

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 716**

51 Int. Cl.:

C07D 307/48	(2006.01) A61P 25/02	(2006.01)
C07D 307/50	(2006.01) A61P 25/18	(2006.01)
C07D 405/12	(2006.01) A61P 43/00	(2006.01)
A23L 33/105	(2006.01) C12N 15/09	(2006.01)
A61K 31/341	(2006.01) C12Q 1/68	(2008.01)
A61K 31/4025	(2006.01)	
A61K 36/00	(2006.01)	
A61K 36/896	(2006.01)	
A61K 36/8965	(2006.01)	
A61P 25/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012** **PCT/JP2012/083040**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013** **WO13094676**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012** **E 12860350 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019** **EP 2796453**

54 Título: **Derivado de hidroximetilfurfural**

30 Prioridad:

20.12.2011 JP 2011277926

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

20.02.2020

73 Titular/es:

AMINO UP CO., LTD. (100.0%)
363-32, Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo-shi
Hokkaido 004-0839, JP

72 Inventor/es:

NISHIOKA, HIROSHI;
ITO, TOMOHIRO y
MAEDA, TAKAHIRO

74 Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

ES 2 743 716 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

Derivado de hidroximetilfurfural

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a derivados de hidroximetilfurfural, farmacéuticos, reguladores del sistema nervioso autónomo y métodos para elaborar el derivado de hidroximetilfurfural.

Antecedentes de la técnica

10 Las personas hoy en día están expuestas a largas horas de trabajo, diversos entornos de estrés físico y mental, o similares; y muchas de estas personas se quejan de síntomas físicos como pérdida de apetito, trastornos del sueño, mareos o sudor frío, o síntomas mentales como odio o desconfianza hacia otras personas, inestabilidad emocional, estado de irritación o depresión, aunque no se encuentre ninguna anomalía cuando se realizan análisis tales como un chequeo físico. Los síntomas asociados con tales quejas no identificadas a menudo se diagnostican como disautonomía. En las
15 circunstancias actuales, dicha disautonomía generalmente se trata con una terapia farmacológica, ya sea como un tranquilizante menor o bien un agente hormonal, tratamientos por dieta, cambios en el estilo de vida, tales como haciendo ejercicio o similares.

Es sabido que los trastornos del sistema nervioso autónomos, incluida la disautonomía descritos anteriormente, son producidos por cargas excesivas de estrés. En el trastorno del sistema nervioso
20 autónomo, se observa una alteración en el equilibrio entre los nervios simpáticos y los nervios parasimpáticos (el equilibrio de los nervios autónomos), una disminuida actividad de los nervios autónomos o similar. La alteración en el equilibrio de los nervios autónomos implica un estado con mayor actividad de los nervios simpáticos o un estado con mayor actividad de los nervios parasimpáticos. Además, es sabido que la capacidad para lidiar con el estrés disminuye cuando existe
25 una actividad disminuida de los nervios autónomos. Por ejemplo, debido a que las funciones del tracto gastrointestinal están inervadas principalmente por el nervio parasimpático, el tono prolongado de los nervios simpáticos debido a cargas de estrés suprime la función del tracto gastrointestinal, lo que tiene como resultado trastornos gastrointestinales como son la pérdida de apetito o el estreñimiento. Además, se cree que cuando los nervios parasimpáticos no funcionan bien debido a
30 una gran carga de estrés y la actividad de los nervios simpáticos permanece elevada, se producen alteraciones del sueño.

Si bien, como se ha descrito anteriormente, existe una estrecha relación entre el estrés y los trastornos del sistema nervioso autónomo, existiendo también trastornos del sistema nervioso autónomo que no son causados por una gran carga de estrés. Además, la carga de estrés no
35 necesariamente provoca el trastorno del sistema nervioso autónomo y en algunos casos puede producir otros síntomas físicos.

Como una de las proteínas llamadas proteínas de estrés, existen proteínas de choque térmico (en lo sucesivo, denominadas HSP). Las HSP son proteínas con un peso molecular de aproximadamente
40 varias decenas de miles a ciento cincuenta mil y se dividen en varias familias en función de su peso molecular (HSP10, HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110 y similares). Las HSP son un grupo de proteínas que son inducidas dentro de las células cuando los organismos vivos sufren estrés físico, químico, fisiológico o mental. Concretamente, las HSP tienen el papel de proteger a las células, exhibiendo una mayor expresión cuando los organismos vivos están expuestos a diversas condiciones, tales como el calor, infección bacteriana, inflamación, especies reactivas de oxígeno,
45 rayos ultravioletas, inanición e hipoxia. Además, las HSP también tienen funciones como chaperonas moleculares, incluido el control del plegado de las proteínas y la inhibición de la agregación de las proteínas anormales.

Entre las HSP, la HSP70 ha sido estudiada activamente en particular, y se ha descrito que se ha expresado constitutivamente en muchos órganos internos, incluidos el tracto gastrointestinal y la piel.
50 Recientemente, se ha reconocido la acción antiapoptótica y la acción antiinflamatoria de la HSP70 y se ha descrito el efecto de protección celular de la HSP70 contra diversas formas de estrés (Literatura no de patentes 1 a 4). Debido a esto, se han llevado a cabo estudios que intentan aplicar materiales con actividades inductoras de HSP70 en productos farmacéuticos, cosméticos o similares. Cuando se trata de materias derivadas de productos naturales con la actividad inductora de HSP70, se ha
55 descrito la paeoniflorina, que es un componente principal de *Paeoniae radix* (Literatura no de patentes 5).

El espárrago es un vegetal que se cultiva y cosecha en varias regiones, incluida la región de Hokkaido en Japón. Se ha descubierto que el espárrago presenta varias actividades biológicas. La Literatura de patentes 1 describe que un extracto de tallo de espárrago tiene efectos preventivos y restauradores
60 para varios tipos de fatiga (tal como la fatiga física o fatiga debido al estrés mental). Además, la Literatura de patentes 2 describe que un extracto de tallo de espárrago posee un efecto de mejorar las

funciones cerebrales. Además, la Literatura de patentes 3 describe que un extracto de pseudohoja de espárrago posee un efecto de controlar el sistema nervioso autonómico.

Literatura citada

Literatura de patentes

5 Literatura de patentes 1: Solicitud de patente japonesa no examinada Publicación Kokai N.º 2007-45750

Literatura de patentes 2: Solicitud de patente japonesa no examinada Publicación Kokai N.º 2007-230870

10 Literatura de patentes 3: Solicitud de patente japonesa no examinada Publicación N.º 2011-153125

Literatura no de patentes

Literatura no de patentes 1: Xiao-Rong Chang et al, World J Gastroenterol; 13(32):4355-4359 (2007)

Literatura no de patentes 2: Sarah M. et al, FASEB J. 22, 3836-3845 (2008)

15 Literatura no de patentes 3: Hirata I et al, Digestion; 79(4):243-50 (2009)

Literatura no de patentes 4: Tadashi Nishida et al, Journal of clinical biochemistry and nutrition; 46(1):43-51 (2010)

Literatura no de patentes 5: Dai Yan et al, Cell Stress & Chaperones; 9(4), 378-389 (2004).

Resumen de la invención

20 Problema técnico

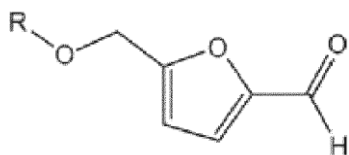
Sin embargo, hasta ahora no ha habido ninguna publicación relacionada con a los componentes de los extractos de espárrago ni con los productos obtenidos al procesar los espárragos, y cuyos componentes están implicados en un efecto antiestrés y un efecto regulador del sistema nervioso autonómico.

25 Los presentes inventores descubrieron un nuevo derivado de hidroximetilfurfural derivado de un producto obtenido por tratamiento térmico del espárrago con agua caliente, y descubrieron que dicho derivado de hidroximetilfurfural posee una excelente actividad inductora de las HSP, efecto antiestrés y efecto regulador del sistema nervioso autonómico, perfeccionando así la presente invención. Un objetivo de la invención es proporcionar un nuevo derivado de hidroximetilfurfural, un producto farmacéutico regulador del sistema nervioso autonómico altamente eficaz. Además, es un objetivo proporcionar un método para fabricar un derivado de hidroximetilfurfural que pueda reducir el costo y sea simple y conveniente.

30 Solución al problema

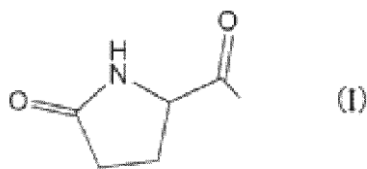
Para lograr el anterior objetivo, un derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con un primer punto de vista de la presente invención está representado por la formula general

[FÓRMULA 1]



40 en la que R posee la siguiente fórmula (I),

[FÓRMULA 2]



El derivado de hidroximetilfurfural mencionado anteriormente se puede obtener mediante tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente.

45 Un producto farmacéutico de acuerdo con un segundo punto de vista de la presente invención presenta tiene el derivado de hidroximetilfurfural mencionado anteriormente como un componente activo.

Un regulador del sistema nervioso autonómico de acuerdo con la presente invención presenta el derivado de hidroximetilfurfural mencionado anteriormente como un componente activo.

50 Un método para producir un derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la presente invención se caracteriza por comprender la etapa de tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua

caliente.

El método de producción mencionado anteriormente puede comprender la etapa de un tratamiento enzimático.

