



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 765**

51 Int. Cl.:
C07H 17/04 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01955626 .5**
96 Fecha de presentación : **09.08.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1298137**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2003**

54 Título: **Nueva sustancia que tiene actividad fisiológica, procedimiento de producción y uso de la misma.**

30 Prioridad: **08.02.2001 JP 2001-31852**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2011

73 Titular/es: **AMINO UP CHEMICAL Co. Ltd.**
High Tech Hill Shin-ei
363-32 Shin-ei, Kiyota-ku
Sapporo-shi, Hokkaido 004-0839, JP

72 Inventor/es: **Fujii, Hajime;**
Nakagawa, Takashi y
Sun, Buxiang

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 360 765 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

Nueva sustancia que tiene actividad fisiológica, procedimiento de producción y uso de la misma

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos glicosídicos, la sustancia fisiológicamente activa que los contiene como componentes activos, a un procedimiento para producirlos, y a sus usos. Más particularmente, la presente invención se refiere a glucósidos que contienen isomaltol como un aglicón, a sustancias fisiológicamente activas que contienen los glucósidos como componentes activos, a un procedimiento para producirlos y a sus usos.

Antecedentes de la técnica

10 Se sabe que los cultivos de basidiomicetes tienen propiedades de BRM (modificadores de la respuesta biológica) tales como inmunopotenciación, activación inmunológica o activación de macrófagos.

Asimismo los presentes inventores han presentado una solicitud de patente sobre un agente para recuperar la productividad de las citoquinas tales como interferón gamma de los monocitos humanos (IFN- γ), o interleuquina 12 (IL-12) por medio de un cultivo de basidiomicete (un hongo perteneciente a los Basidiomicetes) (Solicitud de patente japonesa No. Hei 11-283223).

15 Las actividades fisiológicas contenidas en tal cultivo de basidiomicete se ha desvelado en "Water-soluble lignin" (Publicación de Patente Japonesa Examinada No. Hei 6-88909), "Complex of cytokinin based active sustancia composed mainly of polysaccharide and zeatin-related substance" (Publicación de Patente Japonesa Examinada No. Sho 62-36009), nuevas sustancias de polisacáridos (Solicitud de Patente Japonesa Abierta a inspección Pública No. Hei 8-259602) y demás. Como se muestra en estas solicitudes, los cultivos de basidiomicete pueden contener varios tipos de sustancias fisiológicamente activas. Sin embargo, ninguna de la sustancia fisiológicamente activa ha sido identificada por la estructura de tal manera que su existencia se puede confirmar inequívocamente por análisis instrumental, en particular un procedimiento espectroscópico (que incluye resonancia magnética nuclear o similares).

20 En procedimientos convencionales, Se han usado materiales de tejido vegetal, de modo que los cultivos contienen varios tipos de sustancias orgánicas. Por otra parte, se dispone de poca información sobre la estructura de los compuestos diana. Esto hace difícil distinguir la fracción que contiene la sustancia diana por análisis instrumental aun cuando se usen medios de separación tales como cromatografía en columna. En consecuencia, ha sido difícil aislar y producir eficientemente el componente que tiene una excelente actividad fisiológica.

Objeto de la invención

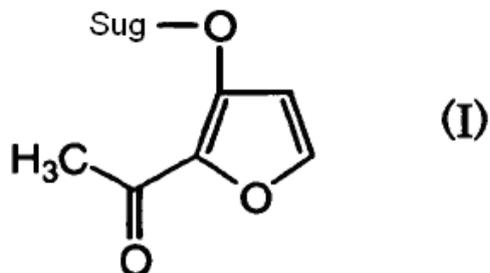
30 Es un objeto de la presente invención dilucidar la estructura de las principales sustancias entre los componentes que producen la actividad fisiológica contenida en los cultivos de basidiomicetes a las que los presentes inventores han prestado atención durante mucho tiempo, especificar las condiciones para producir la sustancia de modo eficiente y proporcionar usos tales como alimento, medicamento y productos alimenticios para animales utilizando la actividad fisiológica de la sustancia.

Divulgación de la invención

35 Los presentes inventores han realizado estudios intensivos con la idea de resolver los problemas mencionados anteriormente. Como resultado, hallaron que reacción de una solución de cultivo obtenida por cultivo preliminar de un basidiomicete con una mezcla de reacción obtenida por la reacción de extractos de salvado con una enzima origina una sustancia que tiene aumento de actividad fisiológica. Esto contrasta con el procedimiento de cultivo convencional del basidiomicete en un medio que contiene un material de tejido vegetal. Asimismo, los presentes inventores han identificado la sustancia. La presente invención se ha obtenido sobre la base de los descubrimientos.

40 Es decir, la presente invención se refiere a nuevas sustancias que tienen una actividad fisiológica, el procedimiento para producirías y su uso como se establece a continuación.

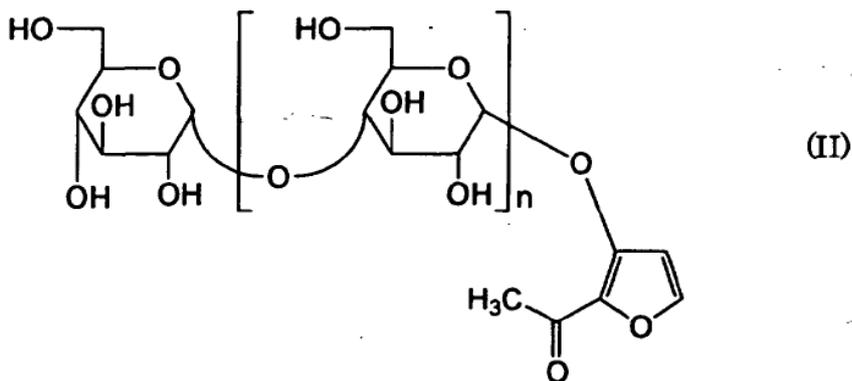
1. Un glucósido que contiene isomaltol representado por la fórmula



(I):

5 (en la que Sug representa un residuo de glucosa o una unión de azúcar compuesta de dos o más unidades de glucosa) como un aglicón.

2. Un glucósido de acuerdo con 1 anterior, representado por la fórmula (II):



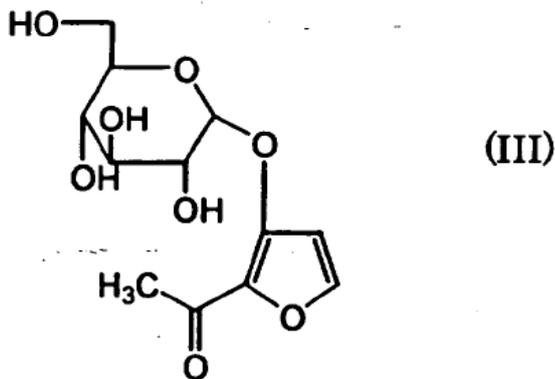
: (en la que n es 0 o un número entero de 1 o más).

