Efectos Anti-Obesidad de 15 Compuestos de sesquiterpeno en *C. elegans*

Utilizando un microscopio de disección (aumentos x50), *C. elegans* en la 4<sup>a</sup> etapa (L4, la etapa imaginal) se transfirió a 3 ml de un medio S suplementado con colesterol (que contiene NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, colesterol, citrato, metales traza, CaCl<sub>2</sub> y MgSO<sub>4</sub>) y se añadieron a ello 100 µl de *E coli* OP50 (DO<sub>600</sub> = 0,2) cultivados en líquido durante la noche antes de 1 día del experimento. La muestra de la fracción de *Pterocarpus indicus* se añadió a los medios líquidos que contenían *C. elegans*, seguido de cultivo rotatorio en un cuarto oscuro a 16°C y 100 rpm. La muestra insoluble en agua se disolvió en DMSO y se añadió a los medios de cultivo. La concentración final de DMSO se ajustó por debajo de 1%. DMSO al 1% no mostró efectos sobre la adipogénesis y el crecimiento de *C. elegans*. 24 horas después de haber añadido la muestra a *C. elegans*, se añadieron 30 µl de un colorante rojo Nilo a una concentración de 10 µg/ml (la concentración final de rojo Nilo se ajustó a 100 ng/ml) a los medios, seguido por un cultivo rotatorio continuo durante 2 días.

Con el fin de detener el movimiento de locomoción de *C. elegans*, 20 µl de NaN<sub>3</sub> al 0,3% se añadieron gota a gota a un portaobjetos de vidrio al que se añadieron 100 µl de *C. elegans* cultivado en presencia de rojo Nilo durante 2 días. Bajo un microscopio de fluorescencia, se micrografiaron en un cuarto oscuro adipocitos de *C. elegans* que emiten fluorescencia roja y se compararon con el grupo de control para determinar con ello la cantidad de grasa. Un bajo contenido en grasa se indicó por +1, mientras que a un alto contenido en grasa se le asignó +4. En este Ejemplo se utilizaron *C. elegans* adultos (etapa L4) inmediatamente antes de la puesta de huevos. Por lo tanto, los huevos fueron incubados después del tratamiento de la muestra y la mayor parte de los *C. elegans* adultos fueron sacrificados a los 3 días post-tratamiento. Un contenido de grasa se examinó en *C. elegans* que había sido incubado y desarrollado recientemente.

El efecto anti-obesidad del extracto total de *Cupressus funebris* fue examinado en *C. elegans*. El extracto total a diversas concentraciones (0, 1, 10 y 100 µg/ml) se añadió a los medios líquidos que contenían *C. elegans*. Tal como se representa en los resultados experimentales, Tabla 1, el extracto total exhibió efectos anti-obesidad significativos a una concentración de 10 µ/ml o superior.

**TABLA 1.** Efecto anti-obesidad del extracto total de *Cupressus funebris* contra *C. elegans*.

Elemento	Contenido en grasa			
	0	1	10	100
Concentración de la muestra (µg/ml)				
Efecto anti-obesidad del extracto total	+4	+4	+3	+2

(Un bajo contenido de grasa se indicó por +1, mientras que a un alto contenido en grasa se le asignó +4 en la Tabla)

5 Cada uno de los seis compuestos [(-)- $\alpha$ -cedreno, (+)- $\beta$ -cedreno, (+)-cedrol, (+)- $\alpha$ -funebreno y (+)- $\beta$ -funebreno] extraídos del xilema de *Cupressus funebris*, y de los nueve compuestos [cedreno epóxido, formiato de cedrilo, metil-cedril-éter, (-)-cloveno, (+)-8(15)-cedren-9-ol, (+)-sativeno, (-)-epicedrol, metil-cedril-cetona o cedrenol] que tiene una estructura similar se pusieron en contacto con *C. elegans* en diversas concentraciones (0, 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ ), y su efecto inhibitor sobre la adipogénesis se observó en la oscuridad bajo un microscopio de fluorescencia. Tal como se muestra tanto en la Tabla 2 como en la Fig. 1, el total de seis derivados de sesquiterpeno extraídos de las plantas tenían un efecto significativamente inhibitor sobre la adipogénesis en concentraciones de 1, 10 ó 100  $\mu\text{g/ml}$ . Entre ellos, (-)- $\alpha$ -cedreno, (+)- $\beta$ -cedreno, (+)- $\alpha$ -funebreno y (+)- $\beta$ -funebreno tenían un efecto notablemente inhibitorio sobre la adipogénesis, incluso en una baja concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ .

