

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 606**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/341** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2010** **E 10192000 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 2329816**

54 Título: **Una sustancia activa contra el cáncer de Antrodia camphorata, método de preparación de la misma y uso de la misma**

30 Prioridad:

**26.11.2009 TW 098140278**

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

**21.06.2016**

73 Titular/es:

**NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY (100.0%)  
No. 1, Sec. 4, Roosevelt Road Da-an District  
Taipei City 106, TW**

72 Inventor/es:

**BEEN-HUANG, CHIANG y  
YU-WEI, LIN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 574 606 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

Una sustancia activa contra el cáncer de *Antrodia camphorata*, método de preparación de la misma y uso de la misma

5

**Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a novedosos compuestos bioactivos, identificados en micelio de *Antrodia camphorata*, y aplicaciones de dichos compuestos para su uso en el tratamiento del cáncer. Para ser más específico, el compuesto extraído es un compuesto contra el cáncer bioactivo que puede inhibir la proliferación de células cancerosas de hepatoma de hígado y proporcionar protección contra cáncer de hígado. También se desvelan métodos de cultivo.

15

**2. Descripción del estado de la técnica**

*Antrodia camphorata* es un hongo medicinal que crece dentro de *Cinnamomum kanchirai* Hayata, tronco de Lauraceae, un árbol de especie nativa encontrado en Taiwán. Se ha informado que *Antrodia camphorata* tiene muchas propiedades medicinales, que incluyen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Chang y Chou, 2004; Mau, Huang; Huang y Chen, 2004; Song y Yen, 2003; Hseu, Chang, Hseu, Lee, Yech, y Chen, 2002; Shen, Chou, Wang, Chen, Chou, y Lu, 2004; Ao *et al.*, 2009). Este tipo de hongo particular se usó ampliamente como un fármaco de tratamiento para enfermedades asociadas al hígado en la medicina tradicional. Recientemente, la actividad anticancerígena de *Antrodia camphorata*, particularmente la actividad contra el cáncer de hígado, ha atraído gran interés.

25

Muchos compuestos identificados en *Antrodia camphorata* demostraron presentar actividades anticancerígenas. Lien *et al.* han purificado 4,7-dimetoxi-5-metil-1,3-benzodioxol del cuerpo fructífero seco de *Antrodia camphorata* y descubierto que este compuesto puede inhibir la proliferación de células epiteliales de colon humano (Lien *et al.*, 2009). Además, se mostró que 24-metilenelanosta-7,9-(11)-dieno-3 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diol-21-oico (MMH01), otro compuesto identificado en micelio de *Antrodia camphorata*, inhibía el crecimiento de células de cáncer de leucemia humana (U937) y células de cáncer pancreático (BxPC3) (Chen, Chou, y Chang, 2009). Aparte de sus actividades anticancerígenas, algunos compuestos aislados de *Antrodia camphorata* también han mostrado actividades antiinflamatorias. Yang *et al.* (2009) purificaron 5 compuestos diferentes de *Antrodia camphorata* que incluyen antroquinonol B, 4-acetil-antroquinonol B, 2,3-(metilendioxi)-6-metil benceno-1,4-diol, 2,4-dimetoxi-6-metil-benceno-1,3-diol y antrodina D, y encontraron que pueden inhibir eficazmente la producción de NO y presentar ciertos efectos antiinflamatorios.

30

35

Debido al alto valor medicinal y la lenta velocidad de crecimiento de *Antrodia camphorata*, el cuerpo fructífero de *Antrodia camphorata* tiene una alta demanda hoy en día. Con el fin de cumplir con la demanda de mercado de este hongo raro, se han explorado muchos enfoques y se ha desarrollado la producción a nivel industrial de micelio de *Antrodia camphorata* usando medio de cultivo líquido (Shin, Pan, y Hsieh *et al.* 2006). Aunque los efectos medicinales de *Antrodia camphorata* han llamado mucho la atención, están disponibles estudios limitados en términos de identificación y caracterización de estos compuestos anticancerígenos bioactivos encontrados en micelio. Nakamura *et al.* descubrieron cinco derivados de ácido málico y ácido succínico de micelio de *Antrodia camphorata*, y demostraron que estos compuestos tienen efectos citotóxicos sobre la línea de células de cáncer de pulmón LLC y las CE<sub>50</sub> están entre 3,6 y 20  $\mu\text{g/ml}$  (Nakamura *et al.*, 2004). Estudios realizados por Cheng, Huang, Chang, Wang y Lu han sugerido que los polisacáridos aislados de *Antrodia camphorata* pueden suprimir la angiogénesis regulando por disminución la expresión de ciclina D1 mediante la inhibición de la señalización del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (receptor de VEGF).

40

45

50

El hepatoma es la principal causa mortal de cánceres malignos en China, Taiwán, Corea y el sur del Sáhara en África (Seow, Liang, Leow y Chung, 2001; Kern, Breuhahn y Schirmacher, 2002). Estudios previos han mostrado que el micelio de *Antrodia camphorata* puede proteger el hígado del daño producido por alcohol, CC14 y lipopolisacáridos (Dai *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2007; Hsiao *et al.*, 2003; Song y Yen, 2003; Hattori y Sheu, 2006; Ao *et al.*, 2009). Guo *et al.* también han revelado que el micelio de *Antrodia camphorata* puede invertir la fibrosis hepática inducida por dimetilnitrosamina, DMN (Guo *et al.* 2002). Además, estudios *in vitro* han demostrado que el extracto de micelio de *Antrodia camphorata* puede inhibir la proliferación de células cancerosas de hepatoma de hígado y las CI<sub>50</sub> de células HepG2 y Hep3B son 49,5 y 62,7  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente (Song, Hsu y Yen, 2005). Pan *et al.* cultivaron *Antrodia camphorata* usando un fermentador de 5 toneladas y han demostrado que el extracto de micelio de *Antrodia camphorata* puede reducir significativamente las CI<sub>50</sub> de células cancerosas HepG2 de hepatoma de hígado a 4,25  $\mu\text{g/ml}$  (Pan *et al.*, 2008). Aunque las pruebas acumuladas han sugerido fuertemente las actividades anti-hepatoma de *Antrodia camphorata*, los compuestos anticancerígenos bioactivos definitivos siguen sin estar claros. Por tanto, para identificar adicionalmente y caracterizar los compuestos anticancerígenos bioactivos encontrados en *Antrodia camphorata*, el (los) inventor(es) han desarrollado satisfactoriamente 1) un nuevo enfoque para el cultivo y purificación de *Antrodia camphorata*, 2) identificado el compuesto anticancerígeno bioactivo

55

60

65

definitivo y 3) verificado su uso para los tratamientos contra el cáncer.

#### Referencia citada [Referenciado por]

##### 5 Otra referencia

- Ao, Z. H., Xu, Z. H., Lu, Z. M., Xu, H. Y., Zhang, X. M., y Dou, W. F. (2009). Niuchangchih (*Antrodia camphorata*) and its potential in treating liver diseases. *J. Ethnopharm*, 121, 194-212.
- Chang, T. T., y Chou, W. N. (2004). *Antrodia cinnamomea* reconsidered and *A. salmonea* sp. nov. on *Cunninghamia konishii* in Taiwan. *Botanical Bulletin Academia Sinica*, 45, 347-352.
- Chen, Y. J., Chou, C. J. y Chang, T. T. (2009). Compound MMH01 possesses toxicity against human leukemia and pancreatic cancer cells. *Toxicology in vitro*, 23, 418-424.
- Cheng, J. J., Huang, N. K., Chang, T. T., Wang, D. L. y Lu, M. K. (2005). Study for anti-angiogenic activities of polysaccharides isolated from *Antrodia cinnamomea* in endothelial cells. *Life Science*, 76, 3029-3042.
- 15 Dai, Y. Y., Chuang, C. H., Tsai, C.C., Sio, H. M., Huang, S.C., Chen, J. C. y Hu, M. L. (2003). The protection of *Antrodia camphorata* against acute hepatotoxicity of alcohol in rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11, 177-185.
- Hattori, M., y Sheu, C. C. (2006). Compounds from *Antrodia camphorata* having anti-inflammatory and anti-tumor activity. US 7109232.
- 20 Hseu, Y. C., Chang, W. C., Hseu, Y. T., Lee, C. Y., Yech, Y. J., y Chen, P. C. (2002). Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes. *Life Science*, 71, 469-482.
- Hsiao, G., Shen, M. Y., Lin, K. H., Lan, M. H., Wu, L. Y., Chou, D. S., Lin, C. H., Su, C. H., y Sheu, J. R. (2003). Antioxidant and hepatoprotective effective of *Antrodia camphorata* extract. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 3302-3308.
- 25 Kern, M. A., Breuhahn, K., y Schirmacher, P. (2002). Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Advances in Cancer Research*, 86, 67-112.
- Guo, S. Q. (2002). Ameliorative effects of *Antrodia camphorata* on liver fibrosis and gastrointestinal functions in rats. Master Thesis. China Medical College, Taiwan.
- 30 Lien, H. M., Lin, H. W., Wang, Y. J., Chen, L. C., Yang, D.Y., Lai, Y. Y, y Ho, Y. S. (2009). Inhibition of anchorage-independent proliferation and G0/G1 cell-cycle regulation in human colorectal carcinoma cells by 4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole isolated from the fruiting body of *Antrodia camphorata*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (In process)
- Lu, Z. M., Tao, W. Y., Zou, X. L., Fu, H. Z., Ao, Z. H. (2007). Protective effects of mycelia of *Antrodia camphorata* and *Armillariella tabescens* in submerged culture against ethanol-induced hepatic toxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 160-164.
- 35 Mau, J. L., Huang, P. N., Huang, S. J., y Chen, C. C. (2004). Antioxidant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camphorata* mycelia. *Food Chemistry*, 86, 25-31.
- Nakamura, N., Hirakawa, A., Gao, J. J., Kakuda, H., Shiro, M., Komatsu, Y., Sheu, C. C., y Hattori, M. (2004). Five new maleic and succinic acid derivatives from the mycelium of *Antrodia camphorata* and their cytotoxic effects on LLC tumor cell line. *Journal of Natural Products*, 67, 46-48.
- 40 Pan, J. H., Chen, Y. S., Sheen, L. Y., y Chiang, B. H. (2008). Large scale submerged fermentation of *Antrodia cinnamomea* for anti-hepatoma activity. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 88, 2223-2230
- Seow, T. K., Liang, R. C., Leow, C. K., y Chung, M. C. (2001). Hepatocellular carcinoma: from bedside to proteomics. *Proteomics*, 10, 1249-1263.
- 45 Shen, Y. C., Chou, C. J., Wang, Y. H., Chen, C. F., Chou, Y. C., y Lu, M. K. (2004). Anti-inflammatory activity of the extracts from mycelia of *Antrodia camphorata* cultured with water-soluble fractions from five different *Cinnamomum* species. *FEMS Microbiology Letters*, 231, 137-143.
- Shih, I. L., Pan, K., y Hsieh, C. (2006). Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*, 41, 1129-1135.
- 50 Yang, S. S., Wang, G. J., Wang, S. Y., Lin, Y. Y., Kuo, Y. H., Lee, T. H., (2009). New Constituents with iNOS Inhibitory Activity from Mycelium of *Antrodia camphorata*. *Planta Med* 2009, 75: 1-5.
- Song, T. Y., y Yen, G. C. (2003). Protective Effects of Fermented Filtrate from *Antrodia camphorata* in Submerged Culture against CC14-Induced Hepatic Toxicity in Rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 1571-1577.
- 55 Song, T. Y., Hsu, S. L., y Yen, G. C. (2005). Induction of apoptosis in human heptoma cells by mycelium of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 158-167.
- Yang, S. S., Wang, G. J., Wang, S. J., Lin, Y. Y., Kuo, Y. H., y Lee, T. H. (2009). New constituents with iNOS inhibitory activity from mycelium of *Antrodia camphorata*. *Planta Medica*, 75, 512-516.
- 60