3. Un glucósido de acuerdo con 2 anterior, en el que n es 1 a 20.

10 4. Un glucósido de acuerdo con cualquiera de 1 a 3 anterior, en el que el glucósido se obtiene por la reacción de una solución de cultivo obtenida por el cultivo de un basidiomicete con una mezcla de reacción de una solución de extractos de salvado de arroz y una enzima, y posteriormente aislar el glucósido por cromatografía en columna.

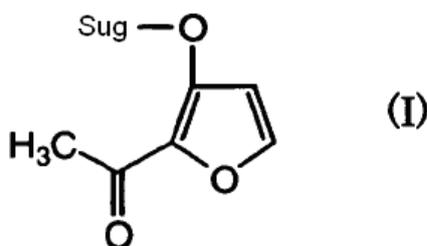
5. Un 2-acetil-3-hidroxifuran α -D-glucopiranosido representado por la fórmula (III): 4

40



que corresponde a la fórmula (II) en que n es 0.

6. Una sustancia fisiológicamente activa que comprende un glucósido de acuerdo con 1 o 2 anteriores como un componente activo.
- 5 7. La sustancia que tiene una actividad fisiológica de acuerdo con 6 anterior, en la que la actividad fisiológica aumenta la capacidad de inducir la citoquina humana.
8. La sustancia que tiene una actividad fisiológica de acuerdo con 7 anterior, en la que la citoquina es el factor de necrosis celular tumoral (TNF- α).
- 10 9. La sustancia que tiene una actividad fisiológica de acuerdo con 7 anterior, en el que la citoquina es interferón gamma (IFN- γ).
- 10 10. La sustancia que tiene una actividad fisiológica de acuerdo con 7 anterior, en la que la citoquina es interleuquina-2 (IL-2).
11. Un procedimiento para producir un glucósido representado por la fórmula (I):



- 15 (en la que los símbolos tienen los mismos significados que se definieron en 1 anterior) que tiene una actividad fisiológica, que comprende la etapa de hacer reaccionar una solución de cultivo obtenida por el cultivo de un basidiomicete con una mezcla obtenida por la reacción entre una solución de extractos de salvado de arroz y una enzima, y aislar el glucósido.
- 20 12. Un procedimiento para producir un glucósido representado por la fórmula (I) en 1 anterior que tiene una actividad fisiológica, que comprende las etapas de hacer reaccionar una solución de cultivo obtenida por el cultivo de un basidiomicete con una mezcla de reacción obtenida entre una solución de extractos de salvado de arroz y una enzima, y aislar el glucósido por cromatografía en columna usando como índice un componente que muestra (1) un pico atribuible a metil hidrógeno de metil cetona por espectro ¹H-RMN y un pico atribuible a átomos de hidrógeno en las posiciones 4,5 de un anillo furano 2,3-di-sustituido característico del sistema AB, y (2) 6 picos atribuibles a glucopiranososa y 6 picos atribuibles a isomaltol por ¹³C-RMN.
- 25 13. Un alimento que contiene una sustancia que tiene una actividad fisiológica de acuerdo con cualquiera de 6 a 10 anteriores.
14. Un medicamento que contiene una sustancia que tiene una actividad fisiológica de acuerdo con cualquiera de 6 a

10 anteriores.

15. Un producto alimenticio para animales que contiene una sustancia que tiene una actividad fisiológica de acuerdo con cualquiera de 6 a 10 anteriores.

Breve explicación de los dibujos

5 La Fig. 1 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la concentración de TNF- α en el sobrenadante de cultivo celular de bazo después de la administración de la sustancia A en la presente invención (compuesto de fórmula (III)), sustancia B en la presente invención (compuesto de fórmula (I)), y producto bruto de acuerdo con la presente invención (CR).

10 La Fig. 2 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la concentración de IFN- α en el sobrenadante del cultivo celular de bazo después de la administración de la sustancia de la invención A en la presente invención (compuesto de fórmula (III)), sustancia de invención B en la presente invención (compuesto de fórmula (I)), y producto bruto de acuerdo con la presente invención (CR).

15 La Fig. 3 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la concentración de IL-2 en el sobrenadante del cultivo celular de bazo después de la administración de la sustancia de la invención A en la presente invención (compuesto de fórmula (III)), sustancia de invención B en la presente invención (compuesto de fórmula (I)), y producto bruto de acuerdo con la presente invención (CR).

20 La Fig. 4 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la concentración de TNF- α en el sobrenadante del cultivo de macrófagos después de la administración de la sustancia A en la presente invención (compuesto de fórmula (III)), sustancia B en la presente invención (compuesto de fórmula (I)), y producto bruto de acuerdo con la presente invención (CR).

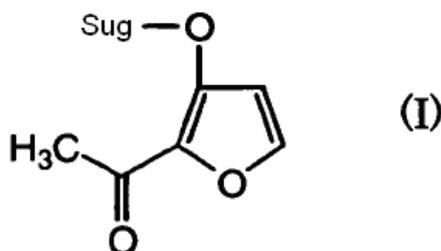
La Fig. 5 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la concentración de IFN- γ en el sobrenadante del cultivo de macrófagos después de la administración de la sustancia A en la presente invención (compuesto de fórmula (III)), sustancia B en la presente invención (compuesto de fórmula (I)), y producto bruto de acuerdo con la presente invención (CR).

Descripción detallada de la invención

De aquí en adelante, se describirá en detalle la presente invención

(A) Compuestos de glucósido

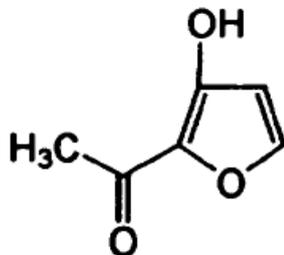
Los compuestos de glucósido de la presente invención son nuevos glucósidos que tienen isomaltol como un aglicón, representado por la fórmula (I)



30

obtenido por la reacción de una solución de cultivo obtenido por cultivar un basidiomicete con una mezcla de reacción obtenida por un extracto de salvado y una enzima (de aquí en adelante algunas veces abreviada como "mezcla de reacción de solución de extractos de salvado de arroz-enzima") y aislar por cromatografía en columna (los detalles se describirán a continuación en la presente).

El isomaltol es una sustancia representado por la fórmula:

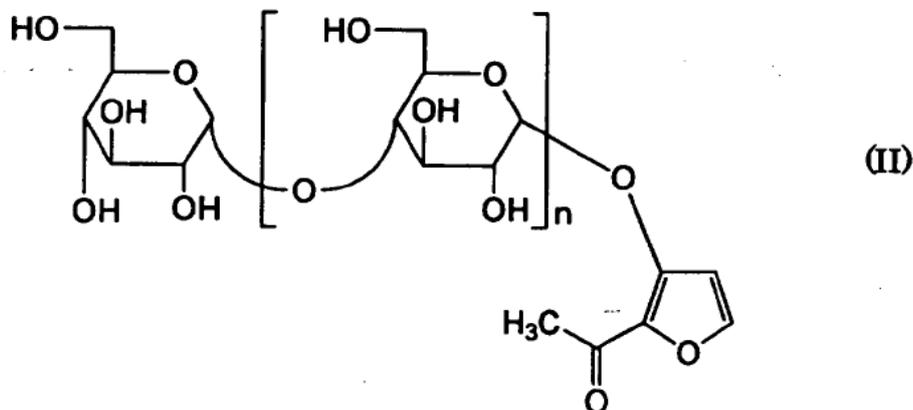


que es un componente de un perfume.