**TABLA 2.** Efecto anti-obesidad de un componente de *Cupressus funebris* en *C. elegans*.

Elemento Concentración de la muestra ( $\mu\text{g/ml}$ )	Contenido en grasa			
	0	1	10	100
Acetato de cedrilo	+4	+4	+3	+2
(-)- $\alpha$ -cedreno	+4	+2	+2	+2
(+)- $\beta$ -cedreno	+4	+2	+3	+2
(+)-cedrol*	+4	+4	+4	+3
(+)- $\alpha$ -funebreno*	+4	+3	+2	+2
(+)- $\beta$ -funebreno*	+4	+1	+1	+2

(Un bajo contenido de grasa se indicó por +1, mientras que a un alto contenido en grasa se le asignó +4 en la Tabla;  
\* sólo para comparación y/o referencia)

15 Además, se examina el efecto anti-obesidad de los compuestos de sesquiterpeno sintéticos a *C. elegans*. Tal como se muestra en la Tabla 3 y en la Fig. 2, todos los compuestos tenían un efecto significativamente inhibitor sobre la adipogénesis en una concentración de 1, 10 ó 100  $\mu\text{g/ml}$ . De ellos, formiato de cedrilo, metil-cedril-éter, (-)-cloveno, (+)-8(15)-cedren-9-ol, (+)-sativeno, (-)-epicedrol, metil-cedril-cetona y cedrenol tenían un particular efecto inhibitor sobre la adipogénesis incluso en una baja concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ .

20 Por lo tanto, se pudo demostrar que el total de 15 derivados de sesquiterpeno pueden contribuir a la disminución en el peso de grasa corporal y pueden ser utilizados como un agente anti-obesidad.

**TABLA 3.** Efecto anti-obesidad de derivados sintéticos en *C. elegans*.

Elemento Concentración de la muestra ( $\mu\text{g/ml}$ )	Contenido en grasa			
	0	1	10	100
cedreno epóxido	+4	+4	+3	+2
formiato de cedrilo	+4	+3	+1	+1
metil-cedril-éter	+4	+1	+2	+2
(-)-cloveno*	+4	+2	+2	+2
(+)-8(15)-cedren-9-ol*	+4	+2	+2	+2
(+)-sativeno*	+4	+2	+2	+1
(-)-epicedrol*	+4	+1	+1	+3
metil-cedril-cetona	+4	+3	+2	+1
cedrenol	+4	+2	+1	+1

25 (Un bajo contenido de grasa se indicó por +1, mientras que a un alto contenido en grasa se le asignó +4 en la Tabla;  
\* sólo para comparación y/o referencia)

30 Todos los derivados de sesquiterpeno utilizados en la presente invención, independientemente de cualquier forma extraída en la naturaleza u obtenidos a través de síntesis son solubles en grasa porque se disolvieron fácilmente en el disolvente orgánico que tiene una menor polaridad que el etanol, pero no agua. Por lo tanto, tiene una ventaja con respecto a la ingesta factible en el intestino delgado para tomar estos compuestos de una manera oral. Además, cada uno de los componentes en polvo y componentes líquidos se pueden preparar como un producto final de comprimido y cápsula blanda, lo que les permite que se tomen de una manera factible. Los compuestos que tienen un punto de ebullición por debajo de 100°C son cedreno epóxido (punto de ebullición: 94-95°C) y los compuestos

que tienen un punto de ebullición por debajo de 200°C son (+)-8(15)-cedren-9-ol (punto de ebullición: 166-168°C) y cedrenol (punto de ebullición: 166-169°C). Además, todos los demás compuestos tienen un punto de ebullición por encima de 200°C y, por lo tanto, son muy estables a temperatura ambiente. Las características físicas de cada uno de los compuestos se describen como la Tabla 4.