5 Un regulador del sistema nervioso autónomo de acuerdo con la presente invención posee un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente como componente activo.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con la presente invención, se puede producir un nuevo derivado de hidroximetilfurfural, un producto farmacéutico regulador del sistema nervioso autónomo altamente eficaz. Además, se
10 puede elaborar un método para producir un derivado de hidroximetilfurfural que puede reducir el costo y es simple y conveniente.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una figura que muestra la actividad inductora de la expresión del ARNm de HSP70 por un derivado de hidroximetilfurfural;

15 La FIG. 2 es una figura que muestra las actividades inductoras de la expresión del ARNm de HSP70 por hidroximetilfurfural, un producto obtenido mediante tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente, y un producto obtenido mediante tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático;

20 La FIG. 3 es una figura que muestra las actividades inductoras de la expresión de la proteína HSP70 por hidroximetilfurfural, un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente, y un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático;

25 La FIG. 4 es una figura que muestra los cambios en los niveles de peróxido de lípidos en el suero sanguíneo tras la administración de un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente en un modelo vivo de ratón con privación del sueño;

La FIG. 5 es una figura que muestra cambios en la concentración de corticosterona en la sangre tras la administración de un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente en un modelo vivo de ratón con privación del sueño;

30 La FIG. 6 es una figura que muestra cambios en la tasa de incidencia de pérdida de pelo tras la administración de un producto obtenido mediante tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente en un modelo vivo de ratón con privación del sueño;

35 La FIG. 7 es una figura que muestra cambios en el nivel de expresión de la proteína HSP70 tras la administración de un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente en el estómago de un modelo vivo de ratón con privación del sueño;

La FIG. 8 es una figura que muestra cambios en el nivel de expresión de la proteína HSP70 tras la administración de un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente en el hígado de un modelo vivo de ratón con privación del sueño;

40 La FIG. 9 es una figura que muestra cambios en el nivel de expresión de la proteína HSP70 tras la administración de un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente en el riñón de un modelo vivo de ratón con privación del sueño;

La FIG. 10 es una figura que muestra cambios en el nivel de expresión del ARNm de HSP70 tras la administración de un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente en un ser humano;

45 La FIG. 11 es una figura que muestra cambios en el equilibrio del sistema nervioso autónomo tras la administración de un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente en un ser humano;

50 La FIG. 12 es una figura que muestra cambios en la actividad del sistema nervioso autónomo tras la administración de un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente en un ser humano;

La FIG. 13 es una figura que muestra cambios en el nivel de expresión del ARNm de HSP70 tras la administración de un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático en un ser humano;

55 La FIG. 14 es una figura que muestra cambios en el equilibrio del sistema nervioso autónomo tras la administración de un producto obtenido mediante tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático en un ser humano; y

60 La FIG. 15 es una figura que muestra cambios en una actividad del sistema nervioso autónomo tras la administración de un producto obtenido mediante tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático en un ser humano.

Descripción de las realizaciones

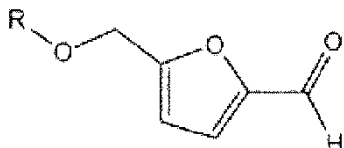
Las realizaciones de la presente invención serán descritas en detalle a continuación.

(1. Derivado de hidroximetilfurfural)

El derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la presente invención está representado por la siguiente fórmula general.

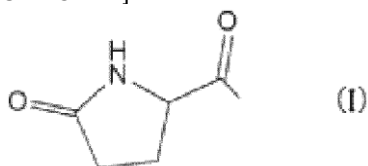
5

[FÓRMULA 3]



En la fórmula general anterior, R presenta la siguiente fórmula (I),

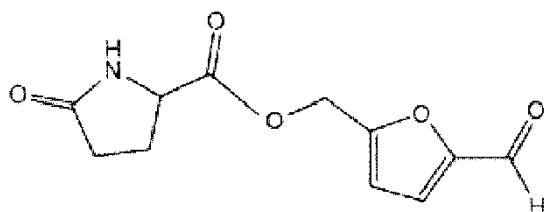
[FÓRMULA 4]



10

Por lo tanto, el derivado de hidroximetilfurfural está representado por la siguiente fórmula estructural.

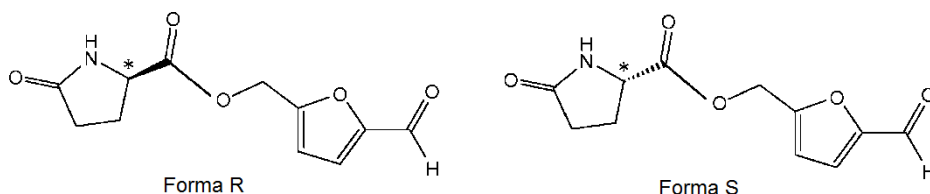
[FÓRMULA 5]



15

El derivado de hidroximetilfurfural incluye los siguientes dos isómeros estereoisómeros (forma R y forma S).

[FÓRMULA 6]



20

El derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la presente invención puede ser obtenido, como se muestra a continuación, mediante tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente.

El derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la presente invención, como se muestra a continuación, tiene una excelente actividad inductora de las proteínas de choque térmico, efecto antiestrés y efecto regulador del sistema nervioso autónomo.

25

(2. Método de elaboración de un derivado de hidroximetilfurfural)

El método de elaboración de un derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la presente invención comprende la etapa de tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente.

En la presente memoria descriptiva, la frase "tratamiento térmico con agua caliente" significa tratamiento térmico en agua caliente. Como tallo de espárrago utilizado en la presente invención, puede usarse la porción de tallo de, por ejemplo, espárrago verde, espárrago blanco, espárrago

30

morado, o similares. Además, el origen del espárrago no está particularmente limitado, y se pueden usar los espárragos que se producen en el país o se pueden usar espárragos importados. Siempre que el espárrago sea uno que produzca los efectos de la presente invención, el espárrago puede seleccionarse según corresponda.

- 5 La etapa de tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente se lleva a cabo, por ejemplo, agregando de 1 a 50 volúmenes de agua a un tallo de espárrago y calentándolo en agua caliente durante 20 a 180 minutos. Una temperatura en esta ocasión es, preferiblemente, de 50 a 300 °C. En los casos en que el tratamiento térmico se lleve a cabo a presión atmosférica, es preferible tener, por ejemplo, una temperatura de 100 °C o más. Debe observarse que el tratamiento térmico con
10 agua caliente puede realizarse a presión, aplicándose la presión preferiblemente, por ejemplo, de 0,1 a 0,2 MPa (por ejemplo, 0,12 MPa en los casos en que se usa un autoclave).

- Como se ha descrito anteriormente, el derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la presente invención es obtenido mediante tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente. Por lo tanto, el método para producir un derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la presente invención
15 comprende la etapa de tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente. En dicho método de elaboración, debido a que se usa la porción del tallo del espárrago que está ampliamente extendido como verdura, el derivado de hidroximetilfurfural puede producirse a bajo costo. Además, el derivado de hidroximetilfurfural puede producirse de manera simple y conveniente mediante tratamiento térmico de espárragos con agua caliente sin utilizar técnicas sofisticadas, dispositivos
20 especiales o similares. Además, debido a que el espárrago, que es un producto alimenticio, es sometido al tratamiento térmico con agua caliente, se puede decir que el derivado de hidroximetilfurfural obtenido por dicho método de producción tiene una alta seguridad; y el tallo del espárrago puede estar esterilizado debido al calentamiento con agua caliente. Debe observarse que, siempre que un método de tratamiento térmico con agua caliente sea uno que produzca los efectos de la presente invención, el método puede ser seleccionado según sea apropiado.

- Con el fin de aumentar la eficacia de la etapa de tratamiento térmico con agua caliente para producir eficientemente derivados de hidroximetilfurfural, el método de elaboración de un derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la presente invención puede comprender etapas adicionales expuestas a continuación.

- 30 Los ejemplos de la etapa adicional anterior pueden incluir la etapa de cortar finamente los tallos de espárrago antes del tratamiento térmico con agua caliente. El tallo del espárrago puede cortarse finamente en trozos de aproximadamente 0,5 a 10 cm de tamaño. El corte fino puede llevarse a cabo manualmente utilizando, por ejemplo, un cuchillo, cúter o similar. O se puede usar una máquina tal como una cortadora o un molino. Siempre que un método de corte fino sea uno que produzca los efectos de la presente invención, el método puede ser seleccionado según sea apropiado.

- Los ejemplos de la etapa adicional anterior pueden incluir la etapa de comprimir los tallos de espárrago antes del tratamiento térmico con agua caliente. El tallo del espárrago se puede comprimir utilizando, por ejemplo, un compresor. Siempre que un método de compresión sea uno que produzca los efectos de la presente invención, el método puede seleccionarse según sea apropiado.

- 40 Los ejemplos de la etapa adicional anterior incluyen, con el propósito de descomponer tejidos vegetales o similares, la etapa de un tratamiento enzimático antes o después de la etapa del tratamiento térmico con agua caliente. El tratamiento enzimático aumenta la eficiencia de la etapa del tratamiento térmico con agua caliente, lo que permite que los derivados de hidroximetilfurfural se elaboren de manera más eficiente. Por ejemplo, una enzima tal como celulasa, hemicelulasa,

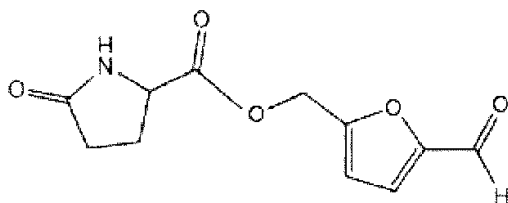
- 45 pectinasa, amilasa o pululanasa; o una combinación de 2, 3 o más de estas enzimas se utiliza adecuadamente con el fin de descomponer eficientemente fibras, pectina o similares en el tallo del espárrago. Siempre que una enzima sea una que produzca los efectos de la presente invención, la enzima puede ser seleccionada según sea apropiado. En la etapa del tratamiento enzimático, se puede seleccionar la cantidad a agregar, la temperatura y el tiempo de reacción que sean más apropiados para la enzima que se utilizará. En los casos en que se use celulasa, el tratamiento enzimático puede llevarse a cabo, por ejemplo, con una cantidad de celulasa añadida de 0,1 a 5 % (p/p) a una temperatura de 30 a 60 °C, durante 1 a 72 horas. La etapa de tratamiento enzimático puede llevarse a cabo antes de la etapa del tratamiento térmico con agua caliente o puede ser posterior a la etapa del tratamiento térmico con agua caliente. Cabe señalar que, desde el punto de
50 vista de descomponer eficientemente la celulosa en el tallo del espárrago para producir de manera más eficiente el derivado de hidroximetilfurfural, se prefiere llevar a cabo el tratamiento enzimático con celulasa después de la etapa del tratamiento térmico con agua caliente. Siempre que un método de tratamiento enzimático sea uno que produzca los efectos de la presente invención, el método puede seleccionarse según sea apropiado.