5 Del mismo modo que para el glicósido que tiene isomaltol como un aglicón, existe un ejemplo que se refiere al galactósido (glicósido cuyo resto de azúcar es galactosa (J. Bartulin et al., J. Heterocycle Chem., 29, 1017 (1992), "Syntheses of 2-Acetyl-3-hydroxy-1-n-propylpyrrole from Isomaltol and 1-n-Alkyl-3-hydroxi-2-methyl-4-pyridones from Maltol"). Sin embargo, no se ha realizado el informe sobre glicósido (que es un glicósido con el resto de azúcar compuesto de unidades de glucosa), y las funciones de tal glicósido no son conocidas.

10 En el caso cuando el azúcar contiene 2 o más unidades de glucosa, la longitud de la unión de azúcar no está particularmente limitada. De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, las mezclas de glicósidos con n que varía de 1 a 20 ocupan aproximadamente 10% del producto de reacción sólido. La unión de azúcar (azúcar) puede contener un enlace α (1 \rightarrow 6) u otros enlaces como parte de este. Asimismo puede contener una cadena ramificada. Sin embargo, es una unión de azúcar lineal que comprende principalmente enlaces α (1 \rightarrow 4).

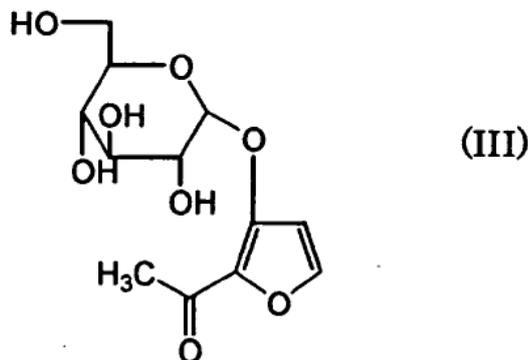
Una estructura típica del nuevo compuesto glicósido está representada por la fórmula (II):



15

(en la que n es 0 o un número entero de 1 o más).

Por ejemplo, el nuevo 2-acetil-3-hidroxifuran α -D-glucopiranosido representado por la fórmula (III):



que tiene una unidad de glucosa, que corresponde a la fórmula (II) anterior en la que n es 0, se puede aislar por el procedimiento de la presente invención o preparar por síntesis química. (B) Sustancia fisiológicamente activa 10

El nuevo compuesto glucósido de la presente invención mencionado antes tiene excelentes actividades fisiológicas.

- 5 Las actividades fisiológicas incluyen inmunopotenciación/activación, activación de macrófagos y propiedades similares, en particular el aumento de la capacidad de inducir la citoquina de las células humanas.

Los ejemplos de la citoquina inducida por la sustancia activa fisiológica de la presente invención incluyen factor de necrosis tumoral (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ), interleuquina-2 (IL-2) y demás. Sin embargo, no se limita a estos.

- 10 El factor de necrosis tumoral TNF- α es una proteína que tiene actividad de destrucción de las células tumorales y es una citoquina producida en forma sistémica o local en respuesta a la infección, herida o inducción inmunológica. El interferón (IFN) es una proteína antiviral producida después de recibir la estimulación por virus o ácido nucleico y se secreta fuera de las células. Se sabe que losinterferones exhiben no solo actividad antiviral sino también varias actividades tales como actividad antitumoral y activación de los sistemas inmunes. IFN- γ es producido por las células T y demás. La interleuquina-2 (IL-2) tiene efectos de degeneración o erradicación de tumores.
- 15

(C) Procedimientos de producción y aislamiento

- Los compuestos representados por la fórmula (I) anterior que tienen actividad fisiológica como se describió antes son sustancias nuevas que no aún no han sido informadas. Los presentes inventores han confirmado que los compuestos no están presentes en los cultivos del basidiomicete o en la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima, y que no se producen cuando se añade salvado de arroz al medio desde el comienzo del cultivo. Ellos también confirmaron que los compuestos solo se pueden producir en una solución obtenida por la reacción del cultivo de un basidiomicete con la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima.
- 20

- En forma convencional, el cultivo de un basidiomicete se ha realizado en medios que contienen materiales de tejido vegetal. Sin embargo, es inesperado que la reacción entre una solución de cultivo obtenida por cultivo preliminar del basidiomicete y una mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima puede originar sustancias que tienen actividades fisiológicas altas.
- 25

(C-1) Solución de cultivo de basidiomicete

- La solución de cultivo de basidiomicete usada en el procedimiento de producir las sustancias fisiológicamente activas de la presente invención es una solución de cultivo obtenida por el cultivo del basidiomicete en un medio líquido adecuado para su crecimiento.
- 30

Los ejemplos de fuente de carbono en el medio líquido incluyen glucosa, sucrosa, maltosa, sacarosa, azúcar blanca de alto grado, azúcar negra, melazas, melazas residuales, extractos de malta y demás.

- Los ejemplos de fuente de nitrógeno incluyen, extractos de carne, peptona, harina de gluten, polvo de soja, levadura seca, extractos de levadura, sulfato de amonio, tartrato de amonio, urea y demás. Además, también se pueden añadir opcionalmente sales inorgánicas tales como sales de sodio, sales de magnesio, sales de manganeso, sales de hierro, sales de calcio y sales de ácido fosfórico, vitaminas tales como inositol, clorhidrato de vitamina B1, L-asparagina, y biotina.
- 35

La composición del medio líquido preferido puede variar de acuerdo con la cepa de basidiomicete pero puede estar compuesta, por ejemplo, por extractos de malta (1 a 5%), extractos de levadura (0,1 a 0.5%), y tartrato de amonio (0,1 a 0,4%).

Los ejemplos del basidiomicete usado en la presente invención incluyen *Lentinum edodes*, *Agaricus bisporus*, *Grifola frondosa*, *Phoriota nameko*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Auricularia auricula*, *Ganoderma applanatum*, *Coriolus lucidum*, *Grifola umbellata*, *Shizophillum commune*, *Volvarellia volvaceae* y demás. Se prefiere particularmente *Lentinus edodes* y *Grifola frondosa*.

- 5 El cultivo se realiza de acuerdo con cultivo de aireación para microbios de temperatura media ordinaria, es decir, a pH 2 a 6 y a una temperatura de 10 a 45°C, preferentemente 15 a 30°C. El tiempo de cultivo puede variar de acuerdo con el tipo y cantidad del microbio y usualmente dura 4 a 20 días, preferentemente 6 a 12 días.