5 **TABLA 4.** Las características físicas de los compuestos.

compuesto	Origen	Propiedad	Solubilidad	Punto de ebullición (°C)
Acetato de cedrilo	Compuesto natural	Polvo cristalizado	Soluble en grasas	200-203
(-)- $\alpha$ -cedreno	Compuesto natural	Líquido viscoso	Soluble en grasas	261-262
(+)- $\beta$ -cedreno	Compuesto natural	Líquido viscoso	Soluble en grasas	263-264
(+)-cedrol*	Compuesto natural	Líquido viscoso	Soluble en grasas	252-253
(+)- $\alpha$ -funebreno*	Compuesto natural	Líquido viscoso	Soluble en grasas	253-254
(+)- $\beta$ -funebreno*	Compuesto natural	Polvo cristalizado	Soluble en grasas	273-274
cedreno epóxido	Compuesto sintético	Líquido viscoso	Soluble en grasas	94-95
formiato de cedrilo*	Compuesto sintético	Líquido viscoso	Soluble en grasas	308-309
metil-cedril-éter	Compuesto sintético	Líquido viscoso	Soluble en grasas	268-269
(-)-cloveno*	Compuesto sintético	Líquido viscoso	Soluble en grasas	261-263
(+)-8(15)-cedren-9-ol*	Compuesto sintético	Polvo cristalizado	Soluble en grasas	166-168
(+)-sativeno*	Compuesto sintético	Líquido viscoso	Soluble en grasas	255-257
(-)-epicedrol*	Compuesto sintético	Polvo cristalizado	Soluble en grasas	277-278
metil-cedril-cetona	Compuesto sintético	Líquido viscoso	Soluble en grasas	272-273
cedrenol	Compuesto sintético	Polvo cristalizado	Soluble en grasas	166-169

\* sólo para comparación y/o referencia

#### EJEMPLO 5: Efectos Reducidos de 8 Compuestos de Sesquiterpeno en el Peso Corporal y la Grasa Visceral

##### *Preparación de la Dieta y Crianza Animal Experimental*

10 La dieta inducible por obesidad utilizada en el presente experimento era una dieta alta en grasas (HFD: 40% de calorías de grasa, 17 g de manteca de cerdo + 3% de aceite de maíz/100 g de dieta) desarrollada por los autores de la presente invención y la composición de la dieta que contiene compuestos de sesquiterpeno era igual a la de HFD, pero cada uno de los 8 compuestos de sesquiterpeno con una concentración de 0,2% se incluyó en la dieta [dieta con contenido en acetato de cedrilo, dieta con contenido en (-)- $\alpha$ -cedreno, dieta con contenido en (+)- $\beta$ -cedreno, dieta con contenido en cedreno epóxido, dieta con contenido en metil-cedril-éter, dieta con contenido en metil-cedril-cetona, dieta con contenido en cedrenol y dieta con contenido en (+)-cedrol]. La composición de la dieta se describe en la siguiente Tabla 5.

15

**TABLA 5.** La composición de la dieta.

Componente	Control (HFD) (g/kg de dieta)	Grupo de ensayo (g/kg de dieta)
Caseína	200	200
DL-metionina	3	3
Almidón de maíz	111	109
Sacarosa	370	370
Celulosa	50	50
Aceite de maíz	30	30
Manteca de cerdo	170	170
Mezcla de vitaminas	12	12
Mezcla de minerales	42	42
Bitartrato de colina	2	2
Colesterol	10	10
terc.-butilhidroquinona	0,04	0,04
Compuesto de sesquiterpeno	-	2
Total (g)	1.000	1.000
Grasa (% de calorías)	39,0	39,0
Calor total, kJ/kg de dieta	19.315	19.315

Ratones C57BL/6J machos de 6 semanas de edad fueron adaptados al entorno de laboratorio durante una semana y se dividieron en el control HFD y 8 grupos de ensayo de acuerdo con un diseño de bloques aleatorizado. Y luego fueron criados durante 6 semanas. La dieta fue suministrada con agua a 10-11 en punto cada mañana, y la cantidad de ingesta de la dieta y el peso corporal se midieron cada día y una vez cada tres días, respectivamente. El peso corporal se midió a las 2 h después de retirar la bandeja de alimentación para bloquear el cambio repentino de peso corporal de acuerdo con la ingesta de alimentos, y la eficiencia alimenticia se calculó dividiendo el aumento de peso corporal por la cantidad de ingesta total de la dieta durante el periodo experimental total, que es desde el día inicial de suministro de dieta experimental al día del sacrificio. Después de que los animales experimentales se mantuvieran en ayunas durante más de 12 horas, los mismos fueron anestesiados con dietiléter y se recogieron su sangre, el hígado y los tejidos de grasa visceral (grasa del epidídimo, grasa perirrenal, grasa mesentérica y grasa abdominal). Y luego se lavaron con solución salina tamponada con fosfato 0,1 M (pH 7,4), y se midieron sus pesos. La sangre tomada de la aorta abdominal se centrifugó a 1.000 xg durante 15 min para separar el plasma.