- 60 Los ejemplos de la etapa adicional anterior incluyen la etapa de moler mecánicamente los residuos después del tratamiento térmico con agua caliente. En la molienda, se puede utilizar, por ejemplo, una

- máquina tal como un molino o una mezcladora. Siempre que un método de molienda sea uno que produzca los efectos de la presente invención, el método puede seleccionarse según sea apropiado.
- Los ejemplos de la etapa adicional anterior incluyen la etapa de centrifugación o filtración después del tratamiento térmico con agua caliente. La inclusión adicional de estas etapas permite que el residuo se elimine eficientemente para obtener un líquido de tratamiento térmico. La centrifugación puede llevarse a cabo, por ejemplo, a una revolución de 3.000 a 7.000 rpm a una temperatura de 4 a 50 °C. En la filtración, se puede utilizar, por ejemplo, un papel de filtro, tela de filtro o similar comercializado. Siempre que un método de centrifugación o un método de filtración sea uno que produzca los efectos de la presente invención, el método puede seleccionarse según sea apropiado.
- Los ejemplos de la etapa adicional anterior incluyen la etapa de concentrar el líquido de tratamiento térmico obtenido a presión reducida después del tratamiento térmico con agua caliente. La concentración puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante un evaporador o similar. Siempre que un método de concentración sea uno que produzca los efectos de la presente invención, el método puede ser seleccionado según sea apropiado.
- Los ejemplos de la etapa adicional anterior incluyen la etapa de secado por pulverización o liofilización del líquido de tratamiento térmico después del tratamiento térmico con agua caliente. El secado por pulverización se puede llevar a cabo, por ejemplo, a una temperatura del aire de salida de 70 a 90 °C, y una temperatura de la cámara de 80 a 100 °C. Siempre que un método de secado por pulverización o un método de liofilización sea uno que produzca los efectos de la presente invención, el método puede seleccionarse según sea apropiado.
- Si se incluye además la etapa adicional ilustrada anteriormente en la etapa de tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente, el derivado de hidroximetilfurfural puede producirse de manera más eficiente. Siempre que una etapa adicional sea una que produzca los efectos de la presente invención, la etapa puede seleccionarse según sea apropiado.
- La etapa de tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente será ilustrada a continuación. El tallo del espárrago es cortado finamente en trozos de aproximadamente 0,5 a 10 cm y se le agrega de 1 a 50 volúmenes de agua. El tratamiento térmico con agua caliente se llevó a cabo a una temperatura de 50 a 100 °C, o a 121 °C a presión, durante 20 a 180 minutos. Después de dejar enfriar, a lo resultante se le añadió celulasa al 0,1 a 5 % (p/p); y el tratamiento enzimático se llevó a cabo a 30 a 60 °C, durante 1 a 72 horas. Posteriormente, los residuos se trituran mecánicamente y se centrifugan a unas revoluciones de 3.000 a 7.000 rpm a una temperatura de 4 a 50 °C, para obtener un sobrenadante. Dicho sobrenadante es sometido a continuación a secado por pulverización a una temperatura del aire de salida de 70 a 90 °C, y una temperatura de la cámara de 80 a 100 °C.
- En la presente memoria descriptiva, un "producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente" se refiere a uno obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago en agua caliente, y la eliminación posterior de los residuos por centrifugación, filtración o similares, seguido de concentración. Además, en la presente memoria descriptiva, un "producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y un tratamiento enzimático" significa un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente que se obtiene al pasar por la etapa de tratamiento enzimático tal como se describió anteriormente antes o después de la etapa del tratamiento térmico con agua caliente. En el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático, el derivado de hidroximetilfurfural mencionado anteriormente está contenido, por ejemplo, en una proporción de al menos 0,05 % o más como un componente activo.
- El derivado de hidroximetilfurfural obtenido por el método de producción de acuerdo con la presente invención se puede fraccionar, por ejemplo, disolviendo el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente en agua o un disolvente orgánico (tal como metanol) y sometiéndolo a cromatografía en columna abierta con un vehículo de fase inversa (por ejemplo, DIAION HP-20 (nombre del producto) (fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation) o similar). También puede, por ejemplo, ser fraccionado por un vehículo para la filtración en gel (por ejemplo, Sephadex LH-20 (nombre del producto) (fabricado por Pharmacia Fine Chemicals) o similares). Además, una fracción predeterminada que se eluye mediante el método mencionado anteriormente se puede purificar, por ejemplo, aislando mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Sin desear limitarse a una teoría particular, se piensa que, al tratar térmicamente el tallo de espárrago con agua caliente como se ha descrito anteriormente, un ácido orgánico y azúcares derivados del tallo de espárrago reaccionan a altas temperaturas, obteniendo así el derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos del ácido orgánico incluyen ácido piroglutámico, ácido α -cetoglutarico y ácido oxaloacético. A todo esto, los ejemplos del azúcar incluyen fructosa, glucosa, sacarosa o manosa.
- Por ejemplo, se cree que, en la etapa de tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua

caliente, el ácido piroglutámico y la fructosa que se derivan del tallo de espárrago reaccionan a altas temperaturas, obteniendo así el siguiente compuesto.

[FÓRMULA 8]



5

(3. Actividad inductora de HSP, efecto antiestrés y efecto regulador del sistema nervioso autonómico)

Mediante la presente invención, se elabora un derivado de hidroximetilfurfural el cual presenta una excelente actividad inductora de las proteínas de choque térmico, efecto antiestrés y efecto regulador del sistema nervioso autonómico.

10 La actividad inductora de HSP puede ser usada para inducir la HSP que está presente *in vivo* o *in vitro*. La HSP usada aquí es, por ejemplo, HSP70, HSP10, HSP27, HSP40, HSP60, HSP90, HSP110, o similares, prefiriéndose la HSP70. Puede ser evaluada una actividad inductora de HSP, por ejemplo, cultivando células con dicho inductor de HSP y midiendo, mediante un método conocido la actividad inductora de expresión del ARNm de HSP, la actividad inductora de la expresión de la proteína HSP o
15 similares. Siempre que un método de evaluación sea uno que produzca los efectos de la presente invención, el método puede ser seleccionado según sea apropiado.

El derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la presente invención puede ser administrado a un organismo vivo para obtener de ese modo un efecto antiestrés. El efecto antiestrés puede ser evaluado, por ejemplo, administrando dicho derivado de hidroximetilfurfural a mamíferos y midiendo el
20 índice de estrés oxidativo, la concentración de hormona de estrés en la sangre o similares antes y después de la administración. Siempre que un método de evaluación sea uno que produzca los efectos de la presente invención, el método puede ser seleccionado según sea apropiado.

El regulador del sistema nervioso autonómico de acuerdo con la presente invención puede ser administrado a organismos vivos para obtener de ese modo un efecto regulador del sistema nervioso autonómico. El efecto regulador del sistema nervioso autonómico puede ser evaluado, por ejemplo, administrando dicho regulador del sistema nervioso autonómico a mamíferos y midiendo el equilibrio
25 del sistema nervioso autonómico, una actividad del sistema nervioso autonómico o similares antes y después de la administración. Siempre que sea un método de evaluación que produzca los efectos de la presente invención, el método puede ser seleccionado según sea apropiado.

30 Además, mediante la presente invención, también se proporciona un regulador del sistema nervioso autonómico que contiene un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente como componente activo. Tal producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente es obtenido, como se ha descrito anteriormente, por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente. Por lo tanto, el derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo
35 con la presente invención está contenido en dicho producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente.

El derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la presente invención puede ser usado como un producto farmacéutico. El producto farmacéutico de acuerdo con la presente invención contiene el derivado de hidroximetilfurfural mencionado anteriormente como un componente activo. En este caso,
40 el producto farmacéutico puede ser preparado, mediante un método convencional, en una forma farmacéutica que incluye, por ejemplo, comprimidos, granulados, polvos, cápsulas, jarabes y soluciones inyectables. Además, pueden ser agregados excipientes, aglutinantes, lubricantes, agentes colorantes, disgregantes, espesantes, conservantes, estabilizadores, ajustadores de pH o similares, que generalmente son usados en productos farmacéuticos. Se puede seleccionar un método de
45 administración según sea apropiado en un intervalo en el que se produzcan los efectos de la presente invención, método que incluye administración oral, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración intradérmica y administración sublingual.

En los casos en que el derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la presente invención es usado como un producto farmacéutico, el producto farmacéutico puede ser administrados, por ejemplo, a
50 razón de 50 mg a 2000 mg/día, y preferiblemente de 100 mg a 1000 mg/día, en términos de un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente (o un producto

obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático) para obtener de ese modo la actividad inductora de HSP, el efecto antiestrés y el efecto regulador del sistema nervioso autonómico. La dosificación puede ser seleccionada según sea apropiado en función del objeto de administración, forma de dosificación, edad del paciente y peso corporal, o similares.

5 Ejemplos

Por vía de ejemplos, se describirá más concretamente a continuación la presente invención. Sin embargo, la presente invención no se limita en modo alguno a estos ejemplos.

(Ejemplo 1)

10 (Producción de hidroximetilfurfural mediante tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente)

Se añadieron 1,5 L de agua a tallos de espárrago verde (peso fresco 1,5 kg); y la mezcla fue, para el tratamiento térmico con agua caliente, esterilizada en autoclave (121 °C, durante 20 minutos) utilizando un autoclave y filtrada con una tela filtrante. El líquido obtenido fue concentrado a presión reducida en un evaporador para obtener un producto de tratamiento térmico. El producto de 15 tratamiento térmico obtenido fue fraccionado por cromatografía en columna (nombre del producto: DIAION HP-20, fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation; 500 ml, elución; H₂O, 50 % de metanol, 100 % de metanol) para obtener 1,7 g. A continuación, el producto de fraccionado obtenido fue purificado por HPLC preparatorio (nombre del producto: Hitachi L-7100, fabricado por Hitachi Ltd.) para obtener el compuesto (X) (5,0 mg). Se utilizó una columna cuyo nombre de producto es 20 CAPCELL PAK C18 UG 120, 20 φ × 250 mm (fabricado por Shiseido Co., Ltd.); y la fase móvil fue como se muestra en la Tabla 1 (A: H₂O, B: metanol). El caudal de la HPLC preparatorio fue de 8 mL/min y la detección se realizó a una longitud de onda de detección de 280 nm mediante un detector de absorbancia ultravioleta.

[Tabla 1]

Tiempo (minutos)	A(%)	B(%)
0	80	20
10	80	20
30	50	50
40	50	50
41	80	20
45	80	20

25

A continuación se muestran los datos de RMN del compuesto (X) obtenido como se ha descrito anteriormente.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆)

δ 4,49 (1H,dd,J=5,2Hz)

30 5,59 (1H,dt,J=5,6Hz)

6,55 (1H,d,J=3,6Hz)

7,48 (1H,d,J=3,6Hz)

9,52 (1H,s)

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆)

35 δ 55,9

109,7

124,5

151,7

162,1

40 178,0

Con el fin de determinar la estructura del compuesto (X) obtenido anteriormente, se compararon los datos de RMN de un producto de hidroximetilfurfural comercializado (nombre del producto: 5-hidroximetil-2-furaldehído, Tokyo Chemical Hanbai Co., Ltd.) con los del compuesto (X). A continuación se muestran los datos de RMN del producto comercializado de hidroximetilfurfural.

45 RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆)

δ 4,51 (1H,dd,J=5,2Hz)

5,59 (1H,dt,J=5,6Hz)

6,60 (1H,d,J=3,6Hz)

7,49 (1H,d,J=3,6Hz)

50 9,56 (1H,s)

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆)

δ 55,9

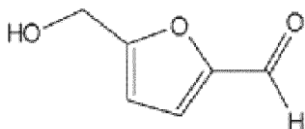
109,7

124,4

151,7
162,1
177,9

- 5 Debido a que los datos de RMN del compuesto (X) obtenido anteriormente coincidían con los del producto comercializado, se demostró que el compuesto (X) era hidroximetilfurfural (la siguiente fórmula estructural). A partir de lo anterior, se hizo evidente que el hidroximetilfurfural estaba contenido en el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente.