Después del cultivo, se realiza la separación sólido-líquido y los componentes líquidos se usan para la reacción posterior con la solución de extractos de salvado de arroz-mezcla de reacción de la enzima.

- 10 (C-2) Mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima

La solución de extractos de salvado de arroz es una solución acuosa obtenida por la agitación de una cierta cantidad de salvado de arroz en una cantidad equivalente o mayor (por ejemplo, 2 a 10 veces) de agua caliente. En esta ocasión, se prefiere usar agua presurizada a aproximadamente 105 a aproximadamente 130°C. Posteriormente, el salvado de arroz se hace reaccionar por la adición de un agente enzimático y se somete a separación sólido-líquido por medio de un decantador o similares para obtener una mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima.

Como agente enzimático, un carbohidrato hidrolasa tal como α -amilasa, celulasa o pectinasa se puede usar sola o en combinación de dos o más de ellas. Una enzima proteolítica tal como proteasa se puede usar en combinación. La reacción enzimática se realiza en condiciones en las que la actividad enzimática no se daña, es decir, a aproximadamente 40°C o más y aproximadamente 90°C o menos, preferentemente aproximadamente 40 a aproximadamente 70°C, durante aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas, preferentemente aproximadamente 3 a aproximadamente 12 horas.

(C-3) Reacción entre el medio de cultivo de basidiomicete y la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima

25 La reacción entre un cultivo de basidiomicete y una mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima se lleva a cabo preferentemente a 40°C o más y 90°C o menos y más preferentemente 40 a 70°C. Usualmente, ambos reactivos se mezclan y dejan reaccionar durante 8 a 24 horas. Posteriormente, el líquido total se calienta a 120°C o más bajo presión para inactivar las enzimas y similares en el líquido y opcionalmente se separa y purifica.

30 Los procedimientos de separación y purificación no son particularmente limitados y se pueden aplicar varios procedimientos de separación. Desde el punto de vista de la economía, se prefiere un procedimiento de cromatografía en columna.

En el caso de las sustancias fisiológicamente activas derivadas de basidiomicete convencionales, se han determinado selecciones de la constitución de la columna y el eluyente de una manera prueba y error por medio de reacciones de color o exámenes biológicos. Se dispone de reacciones de color que permiten interpretación ambigua o exámenes biológicos que llevan largo tiempo para juzgar a partir de pocos datos respecto de la estructura química del compuesto objetivo. En contraste, en la presente invención, la estructura química de la sustancia objetivo fisiológicamente activa ya está aclarada y la selección de la constitución de la columna y el eluyente se pueden realizar fácilmente de acuerdo con la hidrofiliidad, peso molecular y otras propiedades de la sustancia basada en la fórmula estructural. Además, las fracciones objetivo se pueden distinguir fácilmente por medio del uso de las siguientes características espectroscópicas como índices.

(1) El espectro ¹H-RMN muestra un pico atribuible al metil-hidrógeno de metilcetona y picos del sistema AB atribuibles a los átomos de hidrógeno en las posiciones 4,5 de un anillo furano 2,3-di-sustituido.

(2) El espectro ¹³C-RMN muestra 6 picos atribuibles a glucopiranososa y 6 picos atribuibles a isomaltosa.

45 El pico atribuible al metil-hidrógeno de metilcetona se halla cerca de δ 2,48 (3H, s). Los picos atribuibles a los átomos de hidrógeno de las posiciones 4,5 del anillo furano 2,3-di-sustituido se reconocen como sistema AB cerca de δ 6,78 y δ 7,67 (ambos valores se midieron en metanol deuterado).

Además, se puede hacer referencia a absorciones infrarroja a 3000 a 3700 cm^{-1} (grupo hidroxilo), 1660 cm^{-1} (grupo carbonilo conjugado) y 1584 cm^{-1} (enlace doble).

(E) Usos

5 La sustancia fisiológicamente activa de la presente invención usa materiales seguros que se han provisto convencionalmente como materiales comestibles (solución de extractos de salvado de arroz y medio de cultivo de basidiomicete comestible) y hay pocas posibilidades de contaminarse con los productos secundarios tóxicos. En consecuencia, la sustancia fisiológicamente activa de la presente invención misma se puede usar ampliamente como alimento saludable, medicamento, alimento de refuerzo, productos alimenticios para animales y demás.

10 Cuando se emplea para estos usos, por ejemplo, como un alimento natural, la sustancia fisiológicamente activa obtenida en el procedimiento anterior (C-3) se concentra o purifica de acuerdo con el propósito. La sustancia fisiológicamente activa de la presente invención es relativamente estable al calor. Sin embargo, se prefiere usar la liofilización para la concentración y el secado. La sustancia fisiológicamente activa de la presente invención se puede formular usando un aditivo alimentario, un excipiente o similares.

15 Los usos medicinales pueden incluir medicamentos para seres humanos y medicamentos para animales. Cuando los productos de la invención se administran como un medicamento, las sustancias fisiológicamente activas de la fórmula (I) anterior se pueden usar como tales o como una composición de medicamento obtenida por el añadido de esta a un portador inerte, no tóxico, que es farmacéuticamente aceptable. Como portador sólido, se usan diluyentes sólidos, semisólidos o líquidos, relleno y auxiliares para otras formulaciones y demás.

20 Los medicamentos se pueden administrar por administración intravenosa, administración oral, administración en tejido, administración tópica (administración percutánea, etc.) o administración perrectal. La formulación puede ser de cualquier forma adecuada para los procedimientos de administración posteriores.

Los usos como productos alimenticios para animales incluyen productos alimenticios para ganado vacuno y aves de corral tales como vacas, cerdos, gallinas y ovejas, productos alimenticios para cultivo de peces o crustáceos y productos alimenticios para mascotas tales como perros, gatos y otros.

25 En años recientes, pueden esperarse los efectos de minimizar los problemas causados por el uso de grandes cantidades de antibióticos, a los que se ha prestado atención en el campo de la cría de animales. Las anteriores sustancias fisiológicamente activas se pueden administrar por vía oral solas pero es preferente usarlas juntas con varios glicósidos, proteínas, lípidos, fibras, vitaminas, y minerales y demás como productos alimenticios para animales en la forma de polvos o pellets. Los tipos de lípidos y fibras no están particularmente limitados pero se puede usar cualquier sustancia como productos alimenticios, tales como pescado, polvo de hueso de carne, harina de soja, harina de alfalfa y salvado.

30

Mejor modo de llevar a cabo la invención

De aquí en adelante, la sustancia fisiológicamente activa de la presente invención se explicará en detalle con los ejemplos de producción y resultados del ensayo de actividad fisiológica.