#### Cambio del peso corporal y de la grasa visceral

El aumento del peso corporal después de ingerir la dieta durante 8 semanas se redujo significativamente en un intervalo de 25-60% en el grupo de ensayo alimentado con 8 compuestos de sesquiterpenos en comparación con HFD. De ellos, el peso corporal del grupo de ensayo alimentado con metil-cedril-cetona se redujo lo más notablemente, y el aumento de peso corporal para 8-semanas se redujo en aproximadamente 80% en comparación con el control. Por otro lado, el aumento de peso corporal alimentado con otros compuestos de sesquiterpeno en comparación con el control se redujo en el siguiente orden: (-)- $\alpha$ -cedreno, (+)- $\beta$ -cedreno, acetato de cedrilo, metil-cedril-éter, cedrenol, (+)-cedrol y cedreno epóxido ( $P < 0,05$ ). El peso de la grasa visceral total, añadiendo la grasa del epidídimo, la grasa perirrenal, la grasa mesentérica y la grasa abdominal, se midió después de la alimentación con la dieta durante 8 semanas. Como resultado, el peso total de grasa visceral de todos los grupos de ensayo alimentados con 8 compuestos de sesquiterpeno se redujo significativamente en un 25-55% en comparación con el control ( $P < 0,05$ ). De ellos, el peso de la grasa visceral en el grupo de ensayo alimentado con metil-cedril-cetona fue el más notablemente reducido, y a continuación, se midió el efecto de reducción de peso de la grasa visceral en el orden de (-)- $\alpha$ -cedreno, (+)- $\beta$ -cedreno, acetato de cedrilo, metil-cedril-éter, cedrenol y cedreno epóxido ( $P < 0,05$ ). El peso de la grasa visceral en el grupo de ensayo alimentado con (+)-cedrol era mayor que en el control. Por lo tanto, se podría apreciar que los 8 compuestos de sesquiterpeno en un nivel de 2% (peso/peso, cantidad de dieta aditiva) tienen un excelente efecto sobre la reducción del peso corporal, y 7 compuestos de sesquiterpeno, excepto (+)-cedrol tienen un efecto notable en la reducción del peso de la grasa visceral (Tabla 6).

**TABLA 6.** Aumento de peso corporal y peso de la grasa visceral total en ratones alimentados con la composición de la presente invención

Grupo	Aumento de peso corporal (g/8 semanas)	Peso total de grasa visceral (mg/g de peso corporal)
Control	16,6 ± 1,1	87,6 ± 5,50
Acetato de cedrilo	8,54 ± 0,84*	46,4 ± 3,12*
Metil-cedril-éter	9,31 ± 0,91*	50,8 ± 6,12*
(-)- $\alpha$ -cedreno	6,73 ± 1,02*	40,0 ± 4,31*
(+)- $\beta$ -cedreno	7,13 ± 0,89*	48,0 ± 8,27*
Cedreno epóxido	12,4 ± 1,36*	65,6 ± 4,43*
Metil-cedril-cetona	6,51 ± 1,40*	39,4 ± 7,44*
Cedrenol	9,51 ± 1,47*	57,8 ± 4,02*
(+)-cedrol#	10,9 ± 0,85*	92,4 ± 5,31

\* Significativamente diferente del valor para el grupo HFD por el ensayo t de Student  $P < 0,05$ .