[FÓRMULA 9]



10

(Ejemplo 2)

(Producción de un nuevo derivado de hidroximetilfurfural mediante tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente)

- 15 Se añadió 1L de agua al tallo de espárrago verde (peso fresco 1,0 kg); y la mezcla fue, para el tratamiento térmico con agua caliente, esterilizada en autoclave (121 °C, durante 20 minutos) utilizando un autoclave y filtrada con una tela filtrante. El líquido obtenido fue concentrado a presión reducida en un evaporador para obtener un producto de tratamiento térmico obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente. El producto de tratamiento térmico obtenido fue
- 20 fraccionado por cromatografía en columna (nombre del producto: DIAION HP-20, fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation; 500 ml, elución; H₂O, 30 % de metanol, 100 % de metanol). A continuación, el producto de fraccionamiento obtenido 723,8 g fue purificado por cromatografía en columna (nombre del producto: Sephadex LH-20, fabricado por Pharmacia Fine Chemicals; 250 ml, elución; H₂O). Además, el producto fraccionado obtenido 12,6 mg fue purificado por HPLC preparatorio (nombre del producto: Hitachi L-7100, fabricado por Hitachi Ltd.) para obtener el
- 25 compuesto (Y) (2,0 mg). Las condiciones de la HPLC preparatorio fueron las mismas que las del Ejemplo 1.

- El compuesto (Y) obtenido anteriormente se sometió a análisis por HPLC (nombre del producto: Hitachi L-7100, fabricado por Hitachi Ltd.) y, como resultado, se encontró que el tiempo de retención fue de 22,99 minutos. En esta HPLC analítica, se utilizó una columna cuyo nombre del producto es CAPCELL PAK C18 UG 120, 4,6 φ × 250 mm (fabricado por Shiseido Co., Ltd.); y la fase móvil fue como se muestra en la Tabla 2 (C: tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 2,3), D: acetonitrilo). El caudal de la HPLC analítica fue de 1 mL/min y la detección se realizó a una longitud de onda de detección de 280 nm mediante un detector de absorbancia ultravioleta.

- 35 [Tabla 2]

Tiempo (minutos)	C(%)	D(%)
0	95	5
5	95	5
20	90	10
25	90	10
30	50	50
35	50	50
36	95	5

Los datos del análisis LC/TofMS del compuesto (Y) obtenido anteriormente se muestran a continuación.

Encontrado m/z 238,0710([M+H]⁺); C₁₁H₁₂NO₅

Valor teórico m/z 238,0715([M+H]⁺); C₁₁H₁₂NO₅

- 40 De lo anterior, se hizo evidente que el compuesto (Y) obtenido anteriormente presenta una fórmula molecular de C₁₁H₁₁NO₅.

A continuación se muestran los datos de RMN de ¹H del compuesto (Y) obtenido anteriormente.

RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD)

δ 2,00 (4H,m)

4,20 (1H,dd,J=3,9,9,2Hz)

- 45 5,20 (2H,s)

6,55 (1H,d,J=3,6Hz)

7,37 (1H,d,J=3,6Hz)

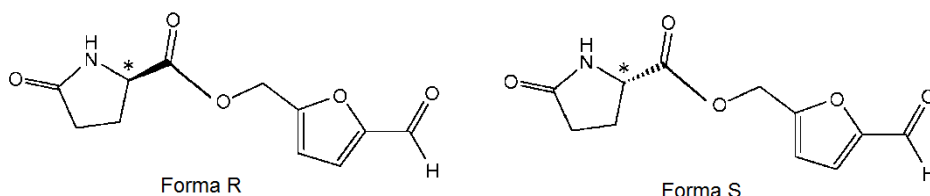
9,45 (1H,s)

(Ejemplo 3)

(Síntesis del nuevo derivado hidroximetilfurfural)

- 5 Se estimó que el compuesto (Y) ($C_{11}H_{11}NO_5$) obtenido en el Ejemplo 2 se generó haciendo reaccionar ácido piroglutámico ($C_5H_7NO_3$) y fructosa ($C_6H_{12}O_6$) derivadas del tallo de espárrago con calentamiento. Para verificar esto, se sintetizó un compuesto mediante el siguiente método usando ácido piroglutámico y fructosa. Cabe señalar que dado que se pensó que existían estereoisómeros, como se describe a continuación, para el compuesto (Y), se sintetizaron una forma S(L) y una forma R(D) con ácido L-piroglutámico como material de partida y con ácido D-piroglutámico como material de partida, respectivamente.

[FÓRMULA 10]



- 15 Se mezclaron ácido L-piroglutámico (nombre del producto: ácido L-piroglutámico, Tokyo Chemical Hanbai Co., Ltd.) 3,0 g y D-fructosa (nombre del producto: D(-)-fructosa, Junsei Chemical Co., Ltd.) 1,5 g en un matraz Erlenmeyer y se esterilizó en autoclave (121 °C, durante 20 minutos) utilizando un autoclave. El producto de reacción obtenido fue fraccionado por cromatografía en columna (nombre del producto: DIAION HP-20, fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation; 150 mL, elución; H₂O, 30 % de metanol, 100 % de metanol). Además, fue purificada una fracción de metanol al 100 % mediante HPLC preparatorio usando una columna (nombre del producto: CAPCELL PAK C18 UG 120, 20 φ × 250 mm, fabricado por Shiseido Co., Ltd.) para obtener el compuesto (Z) en forma S (24,4 mg). Las condiciones de la HPLC preparatorio fueron las mismas que las del Ejemplo 1.

- 20 Se mezclaron ácido D-piroglutámico (nombre del producto: ácido D-piroglutámico, Tokyo Chemical Hanbai Co., Ltd.) 2,0 g y D-fructosa (nombre del producto: D(-)-fructosa, Junsei Chemical Co., Ltd.) 1,0 g en un matraz Erlenmeyer y se esterilizó en autoclave (121 °C, durante 20 minutos) utilizando un autoclave. El producto de reacción obtenido fue fraccionado por cromatografía en columna (nombre del producto: DIAION HP-20, fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation; 100 mL, elución; H₂O, 30 % de metanol, 60 % de metanol). Una fracción de metanol al 60 % se concentró hasta aproximadamente 50 mL a presión reducida mediante un evaporador y luego se separó con acetato de etilo (50 mL × 5). Una capa de acetato de etilo fue concentrado a presión reducida mediante un evaporador y fraccionado mediante cromatografía en columna (nombre del producto: DIAION HP-20, fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation; 10 mL, elución; H₂O, 30 % de metanol, 60 % de metanol). Una fracción de metanol al 60% fue concentrado a presión reducida mediante un evaporador para obtener el compuesto (Z) en forma R (24,6 mg).

- 35 Los compuestos (Z) de forma S y R obtenidos anteriormente fueron sometidos a análisis por HPLC (nombre del producto: Hitachi L-7100, fabricado por Hitachi Ltd.) y, como resultado, se encontró que el tiempo de retención fue de 22,89 minutos para cada uno. Las condiciones de la HPLC analítica fueron las mismas que las del Ejemplo 2.

- 40 A continuación se muestran los datos de MS y los datos del análisis de RMN con respecto a los compuestos (Z) de forma S y R obtenidos anteriormente.

EI-MS:m/z 237

EI-HR-MS:m/z 237,0612; $C_{11}H_{11}NO_5$

RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD): forma S

- 45 δ 2,33 (4H,m)

4,34 (1H,dd,J=3,9,9,0Hz)

5,51 (2H,s)

6,73 (1H,d,J=3,4Hz)

7,38 (1H,d,J=3,4Hz)

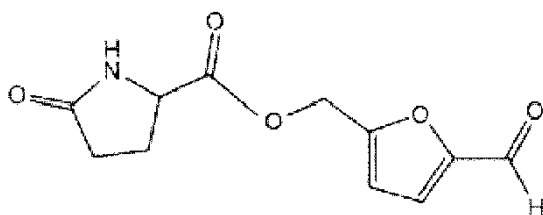
- 50 9,57 (1H,s)

RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD): forma S

δ 25,8

- 30,2
57,0
59,6
114,0
5 124,0
154,5
156,7
173,4
179,6
10 181,1
RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD): forma R
 δ 2,33 (4H,m)
4,34 (1H,dd,J=3,9,9,0Hz)
5,27 (2H,s)
15 6,73 (1H,d,J=3,6Hz)
7,38 (1H,d,J=3,6Hz)
9,57 (1H,s)
RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD): forma R
 δ 25,8
20 30,3
57,0
59,6
113,7
124,0
25 154,5
156,8
173,4
179,6
181,1
30 Para determinar la estructura absoluta del compuesto (Y) obtenido en el Ejemplo 2, el compuesto (Y) obtenido en el Ejemplo 2, el compuesto (Z) en forma S y el compuesto (Z) en forma R, ambos obtenidos anteriormente, se sometieron a análisis por HPLC (nombre del producto: Hitachi L-7100, fabricado por Hitachi Ltd.) utilizando una columna quiral (nombre del producto: CHIRAL PAK IA, 4,6φ × 150 mm, fabricado por Daicel Corporation). Las condiciones de la HPLC analítica fueron las mismas
35 que en el Ejemplo 2, excepto que fue usada una columna diferente. Como resultado, se encontró que el tiempo de retención del compuesto (Z) en forma S fue de 18,92 minutos y el tiempo de retención del compuesto (Z) en forma R fue de 20,57 minutos. Debido a que el tiempo de retención del compuesto (Y) obtenido en el Ejemplo 2 fue de 19,06 minutos, se hizo evidente que el compuesto (Y) obtenido en el Ejemplo 2 era la forma S.
40 Cuando se compararon los datos del análisis de HPLC, los datos del análisis de LC/TofMS y los datos de RMN de ^1H del Ejemplo 2 con los datos de los análisis mencionados anteriormente en este Ejemplo, el compuesto (Y) obtenido en el Ejemplo 2 y el compuesto (Z) obtenido en este Ejemplo resultaron ser compuestos idénticos. Por lo tanto, se hizo evidente que el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente, cuyo producto se obtuvo en el Ejemplo
45 2, contenía al menos la forma S del derivado de hidroximetilfurfural que tenía la siguiente fórmula estructural.