35 Se realizaron ensayos de actividad fisiológica por la administración forzada de 1 g/kg de una muestra a ratones macho C57/BL6 de 6 semanas de edad durante 1 semana por vía oral. Las células de bazo y las células del exudado peritoneal (PEC) se recolectaron después de sacrificar los animales. Estas se cultivaron y analizaron para TNF- α , IFN- γ , e IL-2.

a) Cultivo de células del bazo

40 El bazo de ratón recolectado se homogenizó en medio DMEM y el homogenizado se centrifugó a 4°C (1000 rpm , 5 minutos). A esto se añadió buffer de lisis ASK y la mezcla se incubó (37°C , 3 minutos) a fin de extraer los eritrocitos, seguido por centrifugación (1000 rpm , 5 minutos). A las células del bazo así recolectadas se añadió ConA a una concentración final de $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ y se cultivó en una microplaca. Después de 15 horas, el sobrenadante del cultivo se recolectó para analizar TNF- α , IFN- γ , y IL-2.

45 b) Cultivo de PEC

Las PEC (células del exudado peritoneal) recolectadas de la cavidad abdominal de ratón con solución salina fisiológica se centrifugaron (1000 rpm , 10 minutos) para recolectar células, que se usaron como macrófagos. A los macrófagos se añadió LPS (lipopolisacárido) a una concentración final de 100 ng/ml y las células se cultivaron. Después de 4 horas, se analizaron TNF- α , IFN- γ , e IL-2 en el sobrenadante del cultivo.

50 Para ambos a) y b) anteriores, se usó un kit para analizar citoquina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Ejemplo 1: Confirmación de la sustancia activa fisiológica

En un medio líquido que tiene la composición que contiene extractos de malta (2%), extractos de levadura (0,25%) y tartrato de amonio (0,2%), se cultivó hongo Shiitake (Lentinus edodes) con aireación a 24°C durante 10 días para preparar una solución de cultivo de basidiomicete.

5 Por otra parte, se dispersó salvado de arroz en 5 veces (masa) de agua y se agitó a una temperatura del líquido de 120°C durante 20 minutos para efectuar la extracción. A partir de este momento, un agente enzimático compuesto de α -amilasa y pectinasa se añadió a este, y la reacción siguió a 60°C durante 120 minutos. Posteriormente, la mezcla de reacción se sometió a separación sólido-líquido y la porción líquida se recuperó para preparar una mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima.

10 Ni la solución de cultivo de basidiomicete ni la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima exhibieron ninguna actividad fisiológica.

15 Por otra parte, la solución de cultivo del basidiomicete y la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima obtenidas por los procedimientos anteriores se mezclaron juntas y la mezcla resultante se agitó a 60°C durante 20 horas para la reacción. Posteriormente, el líquido completo se calentó a 120°C o más durante 20 minutos para inactivar las enzimas y demás en el líquido, la mezcla de reacción se concentró y se eluyeron 80 ml de la mezcla de reacción (contenido de humedad: 75%) con metanol a través de una columna de 500 ml DIAION HP-20. Como resultado, se observó actividad fisiológica en el eluido. En consecuencia, este procedimiento se repitió dos veces para obtener una fracción marrón (5,6 g).

20 Además, la fracción se sometió a la detección de los componentes fisiológicamente activos por varios análisis cromatográficos en columna. Es decir, la fracción se sometió a cromatografía en gel de sílice (Kiesel, producido por Merck & Co., Inc., malla 125, 50 g) y posteriormente a cromatografía en columna de gel de fase inversa basada en ODS (aproximadamente 100 ml de volumen) para obtener el componente fisiológicamente activo en polvo blanco (40 mg).

La sustancia obtenida tenía las siguientes propiedades físicas.

25 (i) Espectrometría de masa (espectrometría de masa iónica secundaria (SIMS))

La medición de la ionización negativa mostró un pico de ion molecular a m/z : 287 y la medición de ionización positiva mostró un pico de ion molecular de m/z : 289. Como resultado, se halló que el peso molecular del presente compuesto es 288. Además, los resultados anteriores junto con los resultados de espectrometría de masa de alta resolución de estos picos de iones sugirieron que la fórmula molecular del compuesto debería ser $C_{12}H_{16}O_8$ (grado de insaturación: 5).

(ii) Espectro IR

Se observaron absorciones a 3000 a 3700 cm^{-1} atribuibles a un grupo hidroxilo, a 1660 cm^{-1} atribuible a un grupo carbonilo conjugado y a 1584 cm^{-1} atribuible a un enlace doble.

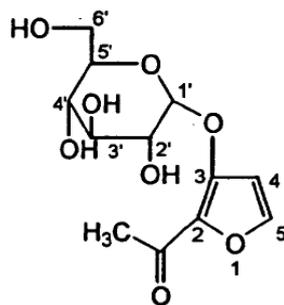
(iii) Espectro 1H -RMN (en metanol deuterado, 270 MHz)

35 Se observaron señales a δ 2,48 (3H, s) atribuibles a metil cetona y a δ 3,4-5,6 atribuible al anillo de α -D-glucopiranososa, así como picos a δ 6,78 y δ 7,67 atribuibles a un sistema AB que tiene una constante de acoplamiento de 1,99 Hz.

(iv) Espectro de ^{13}C -RMN (en metanol deuterado, 67,5 MHz, procedimiento de medición DEPT)

40 Se observaron doce (12) señales. Es decir, además de un grupo de seis señales atribuibles un anillo de α -D-glucopiranososa, se observaron seis señales atribuibles a restos aglicón a δ 27,4 (primario), δ 105,9 y 139,3 (cada uno es terciario), δ 148,5, 154,3, y 187,4 (cada uno es cuaternario).

45 El sistema AB de campo magnético bajo AB en 1H -RMN se considera que es característico de la señal de hidrógeno de las posiciones 4,5 del anillo furano 2,3-di-sustituido en vista de su constante de acoplamiento que es 1.9 Hz. El grado de insaturación de la fórmula molecular que es 5 corresponde a un anillo de piranososa, dos enlaces dobles, un grupo carbonilo y un anillo de furano. A partir de la información anterior, se confirmó que la sustancia obtenida es una nueva sustancia (2-acetil-3-hidroxifuran α -D-glucopiranosido, de aquí en adelante denominada como "sustancia A") representada por la siguiente fórmula.



Confirmación del procedimiento de producción de la sustancia A:

De la misma manera que se describió antes, se siguieron el aumento y descenso de la sustancia A que puede existir en la solución de cultivo de basidiomicete, mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima, la mezcla de reacción entre los dos anteriores y demás. Como resultado, se confirmó que la sustancia A se produjo solo en la mezcla de reacción entre la solución de cultivo de basidiomicete y la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima. No existió sustancia A en la solución de cultivo de basidiomicete 22 o en la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima. Se reveló que la sustancia A se produce solo por la reacción entre las dos.

10 **Ejemplo 2: Síntesis química de la sustancia A**

De acuerdo con el ejemplo de reacción en que el galactosilisomaltol se deriva químicamente de lactosa como material de partida como se desvela en J. Bartulin et al., J. Heterocycle Chem., 29, 1017 (1992), "Syntheses of 2-Acetyl-3-hydroxy-1-n-propylpyrrole from Isomaltol and 1-n-Alkyl-3-hydroxy-2-methyl-4-pyridones from Maltol," la sustancia A se derivó químicamente por medio del uso de maltosa en lugar de lactosa.