US 2008/0119565

**Sumario de la invención**

En un aspecto, la presente invención proporciona novedosos compuestos bioactivos extraídos de micelio de *Antrodia camphorata* según la reivindicación 1. Los compuestos bioactivos de la presente invención tienen actividad anticancerígena y pueden inhibir la proliferación de células cancerosas de hepatoma de hígado y pueden proteger contra cáncer de hígado.

Se desarrolló un enfoque novedoso para cultivo de *Antrodia camphorata* para mejorar el proceso de extracción de los compuestos bioactivos.

En otro aspecto de la presente invención se proporcionan compuestos bioactivos que pueden usarse como fármaco para tratar cáncer(es).

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un compuesto bioactivo purificado de *Antrodia camphorata* para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 7.

El método usado para producir el compuesto bioactivo de *Antrodia camphorata* comprende las siguientes etapas:

Etapa 1: Cultivo de *Antrodia camphorata* por fermentación líquida; Etapa 2: Extracción de la pella de micelio con etanol para preparar el extracto de etanol; Etapa 3: Disolver el extracto de etanol de la etapa 2 en agua, y extraer con volumen igual de acetato de etilo para obtener el extracto de acetato de etilo;

Etapa 4: Purificación del extracto de acetato de etilo obtenido de la etapa 3 por cromatografía en columna de gel de sílice usando gradiente de hexano/acetato de etilo como fase móvil (elución en gradiente de hexano/acetato de etilo, las relaciones de hexano/acetato de etilo fueron de 100:0 a 0:100). Al final, se usó 100 % de metanol para eluir los residuos finales. Entonces, las fracciones recogidas (700 ml por fracción) se purificaron adicionalmente por cromatografía en capa fina. Las fracciones f y g se eluyeron con 80 % de hexano/20 % de acetato de etilo a 70 % de hexano/30 % de acetato de etilo y 70 % de hexano/30 % de acetato de etilo a 60 % de hexano/40 % de acetato de etilo, respectivamente.

Etapa 5: Purificación de la fracción g obtenida de la etapa 4 por cromatografía en columna de gel de sílice usando gradiente de hexano/acetato de etilo como fase móvil (elución en gradiente de hexano/acetato de etilo, las relaciones de hexano/acetato de etilo fueron de 80:20 a 50:50) y finalmente eluir con 100 % de acetato de etilo. Recoger los eluatos (50 ml por fracción) que contienen las fracciones E, F, G, H e I. La fracción E se eluyó con 80 % de hexano/20 % de acetato de etilo a 75 % de hexano/ 25 % de acetato de etilo, las fracciones F y G estuvieron en el eluato de 75 % de hexano/ 25 % de acetato de etilo, y la fracción H e I se eluyeron con 75 % de hexano/ 25 % de acetato de etilo a 70 % de hexano/ 30 % de acetato de etilo, y 70 % de hexano/ 30 % de acetato de etilo, respectivamente.

Etapa 6: Purificación adicional de los eluatos que contienen las fracciones E, F, G, H e I obtenidas de la etapa 5 con métodos de purificación apropiados y entonces se recogió 4-acetilantroquinol B.

Los métodos de purificación incluyen, pero no se limitan a, cromatografía en columna de gel de sílice. El extracto de etanol en bruto, el extracto de acetato de etilo, la fracción eluida f, la fracción eluida g, las fracciones eluidas E, F, G, H, I y 4-acetilantroquinol B son los compuestos bioactivos. Estos compuestos purificados pueden usarse 1) para tratar cáncer directamente, 2) como uno de los fármacos de mezcla para la terapia del cáncer, o 3) como constituyentes para otras aplicaciones apropiadas. El 4-acetilantroquinol B está previsto solo para uso en el tratamiento de cáncer.

Los compuestos bioactivos descritos en la presente invención se refieren al extracto de etanol en bruto, el extracto de acetato de etilo, el extracto de hexano/acetato de etilo, fracción f, fracción g, fracciones E, F, G, H, I y 4-acetilantroquinol B de los mismos que se preparan por dicho método en la presente invención. El 4-acetilantroquinol B está previsto solo para uso en el tratamiento de cáncer.

En un ejemplo de la invención, se obtuvo *Antrodia camphorata* (BCRC35716) de Biosources Collection and Research Center (BCRC) en Food industry Research and Development Institute (Hsinchu, Taiwán). Sin embargo, la preparación de los compuestos bioactivos no se limita a estas especies particulares.

Según la invención, fermentación líquida se refiere a cultivar micelio de *Antrodia camphorata* en medio de fermentación que contiene 2 % de glucosa y 2 % extracto de malta con pH ajustado a 4,5-5,0, cultivado a 20-25 °C, 20-100 rpm de agitación y una aireación de 0,5-1 w/m en un fermentador de 5 toneladas durante 4 semanas.

En otra realización de la invención, las etapas para la extracción de etanol son mezclar el micelio seco con 90~99 % de etanol (las relaciones de micelio con respecto a etanol es 1:10 a 1:50 (g/ml)) y homogeneizar con un Polytron durante 12-48 h.

En un ejemplo de la invención, el tamaño de la columna de gel de sílice usada en la etapa 4 es 750-75 mm, 230-400 de malla.

En otro ejemplo de la invención, el tamaño de la columna de gel de sílice usada en la etapa 5 es 420-25 mm, 230-400 de malla.

5 En una realización de la presente invención, la columna de gel de sílice usada en la etapa 6 es la columna Luna 5u Silica (2) 100 A (4,6 x 250 mm) y la fase móvil es la mezcla de hexano/acetato de etilo en la relación de 80 a 20.

Además, la presente invención también describe un compuesto bioactivo que incluye la dosis eficaz de dicho compuesto y diluyentes, excipientes o vehículos adecuados.

10 Por consiguiente, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para su uso en inhibir la proliferación de células cancerosas, que comprende el compuesto bioactivo de la reivindicación 7 y excipientes farmacéuticos aceptables, en la que las células de cáncer están seleccionados preferentemente del grupo que consiste en células cancerosas de hepatoma de hígado, células de cáncer de colon, células de cáncer de próstata y células de cáncer de mama.

15 Además, tales mezclas de compuesto pueden inhibir la proliferación de células cancerosas.

20 La presente invención identificó adicionalmente una mezcla de fármacos anticancerígenos que consiste en dosis eficaz de 4-acetilantroquinol B y un vehículo.

La presente invención también proporciona una aplicación novedosa para el 4-acetilantroquinol B anterior en la que el compuesto puede usarse para el desarrollo de fármaco(s) anticancerígeno(s) y tal(es) fármaco(s) pueden inhibir la proliferación de células cancerosas.

25 Por consiguiente, la presente solicitud de patente también se refiere a 4-acetilantroquinol B para su uso en el tratamiento de cáncer y el uso de 4-acetilantroquinol B en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

30 Realizaciones preferidas de la presente invención se mencionan en las reivindicaciones dependientes.

La presente invención se describirá ahora más específicamente con referencia a las siguientes realizaciones, que se proporcionan con el fin de demostración en vez de limitación.