[FÓRMULA 11]



- 50 (Ejemplo 4)
(Evaluación de la actividad inductora de la expresión del ARNm de HSP70)
Se evaluó la actividad inductora de HSP70 midiendo el nivel de expresión del ARNm de HSP70 con

respecto a un producto comercializado de hidroximetilfurfural (el mismo que en el Ejemplo 1) (en lo sucesivo, denominado muestra 1), de la forma S del derivado de hidroximetilfurfural sintetizado en el Ejemplo 3 (en lo sucesivo, denominado muestra 2-S), y la forma R del derivado de hidroximetilfurfural sintetizado en el Ejemplo 3 (en lo sucesivo, denominado muestra 2-R), y un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente, producto que se produjo mediante el siguiente método (en lo sucesivo, denominado como muestra 3), y un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático (en lo sucesivo, denominado muestra 4).

A continuación se muestra un método para elaborar la muestra 3. A los tallos de espárragos verdes (peso fresco 6,63 kg), se añadió 28,5 l de agua; y la mezcla fue, para el tratamiento térmico con agua caliente, esterilizada en autoclave (121 °C, 20 minutos). Después del enfriamiento, se llevó a cabo una filtración con un papel de filtro (nombre del producto: Toyo Roshi N.º 5A, fabricado por Toyo Roshi Kaisha, Ltd.); y la concentración se llevó a cabo en un evaporador. A aproximadamente 10 l del líquido concentrado, se añadió un excipiente (nombre del producto: Pinedex, fabricado por Matsutani Chemical Industry Co., Ltd.) 275,4 g y la mezcla resultante se liofilizó para obtener 542,4 g de polvo que contiene un producto obtenido mediante el tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente (en este caso el producto obtenido mediante el tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente derivado del contenido sólido del tallo de espárrago representaba 267,0 g y el excipiente representaba 275,4 g).

A continuación es mostrado un método para elaborar la muestra 4. A los tallos de espárragos verdes (peso fresco 12 kg), se añadió 24 l de agua; y la mezcla fue, para el tratamiento térmico con agua caliente, esterilizada en autoclave (121 °C, 20 minutos). Después de dejar enfriar a 45°C, a lo resultante se le añadió sacarasa C (nombre del producto) (fabricado por Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation) 20 g y Macerozima A (nombre del producto) (fabricado por Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.) 20 g; y el tratamiento enzimático fue realizado a 45 °C, durante tres días. Posteriormente, se llevó a cabo la esterilización en autoclave (121 °C, 20 minutos) y se filtró con una tela filtrante recogiendo un filtrado de 35 L. La concentración fue realizada mediante un evaporador hasta que el volumen alcanzó 9 L. A este líquido concentrado, se le añadió un excipiente (nombre del producto: Pinedex, fabricado por Matsutani Chemical Industry Co., Ltd.) 1,20 kg; y la mezcla resultante fue esterilizada nuevamente en autoclave (121°C, 20 minutos). Posteriormente, se realizó la liofilización para obtener 2,12 kg de un polvo que contiene un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático (en este caso el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático derivado del contenido sólido del tallo de espárrago representaba 0,92 kg y el excipiente representaba 1,20 kg).

Primero, con respecto a la muestra 1, la muestra 2-S y la muestra 2-R, se evaluó el nivel de expresión del ARNm de HSP70 usando células de leucemia promielocítica humana (células HL-60). A continuación es mostrado un método para evaluar el nivel de expresión del ARNm de HSP70 usando células de leucemia promielocítica humana (células HL-60). Se suspendió HL-60 (fuente: Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) en un medio RPMI1640 (nombre del producto: polvo RPMI1640 medio "NISSUI" (2), fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS) (nombre del producto: MultiSer, fabricado por Thermo Trace) y fue transferido a un tubo de ensayo de 1,5 mL (500.000 células/1 mL/tubo). Al mismo tiempo, se añadieron 0,1 mL de cada una de las muestras (muestra 1, muestra 2-S y muestra 2-R) que se habían preparado con agua de intercambio iónico de modo que la concentración final fue de 1 mg/mL. A un control, se le añadió 0,1 mL de agua de intercambio iónico. Después de cultivar a 37 °C, en presencia de 5 % de CO₂ durante cuatro horas, las células se cosecharon a 3.000 rpm y se sometieron a detección de ARNm. De esto, se extrajo el ARN total usando el reactivo TRIzol (fabricado por Life Technologies Corporation) y la concentración del mismo fue medida por Nanodrop (fabricado por Thermo Fisher Scientific K.K.). Utilizando un kit de síntesis de ADNc (nombre del producto: ReverTra Ace qPCR RT Master Mix con extractor de ADNc, fabricado por Toyobo Life Science), se sintetizó el ADNc. Se diluyó un líquido de reacción después de la transcripción inversa con agua libre de nucleasa hasta obtener una concentración de 3 ng/μL para usado como molde para la PCR en tiempo real.

En la PCR, se usaron cebadores directos HSP70 (SEQ ID NO: 1) y cebador inverso HSP70 (SEQ ID NO: 2) como cebadores. El gen de la microglobulina beta 2 fue usado como un gen de control interno para la corrección de la expresión del gen de HSP70; y el cebador directo de microglobulina beta 2 (SEQ ID NO: 3) y el cebador inverso de microglobulina beta 2 (SEQ ID NO: 4) se usaron como cebadores para el mismo. La PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando un kit de reacción (nombre del producto: SsoAdvanced SYBR Green Supermix, fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) mediante un sistema de análisis por PCR en tiempo real (nombre del producto: CFX Connect, fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se sometieron un total de 10 μL de líquido de reacción a una

incubación de tres minutos a 95 °C (desnaturalización inicial) seguido de la repetición de 40 ciclos, cada uno de los cuales comprendía desnaturalización a 95 °C, durante 1 segundo e hibridación a 59 °C, durante 10 segundos.

Usando el valor de Cq obtenido por el sistema de análisis de PCR en tiempo real anterior, se calculó una relación del nivel de expresión del gen HSP70 basándose en la siguiente fórmula de cálculo (método $\Delta\Delta C_t$). Debe observarse que el valor de Cq representa el número de ciclos de reacción en el momento en que el nivel del gen amplificado alcanza un cierto nivel predeterminado en la reacción de amplificación del gen.

Valor Cq del control HSP70: A

Valor Cq del control B2M: B

Valor de Cq de la muestra HSP70: C

Valor de Cq de la muestra B2M: D

$\Delta C_q(\text{control}) = A - B$

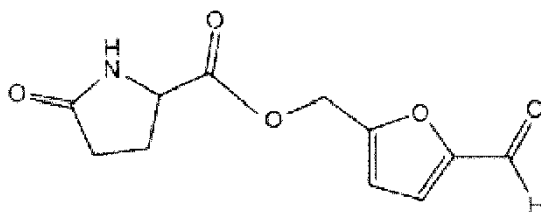
$\Delta C_q(\text{muestra}) = C - D$

$\Delta(\Delta C_q) = \Delta C_q(\text{muestra}) - \Delta C_q(\text{control})$

Relación del nivel de expresión = $2^{-\Delta(\Delta C_q)}$

Los resultados se muestran en la Fig. 1. En la Fig. 1, la actividad inductora de la expresión del ARNm de HSP70 de la muestra 1, la muestra 2-S y la muestra 2-R se expresó como una relación (%) con respecto a la del control. En comparación con el control, las muestras 1, 2-S y 2-R exhibieron una expresión del ARNm de HSP70 3 a 9 veces mayor (muestras 2-S y 2-R, $**p < 0,01$ frente al control; muestra 1, $*p = 0,069$ frente al control). A partir de estos resultados, quedaba claro que el hidroximetilfurfural y la forma S y R de los derivados de hidroximetilfurfural que tienen la siguiente fórmula estructural tenían la actividad inductora de HSP70 a un nivel de expresión del ARNm.

[FÓRMULA 12]



A continuación, se evaluó el nivel de expresión del ARNm de HSP70 en la muestra 1, la muestra 3 y la muestra 4 usando células de cáncer de cuello uterino humano (células HeLa).

Las células de cáncer de cuello uterino humano (células HeLa) (fuente: Agencia administrativa incorporada RIKEN, el Instituto de Investigación Física y Química, Centro BioResource) fueron suspendidas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (nombre del producto: medio de Eagle modificado por Dulbecco "Nissui" 2 polvo, fabricado por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) (nombre del producto: MultiSer, fabricado por Thermo Trace) y se sembraron una placa de seis pocillos (200.000 células/2 mL/pocillo). Al día siguiente, el medio fue reemplazado con DMEM fresco (1,8 mL); y se agregaron 0,2 mL de cada una de las muestras, cuyas muestras se habían preparado con agua de intercambio iónico para obtener una concentración final de 1 mg/mL (con respecto a las muestras 3 y 4, una concentración final de 1 mg/mL en términos de un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y un tratamiento enzimático derivado del contenido sólido del tallo de espárrago). Se añadieron a un control 0,2 mL de agua de intercambio iónico. Después de cultivar durante 22 horas, las células se rasparon con un raspador de células y se sometieron a detección de ARNm. A partir de esto, fue extraído el ARN total utilizando un kit de extracción de ARN (nombre del producto: kit Fast Pure RNA, fabricado por Takara Bio Inc.), diluido 100 veces con agua tratada con DEPC; y la absorbancia (longitud de onda 260 nm) se midió con un espectrofotómetro. La concentración de ARN fue calculada utilizando la fórmula de cálculo: absorbancia (longitud de onda 260 nm) $\times$ 40 $\times$ factor de dilución = concentración de ARN (ng/ μ L). Una solución de ARN fue diluida hasta una concentración opcional con un tampón TE; y el ADNc fue sintetizado usando un kit de síntesis de ADNc (nombre del producto: kit Prime Script 1st Strand cDNA synthesis, fabricado por Takara Bio Inc.). El cebador de oligo dT (nombre del producto) (fabricado por Takara Bio Inc.) fue usado como cebador. Se diluyó un líquido de reacción después de la transcripción inversa con el tampón TE hasta obtener una concentración de 10 ng/ μ L para usar como molde de PCR.

En la PCR, fueron usados un cebador directo HSP70 (SEQ ID NO: 5) y un cebador inverso HSP70 (SEQ ID NO: 6) como cebadores. El gen de la microglobulina beta 2 se utilizó como un gen de control interno para la corrección de la expresión del gen HSP70; y el cebador directo de la microglobulina beta 2 (SEQ ID NO: 3) y el cebador inverso de la microglobulina beta 2 (SEQ ID NO: 4) se usaron como cebadores para la misma. Para la PCR, se utilizó una enzima de PCR (nombre del producto: TaKaRa Ex Taq, fabricada por Takara Bio Inc.). Un total de 20 µL de líquido de reacción de PCR fue sometido a una incubación de un minuto a 94 °C (desnaturalización inicial), seguido de la repetición de 32 ciclos (HSP70) o 24 ciclos (microglobulina beta 2), cada uno de los cuales comprendía desnaturalización a 94 °C, durante 30 segundos, hibridación a 57 °C, (HSP70) ó 59 °C, (microglobulina beta 2) durante 30 segundos, y elongación a 72 °C, durante 30 segundos. Se realizó una reacción de elongación a 72 °C, durante 30 segundos, para finalizar todas las PCR. El líquido de reacción de PCR fue sometido a electroforesis por un método convencional; y se realizó el tintado con bromuro de etidio.