# sólo para comparación y/o referencia

#### 35 Ejemplo 6: Eficacia sobre la Prevención y el Tratamiento de 8 Compuestos de Sesquiterpeno para la Hiperlipidemia Asociada con la Obesidad, Hígado Graso y Diabetes de Tipo II

La concentración de colesterol, triglicéridos y glucosa total en plasma se midió dos veces de acuerdo con el kit de medición comercialmente disponible (sistema Bio Clinical), respectivamente. La concentración de insulina se midió mediante ELISA utilizando el kit de insulina de ratón (Shibayaki, Japón). El componente lipídico de tejido del hígado se extrajo de acuerdo con el método de Folch *et al.* Se mezclaron 0,25 g de tejido del hígado con 1 ml de agua destilada, y se homogeneizaron con un homogeneizador Polytron (IKA-Werke GmbH & Co., Ultra-Turrax, Staufen,

- Alemania). El homogeneizado se mezcló con 5 ml de disolución de cloroformo:metanol (2:1, v/v), y se centrifugó a 1.000 xg durante 10 min para separar la fase inferior. Una vez más el sobrenadante se mezcló con 2 ml de disolución de cloroformo:metanol (2:1, v/v), y el mismo proceso se repitió para aislar por completo componente lipídico de tejido del hígado. Tres ml de disolución de cloroformo:metanol:CaCl<sub>2</sub> al 0,05% (3:48:47, v/v/v) se añadieron a la fase inferior resultante, y se mezclaron a fondo durante 1 min. La mezcla se centrifugó a 1.000 xg durante 10 min. La fase inferior final se secó completamente en gas nitrógeno, y el lípido secado se disolvió en 1 ml de metanol para utilizar el análisis de componente lipídico. La concentración de triglicéridos en los extractos de lípidos de los tejidos del hígado se midió de acuerdo con el kit de medición comercialmente disponible (sistema Bio Clinical) igual al utilizado en el análisis de plasma.
- En la concentración de lípidos en plasma de ratones alimentados con la dieta descrita en la Tabla 5 durante 8 semanas, la concentración total de colesterol se redujo significativamente al 46% en el grupo de ensayo alimentado con metil-cedril-éter en comparación con HFD tal como se muestra en la Tabla 7, y además de metil-cedril-éter, la reducción de la concentración de colesterol total en el orden de (-)- $\alpha$ -cedreno, cedrenol, acetato de cedrilo, (+)- $\beta$ -cedreno, metil-cedril-cetona, cedreno epóxido y (+)-cedrol en comparación con el control se midió significativamente en un intervalo de 29-43%.
- Concentración de triglicéridos en plasma se redujo significativamente al 50% en el grupo de ensayo alimentado con (-)- $\alpha$ -cedreno en comparación con HFD y al 30% en el grupo de ensayo alimentado con acetato de cedrilo y metil-cedril-cetona. Además, la concentración de triglicéridos en plasma en el grupo de ensayo alimentado con (+)-cedrol, (+)- $\beta$ -cedreno y cedreno epóxido en comparación con HFD se redujo significativamente en un intervalo de 18-25%. Por lo tanto, se podría apreciar que los 8 compuestos de sesquiterpeno arriba descritos alivian de manera notoria la hiperlipidemia mostrada en la obesidad inducible por HFD.
- Además, la concentración de triglicéridos del tejido del hígado se redujo de manera significativa al 64% y 63% en el grupo de ensayo alimentado con (-)- $\alpha$ -cedreno y (+)- $\beta$ -cedreno, respectivamente, y todos los grupos de ensayo alimentados con metil-cedril-cetona, acetato de cedrilo, metil-cedril-éter, cedrenol y cedreno epóxido se redujeron significativamente a un intervalo de 37-56% en comparación con HFD. Por lo tanto, se pudo demostrar que 7 compuestos de sesquiterpeno, excepto (+)-cedrol, tienen un efecto plausible de mejora de hígado graso mostrado en la obesidad inducible por HFD.
- Es bien conocido que la diabetes de tipo II en la que la glucosa en ayunas se potencia simultáneamente dependiendo de un aumento en la concentración de insulina en sangre iba acompañada en el modelo de obesidad animal en la dieta o la obesidad humana. Recientemente surgió el término 'metainflamación' con respecto a la respuesta a la inflamación generada por un exceso de suministro de nutrientes o metabolitos, la obesidad era considerada como "inflamación crónica y de bajo nivel", se han hecho intensamente investigaciones sobre la relación entre la obesidad y el sistema inmunológico. En otras palabras, recientemente se ha percibido que diversas complicaciones diabéticas (p. ej., diabetes de tipo II, resistencia a la insulina, arteriosclerosis, cáncer y asma) fueron generadas a través de interacciones con el sistema inmune durante el desarrollo de la obesidad. Por ejemplo, se podría sugerir que TLR4 (receptor de tipo Toll 4) asociado con la respuesta inmune innata desempeña un papel importante en la respuesta de la inflamación y la vía de resistencia a la insulina utilizando ácido graso dietético (en particular, ácido graso saturado) como un ligando, y también está relacionado con la regulación de la ingesta de alimentos en el sistema nervioso central.
- De acuerdo con los resultados de este experimento el suministro de acetato de cedrilo a ratones alimentados con HFD durante 8 semanas, la glucosa en ayunas y la concentración de insulina en sangre en el grupo de ensayo en comparación con HFD se redujeron de manera significativa al 54% y 49%, respectivamente. Además, el índice de resistencia a la insulina (IRI) en el grupo de ensayo se redujo de manera notoria al 73% en comparación con HFD. Toda la glucosa en ayunas (a un nivel de 29-46%), la concentración de insulina en sangre (a un nivel de 26-40%) y el índice de resistencia a la insulina (a un nivel de 42-63%) en los grupos de ensayo alimentados con metil-cedril-éter, (-)- $\alpha$ -cedreno, (+)- $\beta$ -cedreno, metil-cedreno-cetona, cedrenol y cedreno epóxido se redujeron de manera notoria en comparación con los de control. En el grupo de ensayo alimentado con (+)-cedrol, toda la glucosa en ayunas, la concentración de insulina en sangre y el índice de resistencia a la insulina eran propensos a ser disminuidos en comparación con el control, pero no se mostró la significación estadística. Por lo tanto, es de esperar que estos compuestos de sesquiterpeno tengan un efecto sobre la mejora no sólo de la diabetes de tipo II o resistencia a la insulina, sino también sobre las respuestas metabólicas de inflamación estrechamente asociadas con las mismas.