### 35 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra actividades antiproliferativas de fracciones repartidas por diversos disolventes. Medias con diferentes letras (a~d) dentro de los tratamientos de 72 y 96 h son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

La Fig. 2 muestra los perfiles de HPLC de las fracciones E, F, G, H e I después de la segunda cromatografía en columna de gel de sílice. 2A, 2B, 2C, 2D y 2E representan la fracción E, F, G, H e I, respectivamente. Estas fracciones contienen todas un pico principal al mismo tiempo de retención que se indica por las flechas.

La Fig. 3 muestra la actividad inhibitoria y citotóxica de 4-acetilantroquinol B sobre la proliferación de células HepG2.

La Fig. 4 muestra la estructura del compuesto bioactivo, 4-acetilantroquinol B.

### 45 Descripción detallada de la realización preferida

Los ejemplos a continuación son simplemente representativos de diversos aspectos y características de la presente invención y no son limitantes. A menos que se defina de otro modo, los materiales usados en la presente invención están todos comercialmente disponibles.

#### 50 Ejemplo 1: Preparación de caldo de fermentación de *Antrodia camphorata*

Fuente de *Antrodia camphorata*

55 *Antrodia camphorata* (BCRC35716) usado en la presente invención se obtuvo de Biosources Collection and Research Center (BCRC) en Food industry Research and Development Institute (Hsinchu, Taiwán). Sin embargo, la extracción de los compuestos bioactivos descritos en la presente invención no se limita a esta cepa particular.

Cultivo sumergido de *Antrodia camphorata*

60 Inocular micelio de *Antrodia camphorata* en medio de fermentación que contiene 2 % de glucosa y 2 % de extracto de malta con pH ajustado a 5,0 y cultivar a 22 °C, 50 rpm de agitación y una aireación de 0,5 w/m en un fermentador de 5 toneladas durante 4 semanas.

65

Procesamiento del caldo de fermentación después del cultivo de *Antrodia camphorata*

Al final del cultivo de 4 semanas, el caldo de fermentación se centrifugó para separar el micelio del filtrado de caldo. La pella de micelio se lavó dos veces con agua destilada para eliminar la traza de caldo y a continuación liofilizar y guardar a 4 °C. Para el extracto de etanol, se mezcló pella de micelio seco con 95 % de etanol en la relación de 1 g a 20 ml y se homogeneizó con Polytron de alta velocidad y se agitó durante 24 h para extraer los compuestos solubles en etanol. El extracto se concentró adicionalmente con un evaporador rotatorio y se guardó a -80 °C para estudios adicionales.

#### 10 Ejemplo 2: Purificación de la sustancia bioactiva de *Antrodia camphorata*

Se suspendieron 857 g de extracto de etanol en bruto en 2 l de agua y a continuación la suspensión se extrajo con un volumen igual de acetato de etilo. A continuación, la fase acuosa se extrajo tres veces con n-butanol saturado en agua. La fracción en bruto, fracción de acetato de etilo, fracción de n-butanol y fracción de agua se probaron entonces para la actividad antiproliferativa hacia células HepG2.

La fracción que contiene la actividad inhibitoria más potente se purificó entonces por cromatografía en gel de sílice (750-75 mm, 230-400 de malla) y se eluyó con soluciones en gradiente de hexano/acetato de etilo (las relaciones de hexano/acetato de etilo varían de 100:0 a 0:100). Finalmente, se usó 100 % de metanol para eliminar la traza de residuos. Se recogió cada fracción (700 ml) y se analizó su patrón de composición por cromatografía en capa fina (CCF, gel de sílice 60 F<sub>254</sub>, Merck Co., Darmstadt, Alemania) usando acetato de etilo/hexano (50/50; v/v) para el desarrollo. Se usó fluorescencia amarilla que ilumina UV a 254 nm para agrupar fracciones con esqueleto similar. Según los resultados analizados de cromatografía en capa fina, se recogieron 13 fracciones de los eluatos y se probaron para su actividad anticancerígena.

Como se muestra en la Tabla 1, la fracción f se obtuvo del lavado con hexano/acetato de etilo (variando las relaciones de hexano con respecto a acetato de etilo de 80/20 a 70/30) y los tubos de recogida están en el número 36 a 42 con el volumen final de 4,9 l. La fracción g se obtuvo del lavado de hexano/acetato de etilo (variando las relaciones de hexano con respecto a acetato de etilo de 70/30-60/40) y los tubos de recogida están en el número 43 a 55 con el volumen final de 9,1 l.

Tabla 1 Las relaciones de hexano/acetato de etilo de los primeros tampones de elución

Número de tubo	Tampón de elución (fase móvil)
1-7	Hexano (100 %)
8-13	Hexano:Acetato de etilo (98:2)
14-21	Hexano:Acetato de etilo (95:5)
22-30	Hexano:Acetato de etilo (90:10)
31-40	Hexano:Acetato de etilo (80:20)
41-49	Hexano:Acetato de etilo (70:30)
50-58	Hexano:Acetato de etilo (60:40)
59-68	Hexano:Acetato de etilo (50:50)
69-78	Hexano:Acetato de etilo (40:60)
79-88	Hexano:Acetato de etilo (30:70)
89-98	Hexano:Acetato de etilo (20:80)
99-108	Hexano:Acetato de etilo (10:90)
109-120	Acetato de etilo (100 %)
121-128	Metanol (MeOH) (100 %)

El extracto anticancerígeno más eficaz recogido se purificó adicionalmente usando otra columna de gel de sílice (750-75 mm, 230-400 de malla) y se lavó con tampones hexano/acetato de etilo (las relaciones de hexano con respecto a acetato de etilo varían de 80/20 a 50/50). A continuación se usó acetato de etilo puro para la elución final y se recogieron 12 fracciones. Los eluatos se recogieron cada 50 ml y la fracción E se obtuvo del lavado 80/20-75/25 de hexano/acetato de etilo y los tubos de recogida son 44 a 56 con el final de 650 ml. Las fracciones F y G se obtuvieron del lavado de 75/25 de hexano/acetato de etilo, los tubos de recogida son 57 a 61 y 62 a 69 y los volúmenes recogidos son 250 ml y 400 ml, respectivamente. La fracción H se obtuvo del lavado con 75/25 a 70/30 de hexano/acetato de etilo, los tubos de recogida son 70 a 73 y el volumen final recogido es 200 ml. La fracción I se obtuvo del lavado con 70/30 de hexano/acetato de etilo, los tubos de recogida son 74 a 84 y el volumen total recogido es 550 ml. Todas estas fracciones se probaron para su actividad anticancerígena y la fracción más eficaz se purificó entonces adicionalmente.

Tabla 2 Las relaciones de hexano/acetato de etilo de los segundos tampones de elución

Número de tubo	Tampón de elución (fase móvil)
1-47	Hexano:Acetato de etilo (80:20)
48-71	Hexano:Acetato de etilo (75:25)
72-97	Hexano:Acetato de etilo (70:30)
98-121	Hexano:Acetato de etilo (65:35)
122-145	Hexano:Acetato de etilo (60:40)
146-169	Hexano:Acetato de etilo (55:45)
170-191	Hexano:Acetato de etilo (50:50)
192-230	Hexano:Acetato de etilo (100 %)

Las fracciones recogidas se purificaron adicionalmente usando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) equipado con un detector de absorbancia ajustable (modelo serie 1100, Agilent, EE.UU.). La elución se llevó a cabo al caudal de 1 ml/min con una temperatura de columna a 25 °C y longitud de onda UV de 254 nm. La fracción excepcional se separó por una columna de sílice (4,6 x 250 mm, columna Luna 5u Silica (2) 100 A) con hexano/acetato de etilo (80:20, v/v) como sistema de disolventes para obtener el compuesto bioactivo anticancerígeno. La estructura del compuesto purificado se identificó adicionalmente por resonancia magnética nuclear (RMN, Bruker AMX-400).

### Ejemplo 3 Análisis de los efectos inhibidores de compuestos bioactivos de *Antrodia camphorata* sobre la proliferación de células de hepatoma

#### Material

Se obtuvieron células HepG2 de la Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC, Rockville, Maryland, EE.UU. y se mantuvieron en medio E de Williams (WME), que contenía 10 mM/l de HEPES, 5 µg/ml de insulina, 2 µg/ml de glucagón, 0,05 µg/ml de hidrocortisona y 5 % de suero bovino fetal (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.). Las células de cáncer de colon (CT26, BCRC 60443), células de cáncer de próstata (LNCaP, BCRC 60088) y células de cáncer de mama (MDA-MB-231, BCRC 60425) se obtuvieron de Biosources Collection and Research Center (BCRC) en Food industry Research and Development Institute (Hsinchu, Taiwán).