Midiendo la intensidad de fluorescencia bajo irradiación ultravioleta en AlphaView (nombre del producto) (fabricado por Alpha Innotech Corporation), se midió el nivel de expresión del gen HSP70. En esta ocasión, el valor obtenido al corregirse con el nivel de expresión del gen de control interno se consideró como el nivel de expresión del gen HSP70.

Los resultados se representan en la Fig. 2. En la Fig. 2, la actividad inductora de la expresión del ARNm de HSP70 de las muestras 1, 3 y 4 fue expresada como una relación (%) con respecto a la del control. En comparación con el control, las muestras 1, 3 y 4 exhibieron una expresión del ARNm de HSP70 aproximadamente 1,2 a 1,5 veces mayor (muestras 1 y 4, **p < 0,01 frente a control; muestra 3, *p<0,05 frente a control). A partir de estos resultados, quedaba claro que el hidroximetilfurfural, y el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente, y el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático mediante este Ejemplo tenían la actividad inductora de HSP70 en un nivel de expresión de ARNm. (Ejemplo 5)

(Evaluación de la actividad inductora de la expresión de la proteína HSP70)

La actividad inductora de HSP70 de las muestras 1, 3 y 4, que eran las mismas que las utilizadas en el Ejemplo 4, fue evaluada midiendo un nivel de expresión de la proteína HSP70.

De la misma manera que se describe en el Ejemplo 4, las células HeLa que se habían suspendido en DMEM (añadido con FBS al 10 %) fueron sembradas en una placa de 12 pocillos (100.000 células/mL/pocillo). Al día siguiente, el medio fue reemplazado con DMEM fresco (0,9 ml); y se añadieron 0,1 mL de cada una de las muestras, cuyas muestras se habían preparado con agua de intercambio iónico hasta obtener una concentración final de 1 mg/ml (con respecto a las muestras 3 y 4, una concentración final de 1 mg/ml en términos de un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y un tratamiento enzimático derivado del contenido sólido del tallo de espárrago). A un control, se añadió 0,1 ml de agua de intercambio iónico. Después de cultivar durante 24 horas, fue retirado el sobrenadante de cultivo y las células fueron lavadas con PBS(-) (solución salina fisiológica tamponada con fosfato, pH 7,2). A continuación, se raspó una parte de las células con un raspador de células, se recogió en un tubo de ensayo de 1,5 mL y se sometió a la cuantificación de la proteína HSP70 y a cuantificación de proteínas totales.

La cuantificación de la proteína HSP70 fue realizada utilizando el kit HSP70 ELISA (nombre del producto) (fabricado por Enzo); y la cuantificación de las proteínas totales se realizó usando el kit Micro BCA Protein Assay Reagent (nombre del producto) (fabricado por PIERCE Biotechnology). Con respecto a las células restantes, fue evaluado el efecto sobre la proliferación celular mediante el método del bromuro de 3-(4,5-dimetiltial-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Posteriormente, un valor corregido con la cantidad de proteínas totales y el número de células viables fue considerado como la cantidad de proteína HSP70.

Los resultados se representan en la Fig. 3. En la Fig. 3, la actividad inductora de la expresión de la proteína HSP70 de las muestras 1, 3 y 4 se expresó como una relación (%) respecto a la del control. En comparación con el control, las muestras 1, 3 y 4 exhibieron una expresión de la proteína HSP70 aproximadamente 1,3 veces mayor (*p < 0,05 frente al control). A partir de estos resultados, quedaba claro que el hidroximetilfurfural, el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente, y el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y el tratamiento enzimático mediante este Ejemplo tenían la actividad inductora de HSP70 a un nivel de expresión de proteínas

A partir de lo anterior, quedó demostrado que el hidroximetilfurfural, el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente, y el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático mediante este Ejemplo tenían una excelente actividad inductora de HSP70.

(Ejemplo 6)

(Evaluación del efecto antiestrés en un modelo vivo de ratón por privación del sueño)

El efecto antiestrés del producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente que se obtuvo en el Ejemplo 4 (la "muestra 3" del Ejemplo 4), fue evaluado utilizando un

5 modelo vivo de ratón por privación del sueño.

Treinta y dos ratones macho Slc:ddY de 6 semanas de edad (obtenidos de CLEA Japan, Inc.) fueron divididos en 4 grupos (8 ratones en cada grupo). Cada uno de los grupos fue designado como un grupo normal, un grupo de control, un grupo con una dosis baja del producto obtenido por tratamiento

10 térmico de un tallo de espárrago con agua caliente (en lo sucesivo, denominado grupo de dosis baja) y un grupo con una dosis alta del producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente (en lo sucesivo, denominado grupo de dosis alta). Siete días antes de que los ratones se sometieran a estrés por privación de sueño, se agregó un polvo que contenía el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente a la alimentación normal de puré (nombre del producto: CE-2, fabricado por CLEA Japan, Inc.) y se administró diariamente a

15 los ratones del grupo de dosis baja una dosis de 200 mg/kg (en términos del producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente derivado del contenido sólido del tallo de espárrago) y a ratones del grupo de dosis alta una dosis de 1000 mg/kg (en términos del mismo). El grupo normal y el grupo control fueron alimentados con la alimentación de puré regular. En el grupo de control, el grupo de dosis baja y el grupo de dosis alta, los ratones se sumergieron en agua durante

20 12 horas (8:00 a 20:00) por día para aplicar el estrés por privación del sueño durante 3 días. En el grupo normal no se aplicó el estrés por privación del sueño.

El efecto antiestrés se evaluó en ratones el día siguiente a la última carga del estrés por la privación del sueño midiendo (1) los niveles de peróxido de lípidos en el suero sanguíneo (una proporción de la cantidad de peróxido de lípidos (LPO) respecto a la cantidad de triglicéridos (TG) en el suero

25 sanguíneo (LPO/TG)) como un índice del estrés oxidativo, (2) midiendo la concentración sanguínea de corticosterona la cual es conocida como hormona del estrés, y (3) evaluando la tasa de incidencia de ratones con pérdida de pelo .

La FIG. 4 muestra el resultado de la medición del nivel de peróxido de lípidos en el suero sanguíneo. En la figura, un valor más alto de LPO/TG indica un estado de mayor estrés oxidativo en la sangre. El

30 valor de LPO/TG fue alto en el grupo de control, mientras que el valor de LPO/TG disminuyó casi al mismo nivel que el grupo normal en el grupo de dosis baja y en el grupo de dosis alta (*p < 0,05 frente al control). Estos resultados demostraron que cuando el producto obtenido mediante tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente mediante este Ejemplo fue tomado por ratones con un estado en el que el estrés oxidativo en la sangre fue elevado debido a la carga del

35 estrés por la privación del sueño, el estrés oxidativo en la sangre se redujo al nivel observado cuando no se aplicó el estrés por la privación del sueño.

La FIG. 5 muestra el resultado de la medición de la concentración de corticosterona en la sangre. En la figura, un valor más alto de concentración de corticosterona indica un estado de estrés más alto. El

40 valor de la concentración de corticosterona fue alto en el grupo de control, mientras que el valor de la concentración de corticosterona disminuyó casi al mismo nivel que el grupo normal en el grupo de dosis baja y el valor de la concentración de corticosterona se redujo al mismo nivel o más bajo que el del grupo normal en el grupo de dosis alta (**p < 0,01 frente al control, *p < 0,05 frente al control). Estos resultados demostraron que cuando el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de

45 espárrago con agua caliente mediante este Ejemplo que fue tomado por ratones que estaban en un estado de mayor estrés debido a la carga del estrés por privación del sueño, el mayor estado de estrés se reducía al nivel observado cuando no se aplicaba el estrés por privación del sueño y, en el grupo de dosis alta, se redujo aún más al mismo nivel o más bajo que el observado cuando no se aplicaba el estrés por privación del sueño.

La FIG. 6 muestra la tasa de incidencia de ratones con pérdida de pelo. En la figura, una mayor tasa de incidencia de pérdida de pelo indica un mayor estado de estrés. La tasa de incidencia de pérdida de pelo en el grupo normal, grupo de control, grupo de dosis baja y grupo de dosis alta fue de 0 %, 75,0 %, 37,5 % y 12,5 %, respectivamente; y la tasa de incidencia de pérdida de pelo fue menor en el

50 grupo de dosis baja y en el grupo de dosis alta, en comparación con la del grupo de control. Estos resultados demostraron que cuando el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente mediante este Ejemplo era tomado por ratones que estaban en un estado de mayor estrés debido a la carga del estrés por privación del sueño, se reducía este mayor estado de

55 estrés.

A partir de lo anterior, se demostró que el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente que contiene el derivado de hidroximetilfurfural mediante este Ejemplo

60 tenía un excelente efecto antiestrés.

(Ejemplo 7)

(Evaluación de la actividad inductora de la expresión de la proteína HSP70 en un modelo de privación del sueño en ratones)

Utilizando los ratones usados en el Ejemplo 6, se evaluó la actividad inductora de HSP70 del producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente que se obtuvo en el Ejemplo 4 (la "muestra 3" del Ejemplo 4) midiendo el nivel de expresión de la proteína HSP70 en el estómago, hígado y riñón.

El último día del estudio del Ejemplo 6, los ratones de cada uno de los grupos fueron sacrificados; y se extrajeron el estómago, el hígado y el riñón. Cada uno de los órganos (50 mg) fue colocado en un tubo de ensayo de 1,5 mL y al mismo se le agregaron 500 µL del reactivo de extracción del kit HSP70 ELISA (nombre del producto) (fabricado por Enzo) con cóctel de inhibidor de la proteasa (nombre del producto) (fabricado por Sigma) al 0,2 % (v/v). Cada uno de los órganos fue triturado sobre hielo usando una varilla de mortero y se centrifugó a 4 °C, a 1.500 rpm durante 30 minutos, y se recogió el sobrenadante. Este sobrenadante fue sometido a la cuantificación de la proteína HSP70 y a la cuantificación de las proteínas totales.

De la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 5, la cuantificación de la proteína HSP70 se realizó usando el kit ELISA HSP70 (nombre del producto) (fabricado por Enzo) y la cuantificación de las proteínas totales se realizó usando el kit Micro BCA Protein Assay Reagent (nombre del producto) (fabricado por PIERCE Biotechnology). Un valor corregido con la cantidad de proteínas totales se consideró como la cantidad de proteína HSP70.