15 (a) Reacción de derivación química

En un matraz tipo berenjena de 50 ml, se pesaron 3.60 g (0,01 mol) de monohidrato de maltosa y se añadieron a este 3,0 ml de etanol anhidro. La mezcla se agitó vigorosamente con un agitador contenido en este para dispersar la maltosa. En esta ocasión, se mantuvo el estado en que una porción no disuelta de monohidrato de maltosa se agitó y dispersó en forma uniforme en todo el etanol anhidro sin localización. Mientras se agitaba vigorosamente la mezcla, se añadió 1,0 ml de piperidina y se mezcló uniformemente con este. Posteriormente, 0,44 ml de ácido acético se añadieron lentamente por goteo durante aproximadamente 15 minutos mediante una pipeta de medición. En un baño de aceite de silicona ajustado a 78°C, se colocó el matraz tipo berenjena equipado con un condensador de corriente de agua y se dejó proceder la reacción. Cuando el calor se distribuyó en todo el matraz y comenzó la ebullición en partes de este, se añadieron aproximadamente 0,5 ml de trietilamina. Después de la colocación del matraz, el monohidrato de maltosa comenzó a disolverse debido al calor y por consiguiente la solución se tornó de amarillo a marrón. Después de aproximadamente 12 horas, se añadió el mismo volumen que antes para mantener el líquido básico. Después de 24 horas, el matraz se sacó del aparato de reflujo y la temperatura del matraz volvió a temperatura ambiente antes de que pudiera proceder la operación de purificación. Posteriormente el producto de reacción fue una sustancia de naturaleza tipo alquitrán marrón intenso.

30 El producto de reacción se sometió a análisis de TLC por medio del uso de una placa de gel de sílice con un disolvente (solución mixta cloroformo/metanol/ agua (65:25:4)). Como resultado, se observó una mancha que tiene una absorción cuando se irradia con rayos ultravioleta con una longitud de onda principal de 254 nm en el mismo valor de R_f (aproximadamente 0,5) que la sustancia A. Cuando se roció con un reactivo de coloración de anisaldehído-ácido sulfúrico y se calentó, la mancha se tornó amarilla y posteriormente azul intenso.

35 (b) Purificación

(b-1) Purificación bruta con gel LH-20

Un volumen necesario de gel LH-20 se pasó en forma preliminar a través de metanol/agua (1:2) para equilibrarlo y se cargó la mezcla de reacción mezclada con una cantidad mínima del mismo disolvente. La mezcla de reacción se desarrolló y fraccionó con el mismo disolvente y las fracciones que contienen el compuesto objetivo se combinaron.

40 La fracción obtenida se evaporó y concentró a sequedad para obtener una sustancia oleosa marrón (0,49 g).

(b-2) Purificación por cromatografía en gel de sílice en columna

La muestra se cargó y desarrolló en una columna preparada por medio de gel de sílice de aproximadamente 200 de

mallá en una cantidad de 20 a 30 veces el peso de la muestra. Se realizó nuevamente la cromatografía con acetato de etilo saturado en agua/ metanol (3:1) y posteriormente se cromatografió de nuevo con una solución mixta de cloroformo/metanol/agua (se añadió una cantidad de saturación de agua a 4:1 cloroformo/metanol). La fracción purificada se evaporó y concentró a sequedad para obtener una sustancia resinosa amarilla (0,49 g).

5 (b-3) Cristalización

La sustancia amarilla resinosa se cristalizó en metanol para obtener cristales aciculares incoloros (0,37 g).

La sustancia así obtenida mostró el mismo comportamiento en la cromatografía y espectro RMN que el de la sustancia A.

Ejemplo 3

10 La existencia de la sustancia A en la mezcla de reacción entre la solución de cultivo de basidiomicete y la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima sugirió la posibilidad de que la sustancia fisiológicamente activa en la solución de cultivo de basidiomicete pudiera comprender glucósidos que tienen estructuras de isomaltol en sus extremos terminales con las uniones de azúcar de longitudes diferentes.

15 Por consiguiente, la solución de cultivo de basidiomicete y la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima se prepararon por los mismos procedimientos que en el Ejemplo 1 y se hicieron reaccionar a 60°C durante 20 horas por agitación. Posteriormente la mezcla de reacción completa se calentó a 120°C o más durante 20 minutos para inactivar las enzimas y demás en la mezcla de reacción. A partir de este momento, se buscaron los componentes efectivos que tienen pesos moleculares superiores por medio de las siguientes características espectroscópicas como índices.

20 (a) el espectro ¹H-RMN muestra un pico atribuible a metil hidrógeno de metil cetona y un pico del sistema AB atribuible a átomos de hidrógeno de las posiciones 4, 5 de un anillo furano 2,3-di-sustituido, y

(b) el espectro de ¹³C-RMN muestra 6 picos atribuibles a glucopiranososa y 6 picos atribuibles a isomaltol.

Más particularmente, en una columna para cromatografía (DIAION HP- 20, volumen: aproximadamente 500 ml) se cargaron 80 ml (20 g como sólidos) del concentrado anterior y posteriormente se eluyó con 1,5 litros de agua. El eluato se secó al vacío para obtener 18 g de polvo. Esta fracción se disolvió en 45 ml de agua y la solución obtenida se dispuso en dos tubos de centrifuga cada una en cantidad de 22,5 ml. Mientras se agitaba cada solución, un volumen de 4 veces, es decir, 90 ml de etanol se añadió lentamente a cada solución, que posteriormente se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se combinaron, concentraron y secaron por congelación para obtener polvo (12 g). El polvo se disolvió en 50 ml de agua y la solución se purificó a través de la cromatografía en columna (DOWEX 50W- X8 (tipo H+)). Se purificaron posteriormente 10,8 g de la porción eluida con agua a través de una cromatografía en columna (AMBERLITE IRA-400 (tipo CO₃²⁻)), se concentraron y secaron por congelación para obtener 8,64 g de polvo eluido con agua. Esto se purificó adicionalmente a través de una cromatografía en columna (SEPHADEX G-15) para obtener 2,16 g de un componente que satisface los requerimientos (a) y (b) anteriores.