#### Método

Se cultivaron células HepG2 en WME sobre una placa de cultivo celular de 96 pocillos ( $2,5 \times 10^4$  células por pocillo) y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de 4 horas de incubación, sustituir el medio con diferentes concentraciones de extractos de muestra de *Antrodia camphorata*. Los extractos de *Antrodia camphorata* se disolvieron en 1 % de sulfóxido de dimetilo (DMSO) y se mezclaron con medio WME para preparar extractos a diferentes concentraciones y la concentración final de DMSO se mantuvo por debajo del 1 %. Los cultivos de control solo contuvieron disolventes de extracción, y los pocillos de blanco contuvieron 100 µl de medio de crecimiento sin células. Después de 72 y 96 h de incubación, la proliferación celular se determinó por ensayo MTS (ensayo de proliferación celular de no radiactividad en CellTiter 96 basado en MTS, Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) para examinar la actividad anti-hepatoma. MTS es un método colorimétrico que utiliza un reactivo de tetrazolio. La proliferación celular se determinó a las 72 y 96 h a partir de la lectura de absorbancia de MTS a 490 nm para cada concentración en comparación con el control. El valor de CC<sub>50</sub> se determinó como la concentración citotóxica de una muestra que redujo la viabilidad celular al 50 % del control en 24 h. La CE<sub>50</sub> de una muestra se define como la dosis media eficaz de una muestra (la concentración de la muestra que produce el 50 % de viabilidad celular) después de tratar las células de cáncer durante un cierto periodo de tiempo. Se probaron al menos tres replicaciones de cada muestra para confirmar la proliferación celular y citotoxicidad. El efecto selectivo sobre las células de cáncer se expresó como el valor SI (índice selectivo). El valor SI se determinó como la relación de CC<sub>50</sub> frente a CE<sub>50</sub> para una muestra probada.

#### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando análisis unilateral de la varianza y prueba del rango múltiple de Duncan (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.) para determinar diferencias significativas entre medias (P < 0,05).

#### Resultados

##### 50 Actividades antiproliferativas de fracciones de extracto en bruto de micelio

Los pesos de la fracción de acetato de etilo, fracción de n-butanol y fracción de agua del extracto de etanol de micelio fueron 574 g, 196 g y 87 g, respectivamente. Sus actividades antiproliferativas se muestran en la Fig. 1. La CE<sub>50</sub> del extracto en bruto, fracción de acetato de etilo, fracción de n-butanol y fracción de agua para antiproliferación de células HepG2 durante 72 h de tratamiento fueron  $5,59 \pm 0,16$ ,  $2,83 \pm 0,06$ ,  $18,26 \pm 2,72$  y  $>100$

µg/ml, respectivamente. Las CE<sub>50</sub> de estas fracciones durante 96 h de tratamiento fueron 2,76 ± 0,01, 1,94 ± 0,13, 5,3 ± 0,00 y 9,35 ± 0,32 µg/ml, respectivamente. Se encontró que la fracción de acetato de etilo mostró la mejor actividad antiproliferativa entre todas las fracciones; así, esta fracción se purificó adicionalmente por la columna de gel de sílice abierta.

5 Actividades antiproliferativas de fracciones separadas por la primera columna de gel de sílice abierta

El extracto de acetato de etilo se separó en 13 fracciones por la columna de gel de sílice abierta, y las CE<sub>50</sub> de estas fracciones se dan en la Fig. 3. Los resultados indicaron que las fracciones f y g tuvieron mejor actividad antiproliferativa. Sin embargo, solo se recuperaron 2,29 g de fracción f en comparación con los 13,25 g recuperados para la fracción g. Como la fracción g fue la principal porción bioactiva cuantitativamente, se usó para estudio adicional.

Las CE<sub>50</sub> de fracción g hacia células HepG2 fueron 1,33 µg/ml y 0,82 µg/ml durante tratamientos de 72 h y 96 h, respectivamente. Además, el valor SI de la fracción g fue 86 durante 96 h de tratamiento. Debido a los compuestos contaminados encontrados en la fracción g basándose en el resultado de CCF, fue necesario usar una columna de gel de sílice abierta para purificar adicionalmente el compuesto bioactivo.

15

Tabla 3 Citotoxicidades (CC<sub>50</sub>) y actividades antiproliferativas (CE<sub>50</sub>) de fracciones aisladas de acetato de etilo por la primera columna de gel de sílice abierta contra células cancerosas de hepatoma de hígado.

Fracción	Células HepG2				
	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	CE <sub>50</sub> (µg/ml)			
		72 horas	SI*	96 horas	SI*
a	>100	>100 <sup>a</sup>	---	>100 <sup>a</sup>	---
b	>100	>100 <sup>a</sup>	---	>100 <sup>a</sup>	---
c	>100	>100 <sup>a</sup>	---	>100 <sup>a</sup>	---
d	>100	37,04 ± 1,20 <sup>c</sup>	>2,70	15,81 ± 1,41 <sup>d</sup>	>6,33
e	>100	13,21 ± 0,24 <sup>f</sup>	>7,57	3,42 ± 0,21 <sup>g</sup>	>29,24
f	72,75 ± 1,70	2,35 ± 0,17 <sup>h</sup>	30,96	1,59 ± 0,22 <sup>h</sup>	45,75
g	71,24 ± 3,88	1,33 ± 0,05 <sup>h</sup>	53,56	0,82 ± 0,01 <sup>h</sup>	86,88
h	>100	8,06 ± 0,58 <sup>g</sup>	>12,41	4,69 ± 0,26 <sup>f</sup>	>21,32
i	>100	19,81 ± 0,56 <sup>e</sup>	>5,05	8,60 ± 0,39 <sup>e</sup>	>11,63
j	73,08 ± 1,35	7,74 ± 1,09 <sup>g</sup>	9,44	3,59 ± 0,57 <sup>g</sup>	20,36
k	>100	51,64 ± 2,20 <sup>b</sup>	>1,94	38,92 ± 0,68 <sup>b</sup>	>2,57
l	>100	29,55 ± 4,54 <sup>d</sup>	>3,38	22,98 ± 1,56 <sup>c</sup>	>4,35
m	>100	>100 <sup>a</sup>	---	>100 <sup>a</sup>	---

\*Índice selectivo (SI) = CC<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub>.

<sup>a-h</sup> Medias con diferentes letras dentro de una columna son significativamente diferentes (*P* < 0,05).

20

Actividades antiproliferativas de fracciones separadas por la segunda columna de gel de sílice abierta

Se aislaron doce fracciones de la fracción g y las CE<sub>50</sub> de estas 12 fracciones se muestran en la Fig. 4. Los resultados indicaron que las fracciones F, G y H expresaron mejor actividad antiproliferativa con una CE<sub>50</sub> de 0,5 µg/ml durante 72 h de tratamiento, y las CE<sub>50</sub> de las fracciones E, F, G, H e I fueron aproximadamente 0,4 µg/ml durante 96 h de tratamiento.

25

Después de la purificación por la segunda columna de gel de sílice abierta, la CC<sub>50</sub> de todas las fracciones en células HepG2 fue > 50 µg/ml. Los valores SI de estas fracciones oscilaron de 111 a 119 sugiriendo que estas fracciones fueron muy selectivas de células de hepatoma.

30

Tabla 4 Citotoxicidades (CC<sub>50</sub>) y actividades antiproliferativas (CE<sub>50</sub>) de fracciones aisladas por la segunda columna de gel de sílice abierta contra células cancerosas HepG2 de hepatoma de hígado

Fracciones	Células cancerosas HepG2 de hepatoma de hígado				
	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	CE <sub>50</sub> (µg/ml)		SI*	SI*
		72 horas	96 horas		
A	>50	>50 <sup>a</sup>	---	38,28 ± 4,45 <sup>a</sup>	---
B	>50	9,94 ± 1,11 <sup>d</sup>	>5,03	10,26 ± 0,48 <sup>c</sup>	>4,87
C	>50	15,97 ± 1,85 <sup>c</sup>	>3,13	11,37 ± 0,07 <sup>c</sup>	>4,40
D	>50	4,74 ± 0,33 <sup>e</sup>	>10,55	2,89 ± 0,04 <sup>d</sup>	>17,30
E	>50	0,70 ± 0,12 <sup>g</sup>	>71,43	0,45 ± 0,01 <sup>d</sup>	>111,11
F	>50	0,50 ± 0,00 <sup>g</sup>	>100	0,45 ± 0,01 <sup>d</sup>	>111,11
G	>50	0,57 ± 0,00 <sup>g</sup>	>87,72	0,43 ± 0,00 <sup>d</sup>	>116,28
H	>50	0,55 ± 0,03 <sup>g</sup>	>90,91	0,42 ± 0,01 <sup>d</sup>	>119,05
I	>50	0,68 ± 0,02 <sup>g</sup>	>73,53	0,43 ± 0,02 <sup>d</sup>	>116,28
J	>50	3,20 ± 0,58 <sup>f</sup>	>15,63	0,99 ± 0,17 <sup>d</sup>	>50,51
K	>50	1,29 ± 0,10 <sup>g</sup>	>38,76	0,77 ± 0,01 <sup>d</sup>	>64,94
L	>50	20,40 ± 1,01 <sup>b</sup>	>2,45	16,62 ± 3,42 <sup>b</sup>	>3,01

\*Índice selectivo (SI) = CC<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub>.

<sup>a..h</sup> Medias con diferentes letras dentro de una columna son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

#### Actividad antiproliferativa de fracción purificada por HPLC

5

Las fracciones E, F, G, H e I se separaron adicionalmente por HPLC y todas las fracciones anteriores contienen un pico principal en el mismo tiempo de retención (Fig. 2A-E). El eluato de este pico principal se recogió y se probó para su bioactividad y se usó para caracterización adicional. La Figura 3 muestra la actividad antiproliferativa de este compuesto. Las CE<sub>50</sub> de este compuesto fueron 0,1 y 0,08 µg/ml para tratamientos de 72 y 96 h, respectivamente. Este compuesto mostró la mejor actividad antiproliferativa entre las fracciones obtenidas durante todo el proceso de separación. En comparación con el extracto en bruto, este compuesto mostró 50 veces la actividad antiproliferativa. La CC<sub>50</sub> de este compuesto fue >10 µg/ml.