**TABLA 7.** Índice bioquímico asociados con la obesidad de la sangre y el tejido hepático de ratones alimentados con los compuestos de sesquiterpeno.

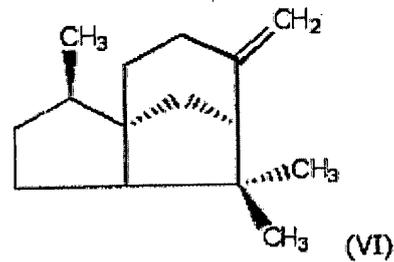
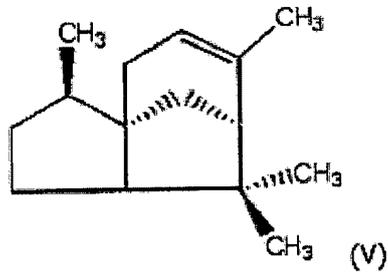
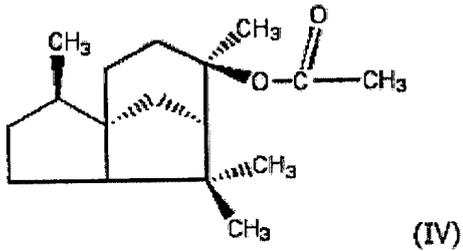
Grupo	Plasma					Hígado
	Colesterol total (mmol/L)	Triglicéridos (mmol/L)	Glucosa (mmol/L)	Insulina (ng/mL)	IRI <sup>a</sup>	Triglicéridos (μmol/g)
Control	3,71 ± 0,11	1,61 ± 0,01	10,3 ± 0,50	0,96 ± 0,10	1,63 ± 0,21	44,3 ± 2,33
Acetato de cedrilo	2,53 ± 0,10*	1,12 ± 0,06*	4,67 ± 0,40*	0,49 ± 0,07*	0,44 ± 0,06*	23,8 ± 2,33*
Metil-cedril-éter	2,01 ± 0,24*	1,29 ± 0,13*	5,61 ± 0,53*	0,67 ± 0,07*	0,61 ± 0,08*	24,4 ± 1,37*
(-)-α-cedreno	2,11 ± 0,16*	0,81 ± 0,15*	6,41 ± 0,57*	0,67 ± 0,04*	0,75 ± 0,13*	16,1 ± 0,60*
(+)-β-cedreno	2,57 ± 0,19*	1,32 ± 0,11*	6,80 ± 0,41*	0,70 ± 0,08*	0,78 ± 0,11*	16,6 ± 1,28*
Cedreno epóxido	2,81 ± 0,18*	1,32 ± 0,08*	7,34 ± 0,68*	0,71 ± 0,04*	0,94 ± 0,14*	27,8 ± 2,41*
Metil-cedril-cetona	2,60 ± 0,31*	1,12 ± 0,11*	6,88 ± 0,71*	0,65 ± 0,06*	0,78 ± 0,10*	19,5 ± 1,30*
Cedrenol	2,42 ± 0,22*	1,20 ± 0,10*	7,24 ± 0,56*	0,58 ± 0,07*	0,71 ± 0,09*	25,0 ± 1,81*
(+)-cedrol <sup>#</sup>	2,98 ± 0,20*	1,31 ± 0,10*	9,8 ± 0,99	0,86 ± 0,07	1,45 ± 0,22	49,1 ± 4,10