Las figuras 7 a 9 muestran el nivel de expresión de la proteína HSP70 en el estómago, el hígado y los riñones. En las Figuras 7 a 9, la actividad inductora de la expresión de la proteína HSP70 del grupo control, el grupo de dosis baja y el grupo de dosis alta se expresó como una relación (%) con respecto a la del grupo normal. En el estómago (FIG. 7) y el hígado (FIG. 8), el nivel de expresión de la proteína HSP70 disminuyó en el grupo control en comparación con el grupo normal; mientras que la expresión de la proteína HSP70 aumentó en el grupo de dosis baja y en el grupo de dosis alta al mismo nivel o mayor que en el grupo normal (*p < 0,05 frente al control). En el riñón (FIG. 9), la expresión de la proteína HSP70 aumentó en el grupo de dosis baja y en el grupo de dosis alta, en comparación con el grupo de control (**p < 0,01 frente al control).

De los resultados obtenidos, resulta obvio que el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente que contenía el derivado de hidroximetilfurfural mediante este Ejemplo tenía, incluso cuando se administraba a animales, una excelente actividad inductora de HSP70 a un nivel de expresión de proteínas. Además, se sugirió que uno de los mecanismos de acción del efecto antiestrés mostrados en el Ejemplo 6 fue la actividad inductora de la expresión HSP70 del producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente conteniendo el derivado de hidroximetilfurfural mediante este Ejemplo.

(Ejemplo 8)

(Evaluación de la actividad inductora de la expresión del ARNm de HSP70 en el ser humano)

Usando el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente el cual fue obtenido en el Ejemplo 4 (la "muestra 3" del Ejemplo 4), fue evaluada la actividad inductora de HSP70 en glóbulos blancos humanos midiendo el nivel de expresión del ARNm de HSP70.

Tres voluntarios que expresaron voluntariamente su intención de participar fueron utilizados como sujetos (en adelante, denominados sujeto 1, sujeto 2 y sujeto 3). Tomaron un producto que contenía polvo obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente dos veces al día (mañana y tarde) durante 3 días, el sujeto 1 a una dosis de 200 mg/día, el sujeto 2 a una dosis de 400 mg/día, y el sujeto 3 a una dosis de 800 mg/día, (en 200 mg (sujeto 1), 400 mg (sujeto 2) y 800 mg (sujeto 3) de dicho polvo del producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente, estaban contenidos 98 mg, 197 mg y 394 mg del producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente derivado del contenido sólido del tallo de espárrago, respectivamente).

Antes del comienzo de la ingesta y el último día de la ingesta, se extrajo sangre y se midió el nivel de expresión del ARNm de HSP70 en los glóbulos blancos. Se mezcló 1 mL de sangre con 10 mL de solución tampón ACK (cloruro de amonio 0,15 M, bicarbonato de potasio 1,0 mM, EDTA-2Na 0,1 mM, pH 7,2) a 37 °C y se mantuvo a 37 °C durante 10 minutos. El resultante fue centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. A los glóbulos blancos precipitados se les agregó nuevamente 10 mL de solución tampón ACK para ser suspendidos. El mismo procedimiento se repitió tres veces; y se agregó reactivo Trizol (nombre del producto) (Life Technologies) 1,5 mL a los glóbulos blancos precipitados para extraer el ARN total. Los procedimientos posteriores, incluida una reacción de PCR, se llevaron a cabo de la misma manera tal y como se describió en el Ejemplo 4 (la evaluación en células HeLa); y fue evaluada la cantidad de expresión del ARNm de HSP70.

Los resultados son mostrados en la FIG. 10. En la FIG. 10, se presenta una relación (%) entre el nivel de expresión del ARNm de HSP70 en los glóbulos blancos después de la finalización de la ingesta y

antes del inicio de la ingesta. La expresión del ARNm de HSP70 en los glóbulos blancos después de la finalización de la ingesta aumentó aproximadamente de 2,5 a 3,5 veces de una manera dependiente de la dosis del producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente, en comparación con la observada antes del comienzo de la ingesta.

5 De los resultados obtenidos, resulta obvio que el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente que contenía el derivado de hidroximetilfurfural mediante este Ejemplo tenía, incluso cuando se administraba en humanos, una excelente actividad inductora de HSP70 a un nivel de expresión del ARNm.

(Ejemplo 9)

10 (Evaluación clínica del efecto regulador del sistema nervioso autónomo de un producto obtenido mediante tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente)

Usando el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente que se obtuvo en el Ejemplo 4 (la "muestra 3" del Ejemplo 4), fue evaluado el efecto regulador del sistema nervioso autónomo en humanos.

15 Treinta voluntarios que expresaron voluntariamente su intención de participar fueron empleados como sujetos para llevar a cabo un estudio aleatorio doble ciego controlado con placebo. Los sujetos fueron asignados, usando una lotería, a un grupo placebo (en lo sucesivo denominado grupo P) 15 sujetos, o a un grupo con el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente (en lo sucesivo denominado grupo A) 15 sujetos. Durante cuatro semanas durante el período
20 de estudio, los sujetos del grupo P tomaron un excipiente (nombre del producto: Pinedex, fabricado por Matsutani Chemical Industry Co., Ltd.) (400 mg/día) mientras que los sujetos del grupo A tomaron un polvo que contenía el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente (400 mg/día) dos veces al día (mañana y tarde) todos los días (en 400 mg de dicho polvo del producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente, el producto
25 obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente derivado del contenido sólido del tallo de espárrago representaba 197 mg y los 203 mg restantes eran el excipiente (lo mismo que antes).

Antes del inicio del estudio y el último día del estudio, fue evaluado el equilibrio del sistema nervioso autonómico y la actividad del sistema nervioso autonómico utilizando un sistema de análisis de aceleración de la onda de pulso (nombre del producto; Pulse analyzer plus TAS-9, fabricado por YKC Corporation). Dicho sistema es un sistema en el que se mide la aceleración de las ondas de pulso en la punta de los dedos para detectar cambios sutiles en la frecuencia cardíaca (variabilidad de la frecuencia cardíaca: VFC) y evaluar las funciones nerviosas autonómicas. La VFC se expresa como consecuencias clínicas para diversos factores del sistema nervioso autonómico que influyen en la
35 frecuencia cardíaca. El equilibrio del sistema nervioso autonómico fue evaluado trazando un índice para la actividad nerviosa simpática (Baja frecuencia: LF) en el eje X y un índice para la actividad nerviosa parasimpática (Alta frecuencia: HF) en el eje Y, actividades que fueron proporcionadas por dicho sistema, para preparar un gráfico bidimensional y usando una distancia entre el punto en el cual el equilibrio del sistema nervioso autonómico era mejor y el punto con un valor medido en dicho gráfico. En cuanto a la actividad del sistema nervioso autonómico, se usaron valores numéricos que representan la actividad del sistema nervioso autonómico asignados por dicho sistema (calculándose los valores numéricos usando LF, HF y similares por dicho sistema).

La FIG. 11 muestra cambios en el equilibrio del sistema nervioso autonómico. En la figura, un valor numérico más cercano a cero indica un mejor equilibrio del sistema nervioso autonómico. En el grupo
45 P (el grupo placebo), el equilibrio del sistema nervioso autonómico en el último día del estudio empeoró, en comparación con el de antes del comienzo del estudio. Por otro lado, en el grupo A (el grupo con el producto obtenido mediante el tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente), el equilibrio del sistema nervioso autonómico en el último día del estudio mejoró significativamente, en comparación con el de antes del inicio del estudio (* $p < 0,05$ frente a antes del inicio del estudio, $p < 0,01$ frente al grupo del placebo). Estos resultados demostraron que la toma del producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente mediante este Ejemplo, mejoraba el equilibrio del sistema nervioso autonómico.

La FIG. 12 muestra cambios en la actividad del sistema nervioso autonómico. En la figura, un valor numérico más alto indica una mayor actividad del sistema nervioso autonómico. En el grupo P (el
55 grupo del placebo), se encontró una disminución de la actividad del sistema nervioso autonómico en el último día del estudio, en comparación con la de antes del comienzo del estudio. Por otro lado, en el grupo A (el grupo con el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente), se encontró una actividad del sistema nervioso autonómico elevada el último día del estudio, en comparación con la de antes del comienzo del estudio. Estos resultados demostraron que la toma
60 del producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente mediante este Ejemplo, mejoraba la actividad del sistema nervioso autonómico.

A partir de lo anterior, se demostró que el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente que contenía el derivado de hidroximetilfurfural mediante este Ejemplo tenía un excelente efecto regulador del sistema nervioso autonómico.

(Ejemplo 10)

5 (Evaluación de la actividad inductora de la expresión del ARNm de HSP70 de un producto obtenido mediante tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático en la evaluación humana y clínica del efecto regulador del sistema nervioso autonómico del mismo)

Usando la cápsula obtenida llena con el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático, se llevó a cabo la evaluación de la actividad inductora de la expresión del ARNm de HSP70 en humanos y la evaluación clínica de un efecto regulador del sistema nervioso autonómico tal como se describe a continuación.

(Método para producir una cápsula llena de un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático)

15 A continuación, se da a conocer un método para producir una cápsula llena de un producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y un tratamiento enzimático para la ingesta humana. A los tallos de espárrago verde (peso fresco 130 kg), se añadió agua 170L; y la mezcla fue sometida a esterilización por calor (100 °C, 45 minutos) para el tratamiento térmico con agua caliente. Después de dejar enfriar a 45 °C, al resultante se le añadió 3,0 kg de enzimas (Sumizyme C y Sumizyme MC; fabricadas por Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.) y se agitó a

20 45 °C, durante 24 horas. Las enzimas fueron a continuación desactivadas (100 °C, 20 minutos); y se llevó a cabo la centrifugación. El resultante fue concentrado mediante un evaporador, se añadió 9,0 kg de excipiente (nombre del producto: Pinedex, fabricado por Matsutani Chemical Industry Co., Ltd.) y se esterilizó en autoclave (121 °C, 45 minutos). Posteriormente, mediante secado por pulverización, se obtuvo un polvo que contenía el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático 16,0 kg (en este caso, el producto obtenido por tratamiento

25 térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático derivado del contenido sólido de tallo de espárrago fue de 7,0 kg y el excipiente 9,0 kg). Este polvo conteniendo el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático 8,50 kg fue mezclado con un agente antiaglomerante (nombre del producto: estearato de calcio, fabricado por Sun Ace Corporation) 1,86 kg y celulosa (nombre del producto: Ceolus, fabricado por Asahi Kasei Corp.) 8,20 kg para preparar un polvo para cápsulas que contiene 20 % del producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático derivado del contenido sólido del tallo de espárrago. Fue usado uno obtenido al llenar este polvo para cápsulas en la cápsula N.º 1 a razón de 280 mg por cápsula como una cápsula llena con el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático.