10

Además, la presente invención también probó la actividad antiproliferativa de 4-acetilantroquinol B contra otras células cancerosas. Como se muestra en la Tabla 5, las CI<sub>50</sub> de este compuesto contra células de cáncer de colon (CT26), cáncer de próstata (LNCaP) y de cáncer de mama (MDA-MB-231) son 48,12 ± 5,61, 16,841 ± 3,41 y 0,091 µg/ml, respectivamente, y la viabilidad celular de estas células de cáncer probadas fue inferior al 50 %.

15

Por tanto, tal compuesto también pueden inhibir crecimiento de células de cáncer de colon, próstata y de mama y puede usarse como tratamientos para estos cánceres.

20

Tabla 5 Las actividades antiproliferativas (CI<sub>50</sub>) de 4-acetilantroquinol B contra células cancerosas

	CI <sub>50</sub> (µg/ml)
células de cáncer de colon (CT26)	48,12 ± 5,61
células de cáncer de próstata (LNCaP)	16,841 ± 3,41
células de cáncer de mama (MDA-MB-231)	0,091

#### Estructura del compuesto bioactivo

25

El compuesto bioactivo se esclareció por métodos espectroscópicos, que incluyen resonancia magnética nuclear 1D y 2D (RMN) y análisis de espectros de masas. La estructura se muestra en la Fig. 4.

30

Espectrometría de masas por ionización electrónica de 4-acetilantroquinol B: EM-EI, m/z 485 [M + Na]<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 5,73 (1H, d, J = 3,0 Hz, H-4), 5,28 (1H, t, J = 6,9 Hz, H-12), 5,14 (1H, t, J = 6,7 Hz, H-8), 4,69 (1H, m, H-15), 3,98 (3H, s, H-24), 3,61 (3H, s, H-23), 2,74 (1H, m, H-17), 2,50 (1H, m, H-6), 2,38 (1H, dd, J = 7,0, 13,8 Hz, H-14), 2,28 (2H, m, H-7), 2,27 (1H, m, H-14), 2,22 (2H, m, H-16), 2,17 (2H, m, H-11), 2,08 (3H, s, -OAc), 2,06 (2H, m, H-10), 1,93 (1H, m, H-5), 1,66 (3H, s, H-21), 1,57 (3H, s, H-20), 1,22 (3H, d, J = 7,3 Hz, H-19), 1,17 (3H, d, J = 6,9 Hz, H-22); RMN <sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 199,0 (s, C-1), 182,7 (s, C-18), 171,4 (s, CH<sub>3</sub>CO-), 160,5 (s, C-3), 138,7 (s, C9), 138,3 (s, C-2), 131,6 (s, C-13), 129,2 (d, C-12), 122,4 (d, C-8), 78,8 (d, C-15), 70,4 (d, C-4), 61,0 (q, C-23), 60,3 (q, C-24), 45,8 (t, C-14), 44,2 (d, C-5), 42,5 (d, C-6), 40,5 (t, C-10), 35,5 (t, C-16), 35,0 (d, C-17), 27,9 (t, C-7), 27,0 (t, C-11), 20,8 (CH<sub>3</sub>CO-), 16,4 (q, C-21), 16,2 (q, C-20), 15,9 (q, C-19), 13,0 (q, C-22).

35

La estructura de este compuesto bioactivo que tiene actividad anticancerígena caracterizado en la presente invención es idéntica a uno de los cinco compuestos antiinflamatorios, 4-acetilantroquinol B, anteriormente informados por Yang *et al.* en 2009. Sin embargo, su investigación no expuso los efectos de tal compuesto en la inhibición del crecimiento de células de cáncer y su aplicación para tratar cánceres de hígado, colon, próstata y mama (Yang *et al.*, 2009). Así, la presente invención no solo proporciona varios compuestos bioactivos (fracciones

40

extraídas diferentes) que tienen actividad anticancerígena, sino también novedosas aplicaciones de 4-acetilantroquinol B para terapia contra el cáncer. Por tanto, en comparación con hallazgos previos, la presente invención ofrece ventajosos métodos de aislamiento y preparación de los compuestos bioactivos, y novedosas aplicaciones para terapia contra el cáncer.

5 En la presente invención, el compuesto anticancerígeno se purificó a constituyente definido y se mostró que tenía efectos inhibidores sobre la proliferación de células cancerosas a concentraciones muy bajas (por ejemplo, 0,1 µg/ml durante 72 horas o 0,08 µg/ml durante 96 horas). Tal compuesto no solo puede purificarse de micelio de *Antrodia camphorata* por fermentación líquida, sino que también puede producirse mediante síntesis química. Este proceso  
10 novedoso pueden reducir significativamente el coste de preparación y resolver la cuestión de alta demanda de la escasa *Antrodia camphorata*. Por otra parte, los compuestos obtenidos previamente por otros son extracto en bruto y sus constituciones no se determinaron. Tal extracto en bruto puede solo obtenerse por extracción de caldo de fermentación, y ese proceso no puede simplificarse. Posteriormente, el coste de preparación es caro. Así, la presente invención proporciona una novedosa aplicación de 4-acetilantroquinol B que va a usarse como fármaco  
15 anticancerígeno mediante su actividad antiproliferativa sobre células cancerosas.

En resumen, la presente invención presenta un enfoque original para la extracción de compuestos bioactivos y adicionalmente identificó sus propiedades multifuncionales en términos de actividades antiproliferativas sobre células cancerosas.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto bioactivo purificado de *Antrodia camphorata*, en donde la purificación comprende las etapas de:

etapa 1: proporcionar las pellas de micelio de *Antrodia camphorata*;

etapa 2: extraer las pellas de micelio de *Antrodia camphorata* con etanol y luego liofilizar;

etapa 3: disolver en agua el extracto de etanol de micelio liofilizado de la etapa 2 y extraer la suspensión con acetato de etilo;

etapa 4: purificar el extracto de acetato de etilo de la etapa 3 por cromatografía en gel de sílice, en donde la fracción f se eluye con 80 % de hexano/20 % de acetato de etilo a 70 % de hexano/30 % de acetato de etilo y la fracción g se eluye con 70 % de hexano/30 % de acetato de etilo a 60 % de hexano/40 % de acetato de etilo;

etapa 5: purificar la fracción g de la etapa 4 por cromatografía en gel de sílice usando gradiente de hexano/acetato de etilo como fase móvil, en donde la fracción E se eluye con 80 % de hexano/20 % de acetato de etilo a 75 % de hexano/25 % de acetato de etilo, y las fracciones F y G se eluyen con 75 % de hexano/25 % de acetato de etilo, y la fracción H se eluye con 75 % de hexano/25 % de acetato de etilo a 70 % de hexano/30 % de acetato de etilo y la fracción I se eluye con 70 % de hexano/30 % de acetato de etilo;

etapa 6: purificar las fracciones E, F, G, H e I de la etapa 5 por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para obtener 4-acetilantroquinol B;

en donde el compuesto bioactivo está seleccionado del grupo que consiste en el extracto de acetato de etilo de la etapa 3, fracciones f y g de la etapa 4, fracciones E, F, G, H e I de la etapa 5.

2. El compuesto bioactivo según la reivindicación 1, en donde en la etapa 2 las pellas liofilizadas se extraen con etanol y en donde la relación de pellas de micelio con respecto a etanol está en el intervalo de 0,02 a 0,1 (g/ml).

3. El compuesto bioactivo según la reivindicación 1, en donde en la etapa 3 el extracto de etanol de micelio se disuelve primero en agua y a continuación la suspensión del extracto de etanol de micelio se extrae con acetato de etilo y en donde la relación de la suspensión de micelio con respecto a acetato de etilo está en el intervalo de 0,4 a 3,0.

4. El compuesto bioactivo según la reivindicación 1, en donde en la etapa 4 la cromatografía en gel de sílice se aplica con geles de sílice para cromatografía preparativa.

5. El compuesto bioactivo según la reivindicación 1, en donde en la etapa 5 la cromatografía en gel de sílice se aplica con geles de sílice para cromatografía preparativa.

6. El compuesto bioactivo según la reivindicación 1, en donde la columna para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la columna de gel de sílice de fase normal y las fracciones se eluyen con 50 % de hexano/50 % de acetato de etilo, 60 % de hexano/40 % de acetato de etilo, 70 % de hexano/30 % de acetato de etilo, 80 % de hexano/20 % de acetato de etilo o 90 % de hexano/10 % de acetato de etilo.

7. Un compuesto bioactivo purificado de *Antrodia camphorata* para su uso en el tratamiento de cáncer, en donde la purificación comprende las etapas de:

etapa 1: proporcionar las pellas de micelio de *Antrodia camphorata*;

etapa 2: extraer las pellas de micelio de *Antrodia camphorata* con etanol y luego liofilizar;

etapa 3: disolver en agua el extracto de etanol de micelio liofilizado de la etapa 2 y extraer la suspensión con acetato de etilo;

etapa 4: purificar el extracto de acetato de etilo de la etapa 3 por cromatografía en gel de sílice, en donde la fracción f se eluye con 80 % de hexano/20 % de acetato de etilo a 70 % de hexano/30 % de acetato de etilo y la fracción g se eluye con 70 % de hexano/30 % de acetato de etilo a 60 % de hexano/40 % de acetato de etilo;

etapa 5: purificar la fracción g de la etapa 4 por cromatografía en gel de sílice usando gradiente de hexano/acetato de etilo como fase móvil, en donde la fracción E se eluye con 80 % de hexano/20 % de acetato de etilo a 75 % de hexano/25 % de acetato de etilo, y las fracciones F y G se eluyen con 75 % de hexano/25 % de acetato de etilo, y la fracción H se eluye con 75 % de hexano/25 % de acetato de etilo a 70 % de hexano/30 % de acetato de etilo y la fracción I se eluye con 70 % de hexano/30 % de acetato de etilo;

etapa 6: purificar las fracciones E, F, G, H e I de la etapa 5 por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para obtener 4-acetilantroquinol B;

en donde el compuesto bioactivo está seleccionado del grupo que consiste en el extracto de acetato de etilo de la etapa 3, fracciones f y g de la etapa 4, fracciones E, F, G, H e I de la etapa 5 y 4-acetilantroquinol B.