35 La sustancia obtenida tenía las siguientes propiedades físicas

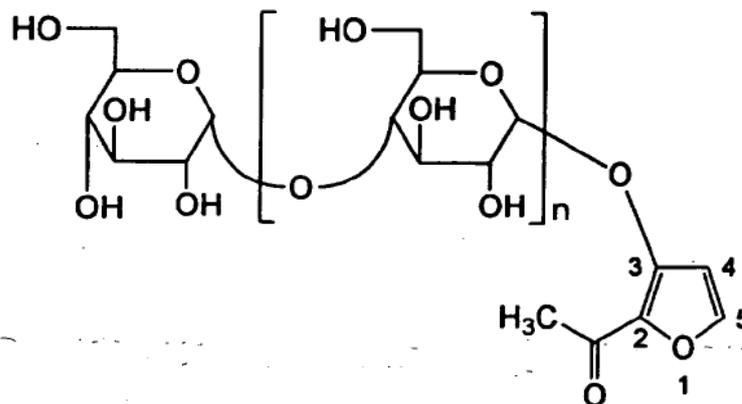
(i) espectro ¹H-RMN (en agua deuterada, 270 MHz)

Se detectaron señales de protón de ancho débil que se presumen atribuibles al sistema AB en un anillo de furano a δ6,85 y δ7,35.

(iv) espectro de ¹³C-RMN (en agua deuterada)

40 Se observaron señales de protón de ancho débil que se presume atribuibles al a isomaltol a δ 26 (-C(O)CH₃), 111 (C-4), 141 (C-3), 145 (C-5), y 188 (-C(O)-).

A partir de lo anterior, se presume que la sustancia obtenida tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



Esta sustancia (de aquí en adelante denominada como "sustancia B") es una mezcla de compuestos entre isomaltol y oligosacáridos (compuestos de moléculas de D-glucosa con diferentes grados de polimerización) (en la fórmula general anterior (II), $n=2$ a 20). Tiene un peso molecular promedio de 850 obtenido sobre la base de una curva de calibración preparada por adelantado. Los oligosacáridos incluyen principalmente moléculas de glucosa con enlaces α -1,4-glicósido y parcialmente aquellas con enlaces α -1,6 u otros enlaces.

De la misma manera que en el Ejemplo 1 (2), se siguieron el ascenso y descenso de la sustancia B que existiría en la solución de cultivo de basidiomicete, mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima, la mezcla de reacción entre los dos anteriores y demás. Como resultado, se confirmó que la sustancia B fue producida solo en la mezcla de reacción entre la solución de cultivo de basidiomicete y la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima. No existió sustancia B en la solución de cultivo de basidiomicete o en la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima. Se reveló que la sustancia B no se produce antes que ambos puedan reaccionar. Como se mostrará en el Ejemplo 4, se confirmó que la sustancia B tiene una actividad fisiológica.

Ejemplo 4

Se compararon las actividades fisiológicas de la sustancia A obtenida en el Ejemplo 1 y la sustancia B obtenida en el Ejemplo 3.

Las Fig. 1 a 3 ilustran los resultados de la medición de las concentraciones de citoquinas (TNF- α , IFN- γ e IL-2) en el sobrenadante de un cultivo celular de bazo después de la administración de la sustancia A, sustancia B y concentrado bruto. Las Fig. 5 y 6 ilustran concentraciones de citoquinas (TNF- α y IFN- γ) en el sobrenadante de un cultivo de macrófagos. Como resultado, se reveló que la sustancia A mostró capacidad de inducción de citoquinas considerable y la sustancia B mostró efectos superiores en la capacidad de inducción de IFN- γ en el concentrado bruto.

Respecto de los macrófagos, se observó que la sustancia A tuvo capacidad de inducción de citoquina alta.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, se halló que el componente que tiene una actividad fisiológica fuerte contenido en una cantidad de aproximadamente 10% en el polvo obtenido por concentración a sequedad de la mezcla de reacción entre la solución de cultivo de basidiomicete y la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima incluye una serie de compuestos que tienen una estructura de glucósido que contiene isomaltol como un aglicón. Los compuestos se pueden purificar de modo de tener una pureza alta por un medio convencional tal como cromatografía en columna por medio del uso de características espectroscópicas como índices.

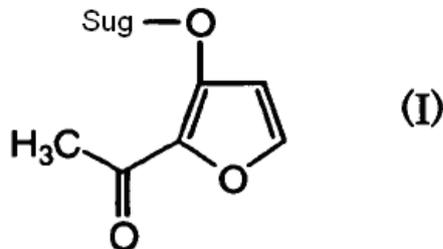
En consecuencia, de acuerdo con la presente invención, es posible obtener una sustancia fisiológicamente activa con menos contaminación en comparación con el procedimiento convencional para producir una sustancia fisiológicamente activa derivada de un cultivo de basidiomicete que usa un material de tejido vegetal. El producto es útil como alimento, productos alimenticios para animales y medicamento.

Los glicósidos que son las sustancias fisiológicamente activas de la presente invención no están contenidos en las soluciones de cultivo de basidiomicetes. Estos no se producen solo por la reacción de los extractos de salvado de arroz con una enzima. La reacción entre la solución de cultivo de basidiomicete y la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima es indispensable.

5 A partir de lo anterior, la sustancia A se puede utilizar como un componente de índice para un procedimiento para producir medicamentos y para el manejo de la producción de este. Es decir, cuando se detecta la sustancia A, se puede suponer que la reacción entre el basidiomicete y la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima se usa para producir tales productos. La cantidad de producción de la sustancia A puede variar de acuerdo con el procedimiento y las condiciones para cultivar un basidiomicete, condiciones para preparar la mezcla de reacción solución de extractos de salvado de arroz-enzima (clase de enzima usada, condiciones de la reacción enzimática y demás), condiciones para la reacción entre los dos. Sin embargo, el manejo de la producción para las nuevas sustancias que tengan una actividad fisiológica de la presente invención se puede realizar por medio de la sustancia A como un índice.

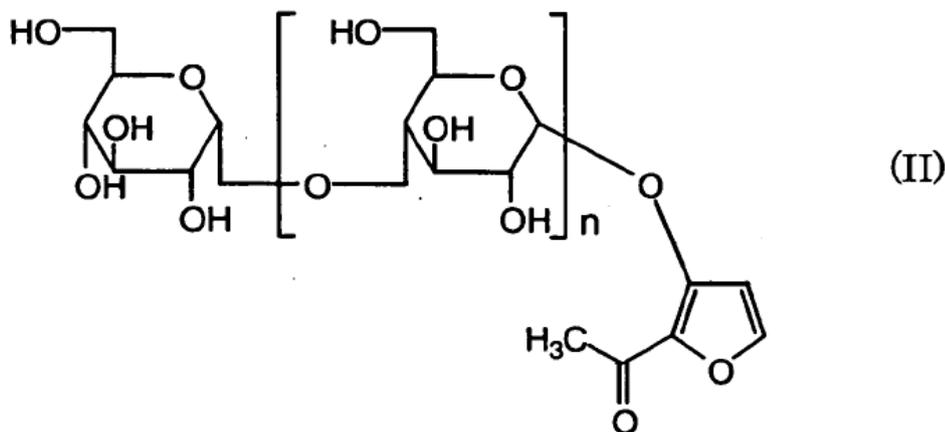
REIVINDICACIONES

1. Un glucósido que contiene isomaltol representado por la fórmula (I):



(en la que Sug representa una unión de azúcar compuesta de dos o más unidades de glucosa) como un aglicón.