\* Significativamente diferente del valor para el grupo HFD por el ensayo t de Student  $P < 0,05$ . <sup>a</sup> IRI (índice de resistencia a la insulina) =  $10^{-3}$  pmol de insulina x mmol de glucosa x L<sup>-2</sup>

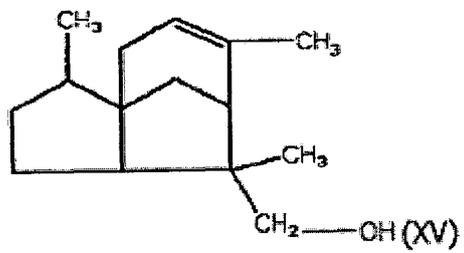
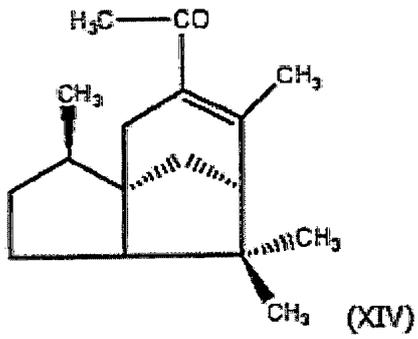
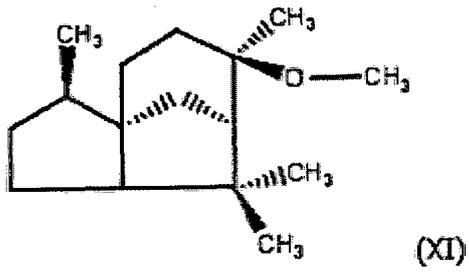
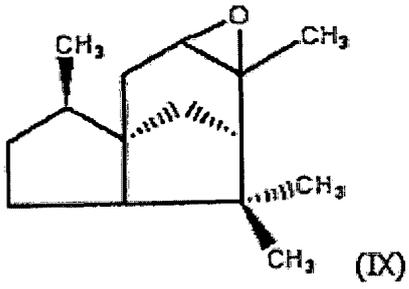
5 # sólo para comparación y/o referencia