8. El compuesto bioactivo para su uso según la reivindicación 7, en donde en la etapa 2 las pellas liofilizadas se extraen con etanol y en donde la relación de pellas de micelio con respecto a etanol está en el intervalo de 0,02 a 0,1 (g/ml).

9. El compuesto bioactivo para su uso según la reivindicación 7, en donde en la etapa 3 el extracto de etanol de micelio se disuelve primero en agua y a continuación la suspensión del extracto de etanol de micelio se extrae con acetato de etilo y en donde la relación de la suspensión de micelio con respecto a acetato de etilo está en el intervalo de 0,4 a 3,0.

5 10. El compuesto bioactivo para su uso según la reivindicación 7, en donde en la etapa 4 la cromatografía en gel de sílice se aplica con geles de sílice para cromatografía preparativa.

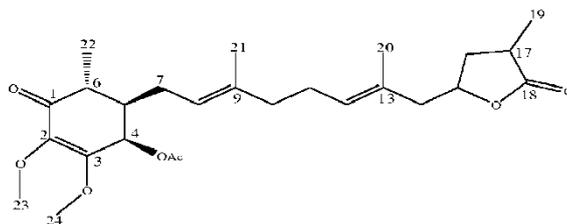
10 11. El compuesto bioactivo para su uso según la reivindicación 7, en donde en la etapa 5 la cromatografía en gel de sílice se aplica con geles de sílice para cromatografía preparativa.

15 12. El compuesto bioactivo para su uso según la reivindicación 7, en donde la columna para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la columna de gel de sílice de fase normal y las fracciones se eluyen con 50 % de hexano/50 % de acetato de etilo, 60 % de hexano/40 % de acetato de etilo, 70 % de hexano/30 % de acetato de etilo, 80 % de hexano/20 % de acetato de etilo o 90 % de hexano/10 % de acetato de etilo.

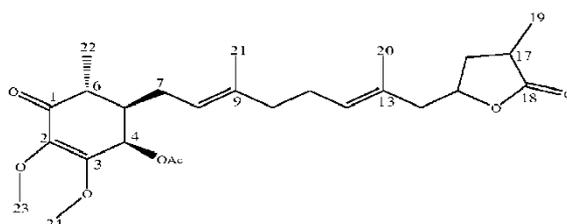
20 13. El compuesto bioactivo para su uso según la reivindicación 7, en donde el compuesto bioactivo inhibe la proliferación de células cancerosas de hepatoma de hígado, células de cáncer de colon, células de cáncer de próstata o células de cáncer de mama.

25 14. Una composición farmacéutica para su uso para inhibir la proliferación de células cancerosas, que comprende el compuesto bioactivo de la reivindicación 7 y excipientes farmacéuticos aceptables, en donde las células cancerosas están seleccionadas preferentemente del grupo que consiste en células cancerosas de hepatoma de hígado, células de cáncer de colon, células de cáncer de próstata y células de cáncer de mama.

15. 4-Acetilantroquinonol B para su uso en el tratamiento de cáncer, en donde el 4-acetilantroquinonol B tiene la siguiente estructura:

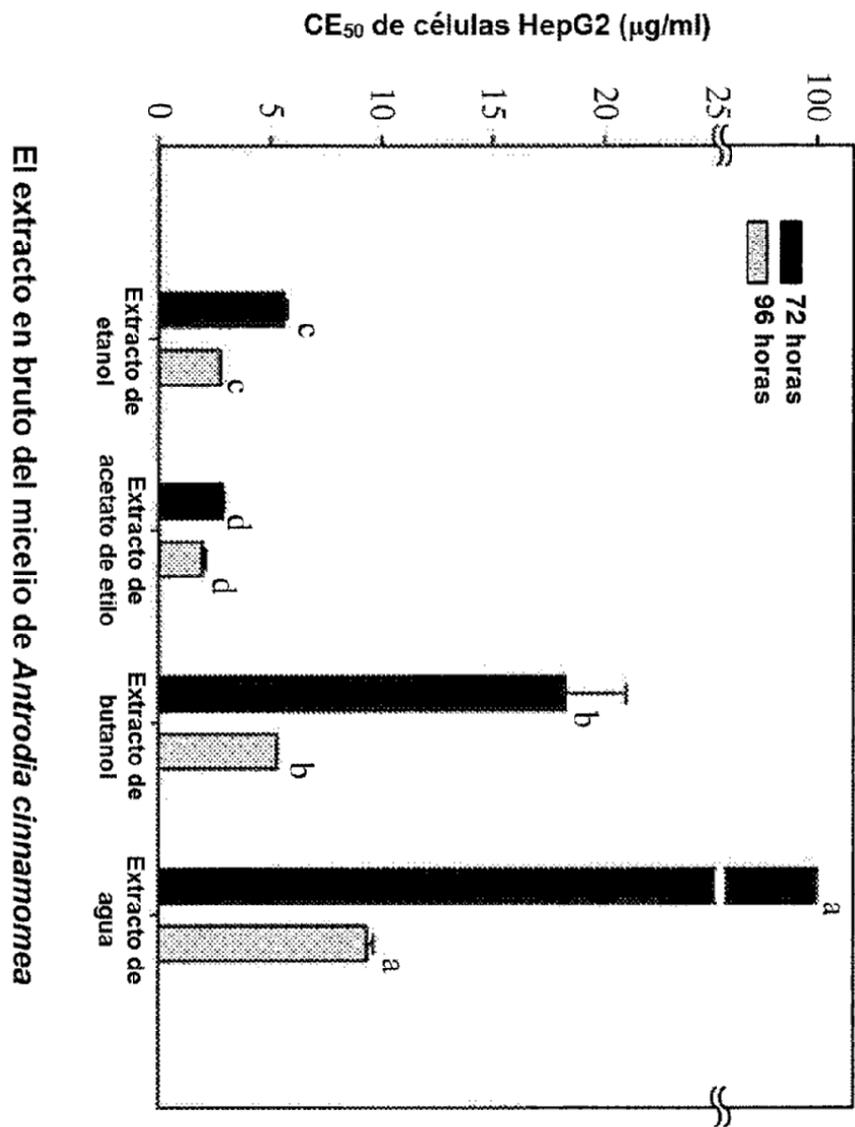


30 16. Uso de 4-acetilantroquinonol B en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en donde el 4-acetilantroquinonol B tiene la siguiente estructura:



35 17. El uso de 4-acetilantroquinonol B según la reivindicación 16, en donde el medicamento inhibe la proliferación de células cancerosas, células cancerosas que están seleccionadas preferentemente del grupo que consiste en células cancerosas de hepatoma de hígado, células de cáncer de colon, células de cáncer de próstata y células de cáncer de mama.