2. Un glucósido de acuerdo con la reivindicación 1, representado por la fórmula (II):



5

(en la que n es un número entero de 1 o más).

3. Un glucósido de acuerdo con la reivindicación 2, en el que n es 1 a 20.

4. Un glucósido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho glucósido se obtiene por la reacción de una solución de cultivo obtenida por cultivar un basidiomicete con una mezcla de reacción de una solución de extractos de salvado de arroz y una enzima, y después aislando dicho glucósido por cromatografía en columna.

5. Una sustancia fisiológicamente activa que comprende un glucósido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 como un componente activo.

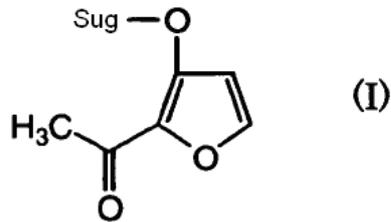
6. La sustancia que tiene una actividad fisiológica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicha actividad fisiológica es una actividad de aumentar la capacidad de inducir citoquina humana.

7. La sustancia que tiene una actividad fisiológica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicha citoquina es el factor de necrosis de células tumorales (TNF- α).

8. La sustancia que tiene una actividad fisiológica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicha citoquina es interferón gamma (IFN- γ).

9. La sustancia que tiene una actividad fisiológica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicha citoquina es interleuquina-2 (IL-2).

10. Un procedimiento para producir un glucósido representado por la fórmula (I):



- 5 (en la que los símbolos tienen los mismos significados definidos en la reivindicación 1) que tiene una actividad fisiológica, que comprende la etapa de hacer reaccionar una solución de cultivo obtenida por el cultivo de un basidiomicete con una mezcla de reacción obtenida por la reacción entre una solución de extractos de salvado de arroz y una enzima.
- 10 11. El procedimiento de la reivindicación 10 que además comprende aislar el glucósido por cromatografía en columna usando como un índice un componente que muestra (1) un pico atribuible a metil hidrógeno de metil cetona por espectro $^1\text{H-RMN}$ y un pico atribuible a átomos de hidrógeno en las posiciones 4,5 de un anillo furano 2,3-disustituido característico del sistema AB, y (2) 6 picos atribuibles a glucopiranososa y 6 picos atribuibles a isomaltol por $^{13}\text{C-RMN}$.
12. Un alimento que contiene una sustancia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.
13. Un medicamento que contiene una sustancia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.
14. Un producto alimenticio para animales que contiene una sustancia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.

Fig. 1

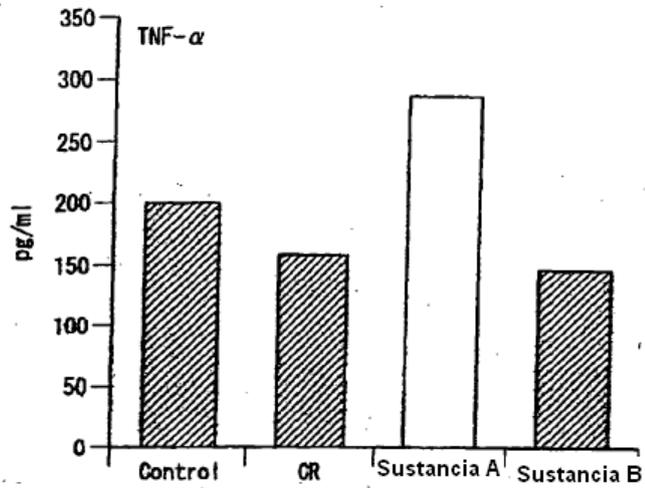


Fig. 2

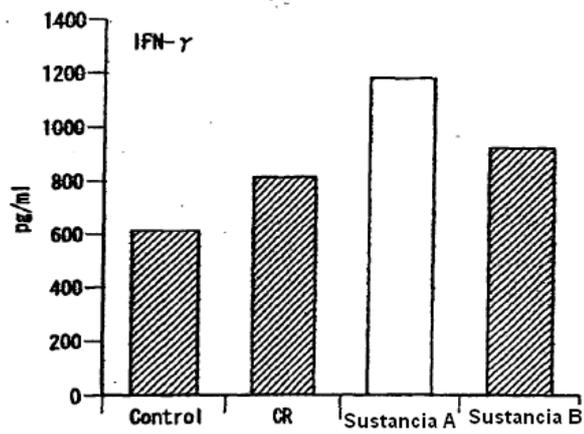


Fig. 3

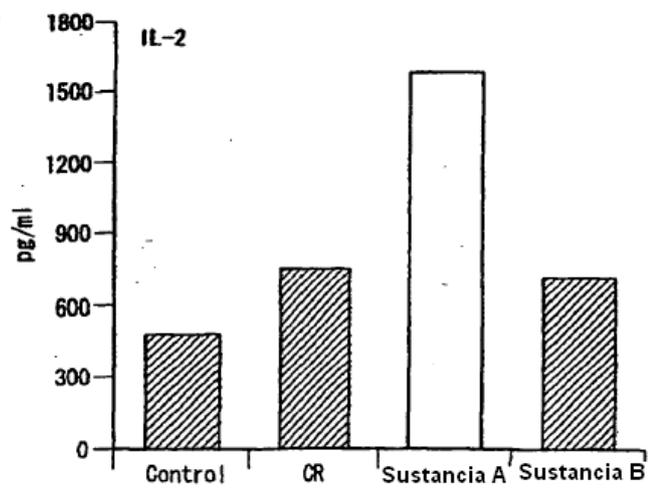


Fig. 4

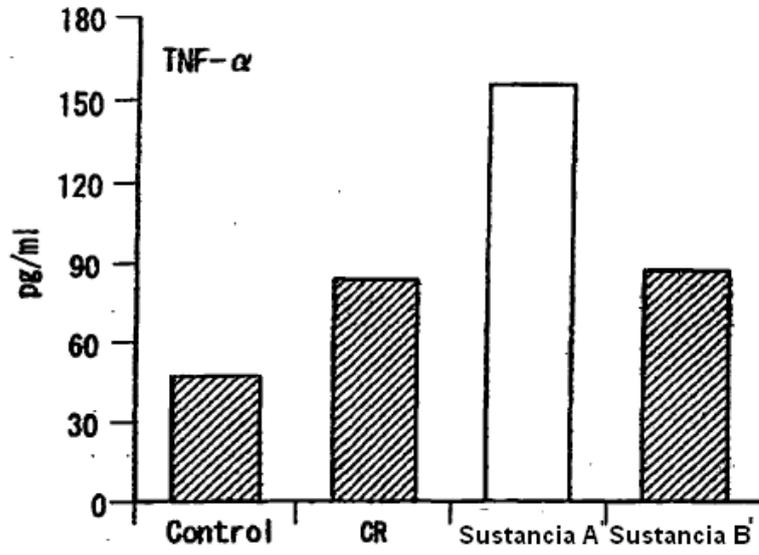


Fig. 5