## REIVINDICACIONES

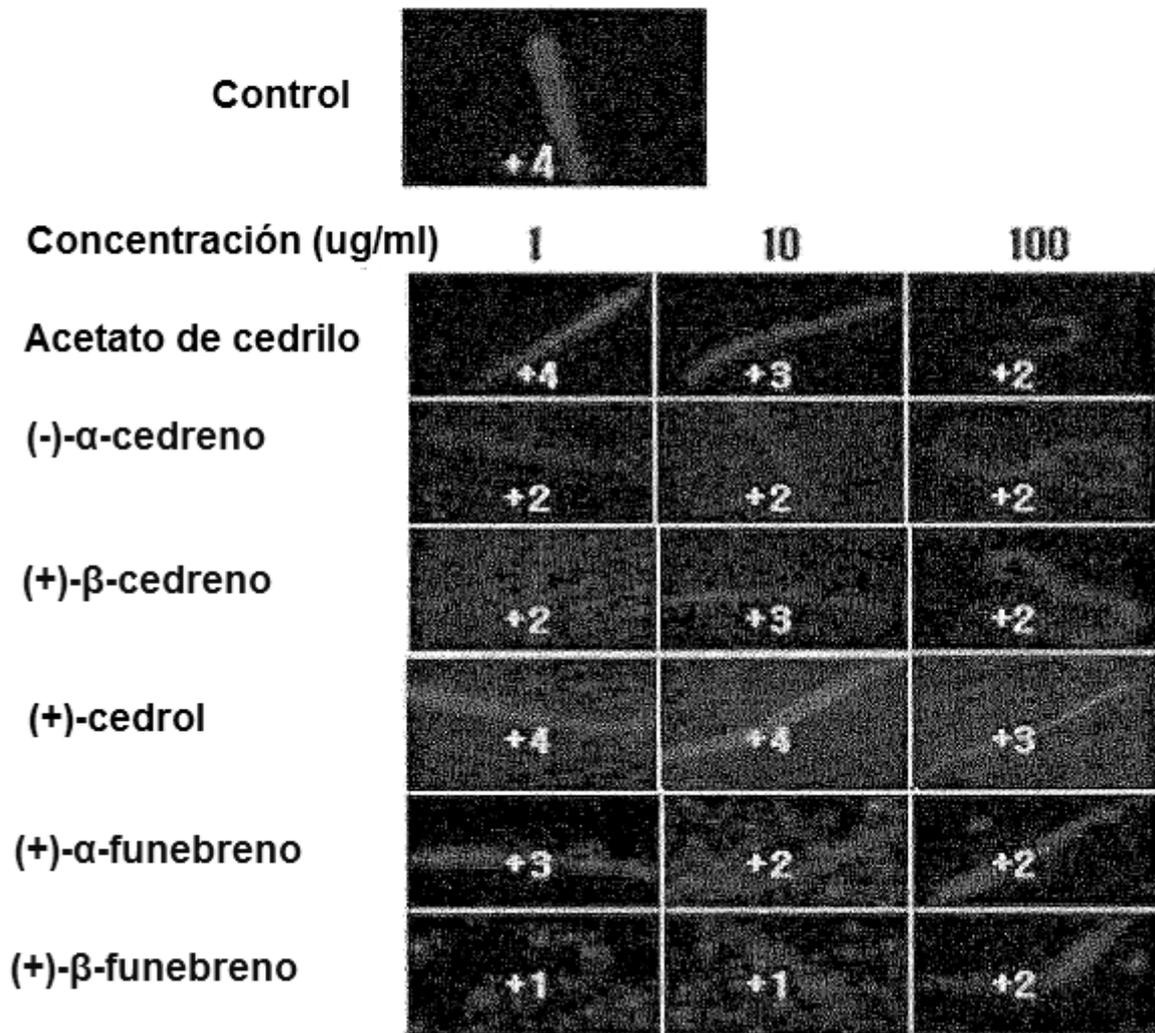
1. Una composición para uso en la prevención o tratamiento de la hiperlipidemia, hígado graso, diabetes u obesidad, que comprende un derivado de sesquiterpeno seleccionado del grupo que consiste en acetato de cedrilo representado por la siguiente fórmula IV,  $\alpha$ -cedreno representado por la siguiente fórmula V y  $\beta$ -cedreno representado por la siguiente fórmula VI como un ingrediente activo:



2. Una composición para uso en la prevención o el tratamiento de la hiperlipidemia, hígado graso, diabetes u obesidad, que comprende un derivado de sesquiterpeno seleccionado del grupo que consiste en cedreno epóxido representado por la siguiente fórmula IX, metil-cedril-éter representado por la siguiente fórmula XI, metil-cedril-cetona representada por la siguiente fórmula XIV y cedrenol representado por la siguiente fórmula XV, como un ingrediente activo:



**Fig. 1**



**Fig. 2**

			
Conc. (ug/ml)	1	10	100
Cedril epóxido	 +4	 +3	 +2
Formiato de cedrilo	 +3	 +1	 +1
Metil-cedril-éter	 +1	 +2	 +2
(-)-cloveno	 +2	 +2	 +2
(+)-8(15)-cedren-9-ol	 +2	 +1	 +2
(+)-sativeno	 +2	 +2	 +1
(-)-epicedrol	 +1	 +1	 +3
Metil-cedril-cetona	 +3	 +2	 +1
Cedrenol	 +2	 +1	 +1