40



*Fig. 1*

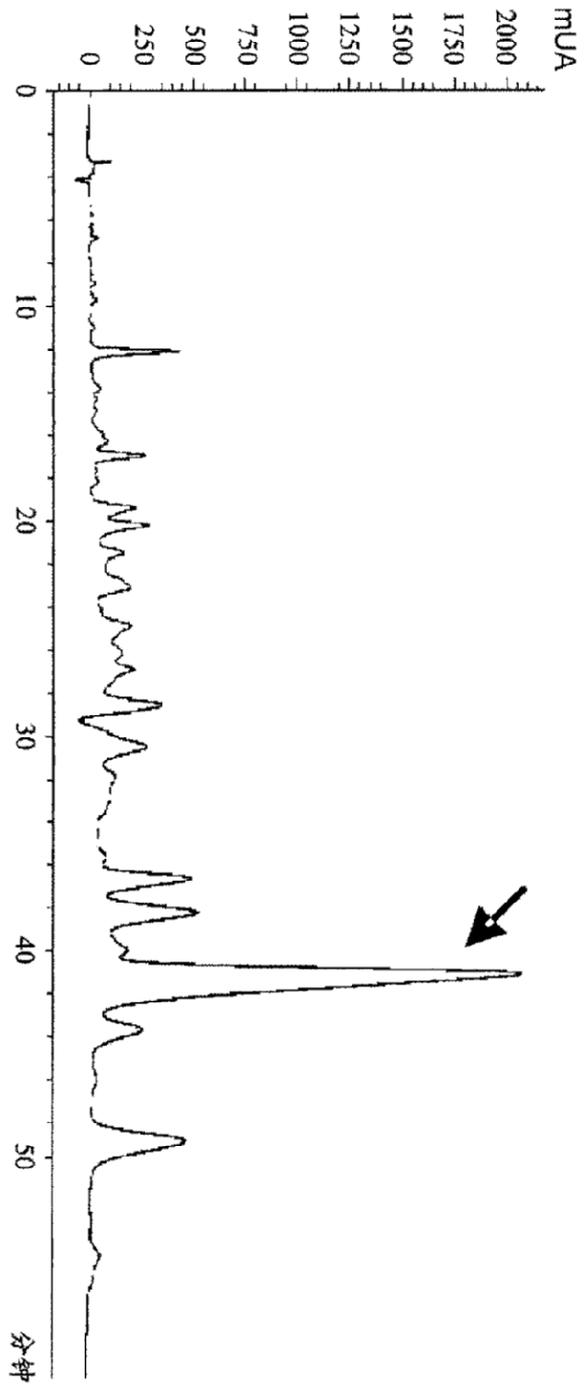


Fig. 2A

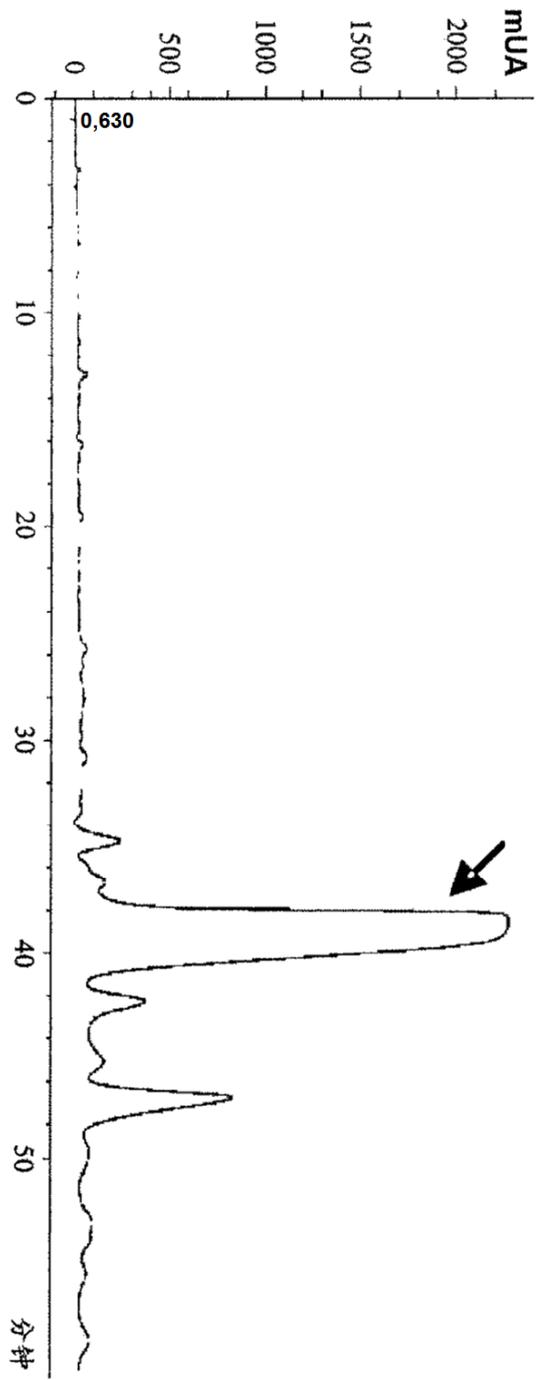


Fig. 2B

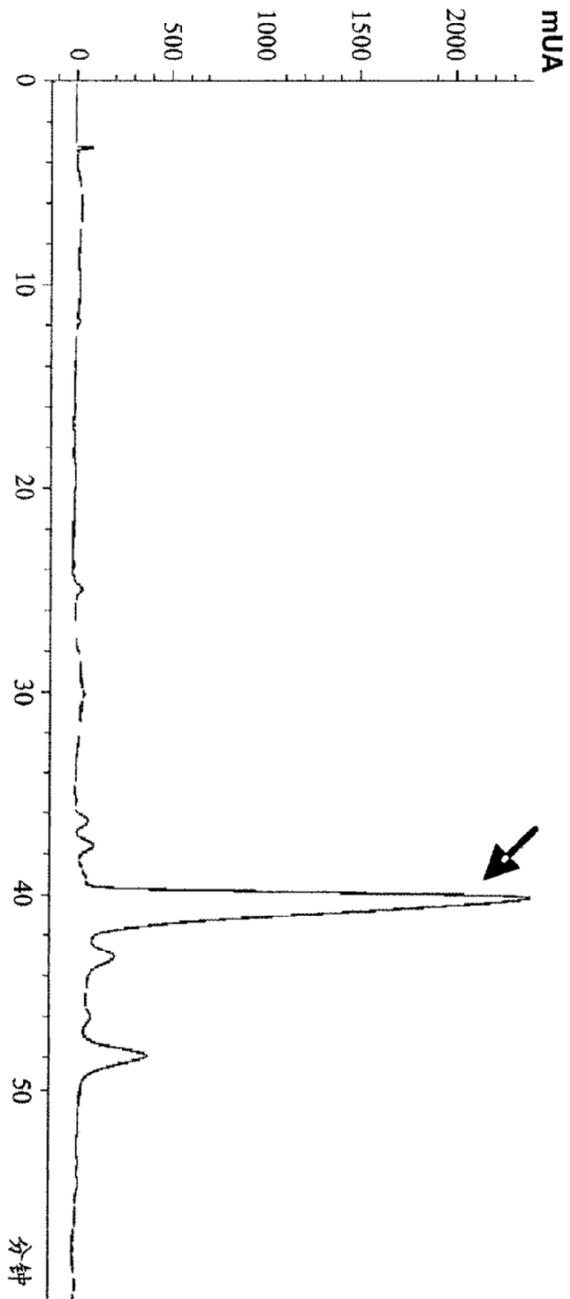


Fig. 2C

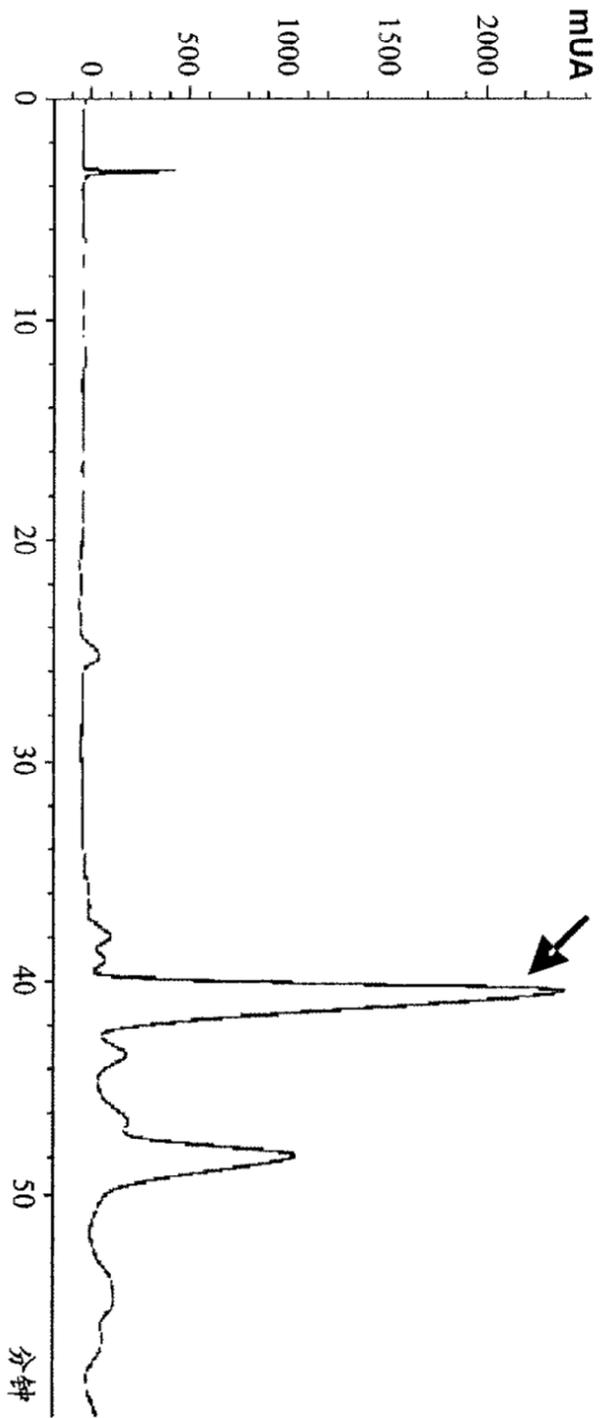
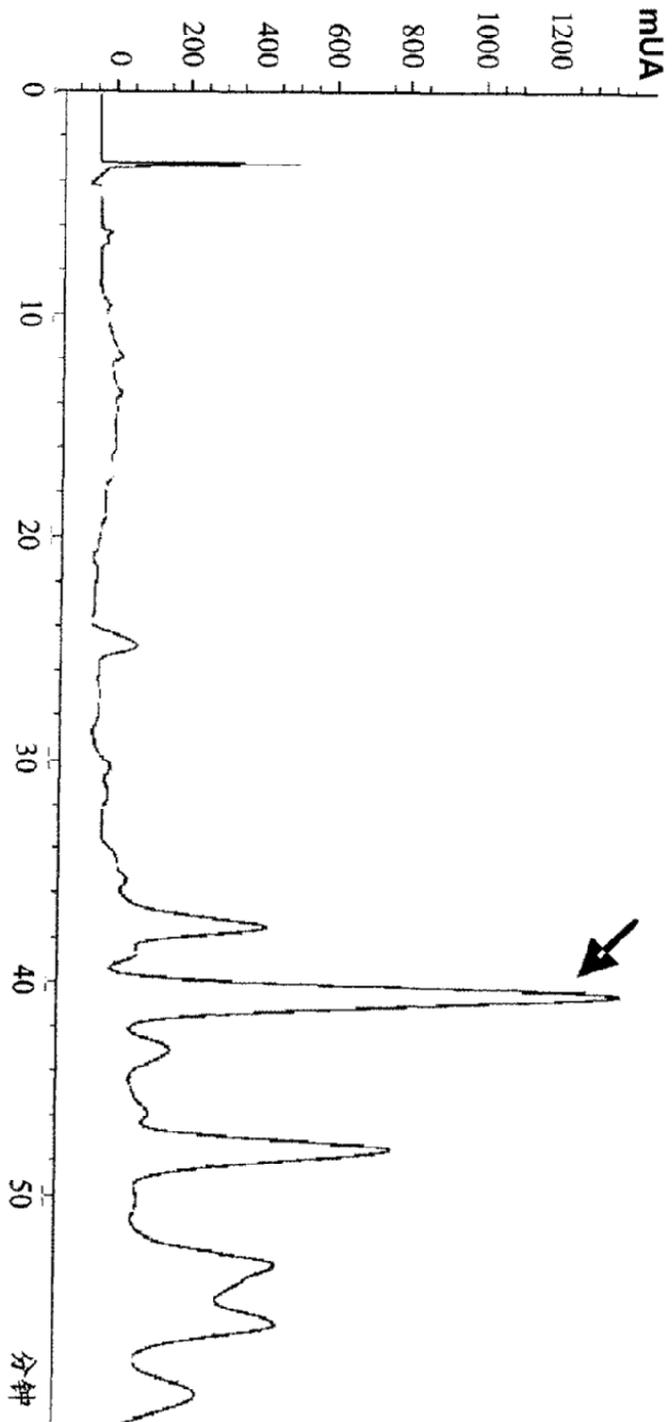


Fig. 2D



*Fig. 2E*

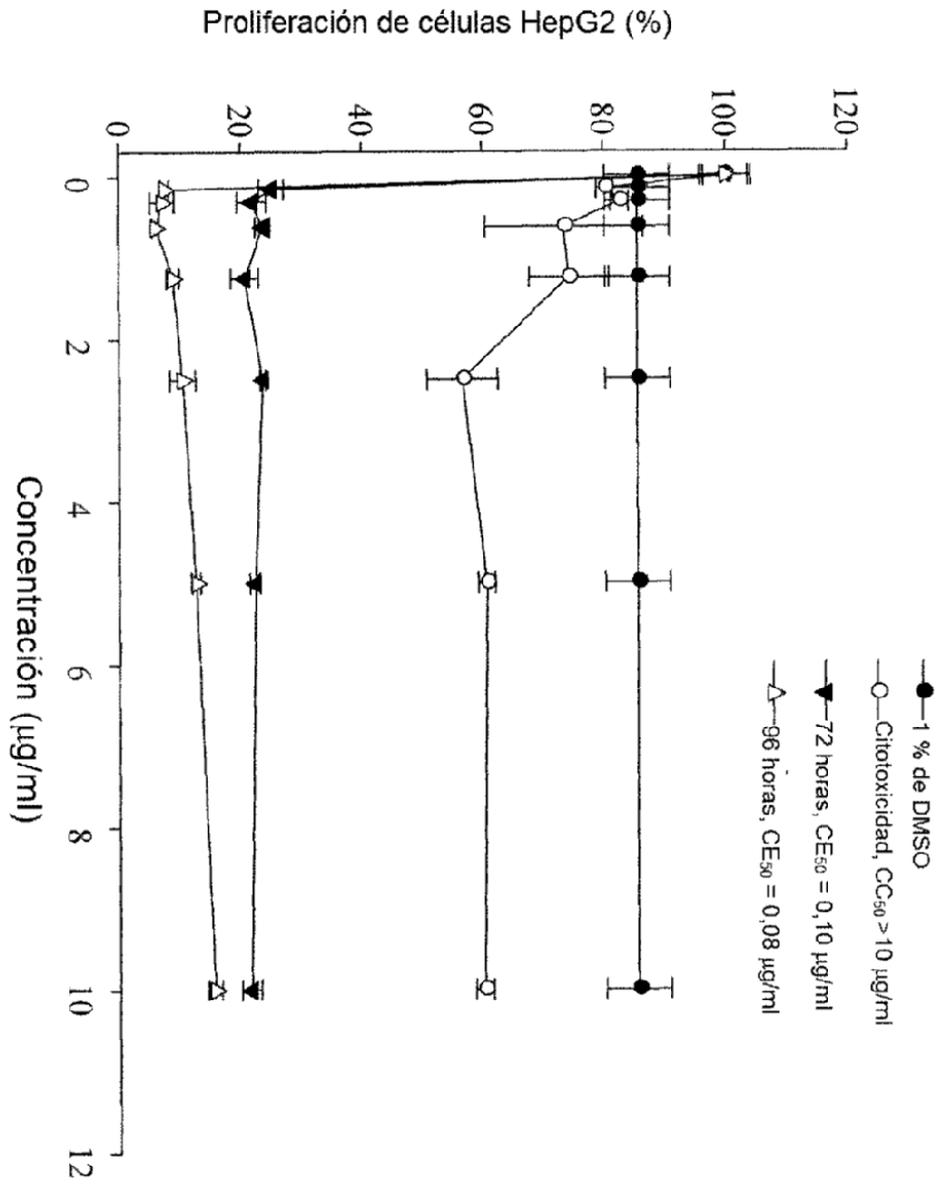


Fig. 3

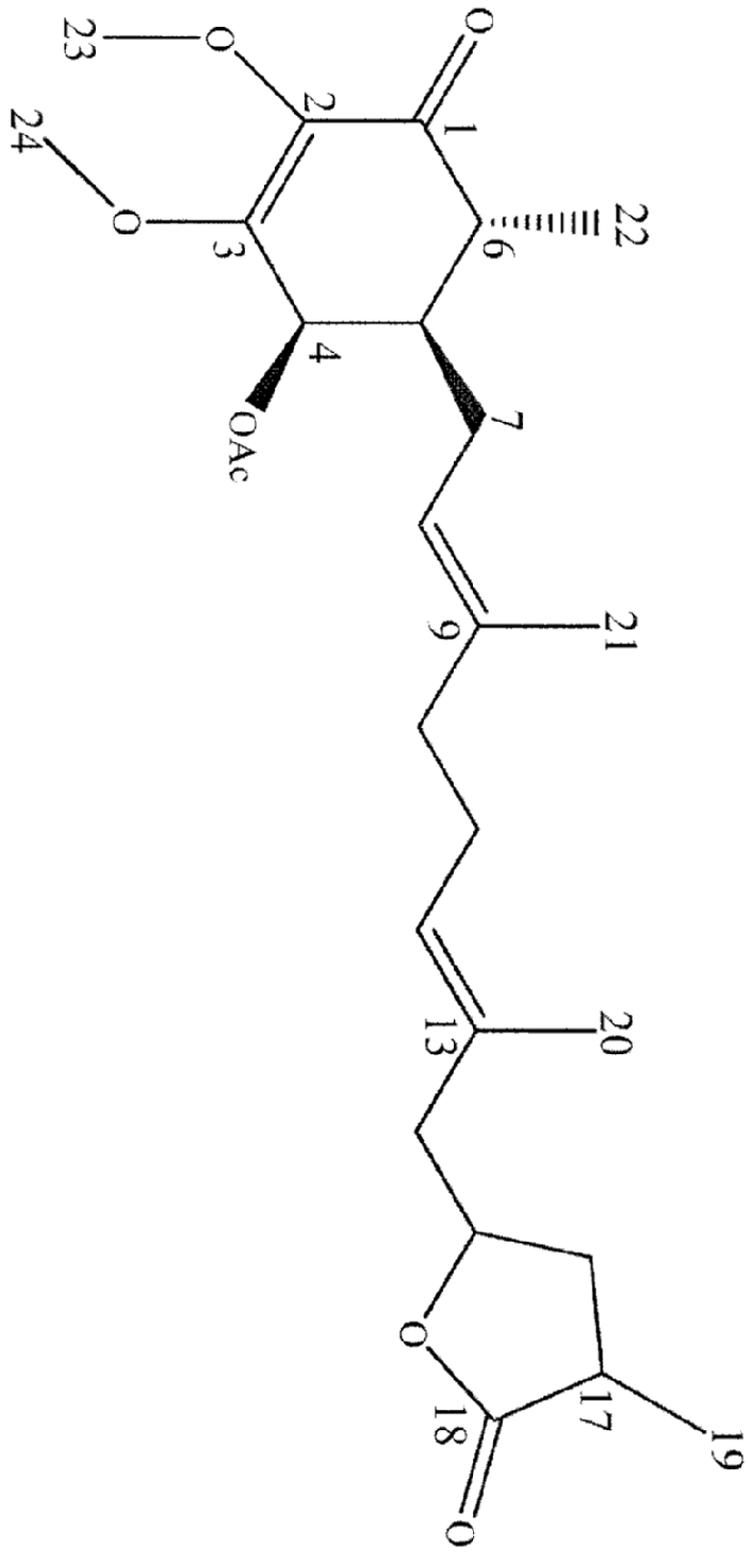


Fig. 4