(Método de evaluación)

Veinte voluntarios que expresaron voluntariamente su intención de participar fueron empleados como sujetos; y se realizó un estudio aleatorizado a corto plazo, controlado con placebo, a dosis baja. Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a un grupo placebo (en lo sucesivo denominado grupo P) 10 sujetos o a un grupo con un producto obtenido mediante tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático (en lo sucesivo denominado grupo E) 10 sujetos. Durante una semana durante el período de estudio, los sujetos del grupo P tomaron una cápsula de placebo (un total de 840 mg de la mezcla del nombre del producto: Pinedex (fabricado por Matsutani Chemical Industry Co., Ltd.) 699,9 mg y nombre del producto: extracto de malta (Oriental Kogyo) 140,1 mg (3 cápsulas)/día) todos los días, mientras que los sujetos del grupo E tomaron la cápsula llena con el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático (840 mg (3 cápsulas)/día) después de la cena todos los días (en 840 mg de dicha cápsula llena de producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático, el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático derivado del contenido sólido del tallo de espárrago representaba 168 mg y los 672 mg restantes correspondían a Pinedex, estearato de calcio y Ceolus). Como criterios de valoración se utilizaron la cantidad de expresión del ARNm de HSP70 en los glóbulos blancos, el equilibrio del sistema nervioso autonómico y la actividad del sistema nervioso autonómico.

55 (Evaluación de actividad inductora de expresión del ARNm de HSP70)

En primer lugar, se midió el nivel de expresión del ARNm de HSP70 en glóbulos blancos. Fue extraída sangre antes del comienzo del estudio y el último día del estudio; y el ARN total fue extraído de 400 µL de la sangre usando un kit de extracción de ARN (nombre del producto: Nucleo Spin RNA Blood, fabricado por Takara Bio Inc.). El método de síntesis de ADNc y la PCR se ajustaron al método descrito en el Ejemplo 8.

Los resultados son mostrados en la FIG. 13. En la FIG. 13, se presenta una relación (%) entre el nivel

de expresión del ARNm de HSP70 en los glóbulos blancos después de la finalización de la ingesta y antes del inicio de la ingesta. El nivel de expresión del ARNm de HSP70 en el grupo P (el grupo placebo) fue, en valor promedio, 175 % del observado antes del inicio de la ingesta. Por otro lado, el nivel de expresión del ARNm de HSP70 en el grupo E (el grupo con el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático) fue, en valor promedio, 278 % del observado antes del inicio de la ingesta; y la expresión aumentó (*p = 0,098 frente al grupo P). Estos resultados demostraron que, al tomar el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático mediante este Ejemplo, aumentaba notablemente la cantidad de expresión de ARNm de HSP70.

(Evaluación clínica del efecto regulador del sistema nervioso autónomo)

A continuación, se evaluó el equilibrio del sistema nervioso autónomo y la actividad del sistema nervioso autónomo utilizando un sistema de análisis de la aceleración de la onda de pulso (nombre del producto; Pulse analyzer plus TAS-9, fabricado por YKC Corporation) antes del inicio del estudio y el último día del estudio. Los detalles de la medición fueron los mismos que se han descrito en el Ejemplo 9.

La FIG. 14 muestra cambios en el equilibrio del sistema nervioso autónomo. En el grupo P (el grupo placebo), el equilibrio del sistema nervioso autónomo en el último día del estudio empeoró significativamente, en comparación con el observado antes del inicio del estudio (*p < 0,05 frente a antes del inicio del estudio). Por otro lado, en el grupo E (el grupo con el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático), el equilibrio del sistema nervioso autónomo en el último día del estudio mejoró, en comparación con el observado antes del inicio del estudio. Estos resultados demostraron que la toma del producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático mediante este Ejemplo, mejoraba el equilibrio del sistema nervioso autónomo.

La FIG. 15 muestra cambios en la actividad del sistema nervioso autónomo. En el grupo P (el grupo placebo), la actividad del sistema nervioso autónomo en el último día del estudio empeoró significativamente, en comparación con la observada antes del inicio del estudio (**p < 0,01 frente a antes del inicio del estudio). Por otro lado, en el grupo E (el grupo con el producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático), la actividad del sistema nervioso autónomo en el último día del estudio mejoró, en comparación con la observada antes del inicio del estudio. Estos resultados demostraron que la toma del producto obtenido por tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente y tratamiento enzimático mediante este Ejemplo, evitaba el deterioro de la actividad del sistema nervioso autónomo.

Como se ha descrito anteriormente, de acuerdo con la presente invención, se puede proporcionar un nuevo derivado de hidroximetilfurfural, un producto farmacéutico regulador del sistema nervioso autónomo altamente eficaz. Además, se puede elaborar un método para producir un derivado de hidroximetilfurfural que puede reducir el costo y es simple y conveniente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AMINO UP CHEMICAL CO., LTD.

<120> Derivados de hidroximetilfurfural

<130> 12F096-PCT

<150> JP2011-277926
< 151> 2011-12-20

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
< 211> 20
< 212> ADN
< 213> Cebador directo de HSP70

<400> 1
GCATTCCTA GTATTTCTGT TTGT 24

<210> 2
< 211> 20

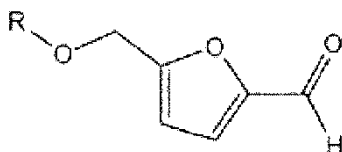
ES 2 743 716 T3

	< 212> ADN		
	< 213> Cebador inverso de HSP70		
5	<400> 2 AATAGTCGTA AGATGGCAGT ATA	23	
	<210> 3		
	< 211> 19		
10	< 212> ADN		
	< 213> Cebador directo de microglobulina beta 2		
	<400> 3 TAGCTGTGCT CGCGCTACT	19	
15	<210> 4		
	< 211> 20		
	< 212> ADN		
	< 213> Cebador inverso de microglobulina beta 2		
20	<400> 4 AGTGGGGTG AATTCAGTGT	20	
	<210> 5		
	< 211> 20		
25	< 212> ADN		
	< 213> Cebador directo de HSP70		
	<400> 5 CAAGATCACC ATCACCAACG	20	
30	<210> 6		
	< 211> 20		
	< 212> ADN		
	< 213> Cebador inverso de HSP70		
35	<400> 6 CTCAAAC TCG TCCTTCTCGG	20	

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de hidroximetilfurfural representado por la fórmula general:

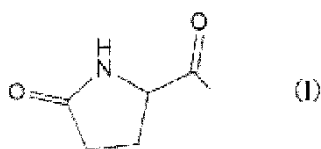
[FÓRMULA 1]



5

en la que R posee la siguiente fórmula general

[FÓRMULA 2]



10

2. El derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso como un regulador del sistema nervioso autonómico, es decir, un agente el cual regula el equilibrio entre el sistema nervioso simpático y el sistema nervioso parasimpático en trastornos del sistema nervioso autonómico, incluida una disautonomía.

15

3. Un producto farmacéutico que comprende el derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la reivindicación 1, como un componente activo.

4. Un método para producir el derivado de hidroximetilfurfural de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la etapa de tratamiento térmico de un tallo de espárrago con agua caliente.

20

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además la etapa de un tratamiento enzimático.

FIG. 1

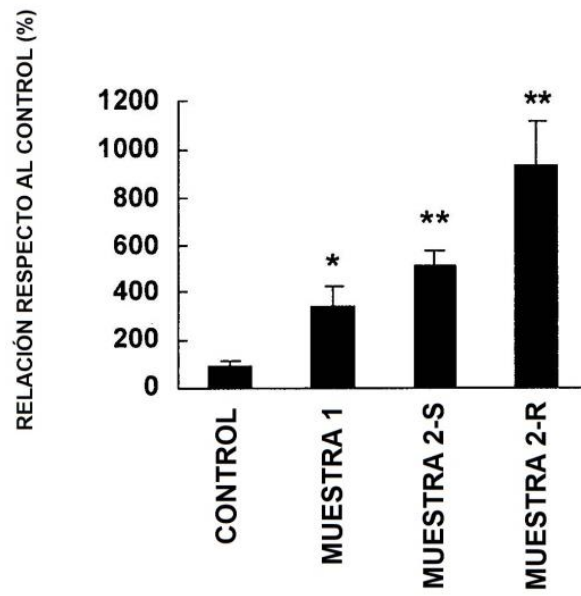


FIG. 2

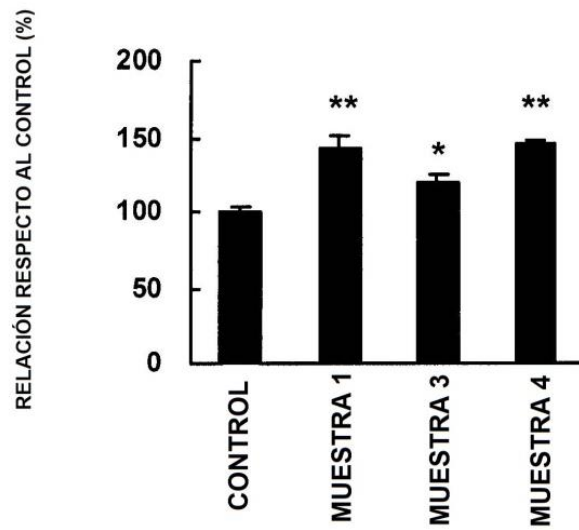


FIG. 3

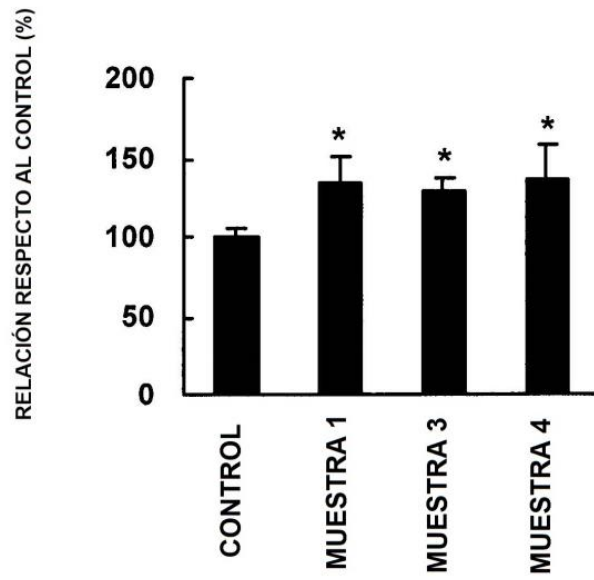


FIG. 4

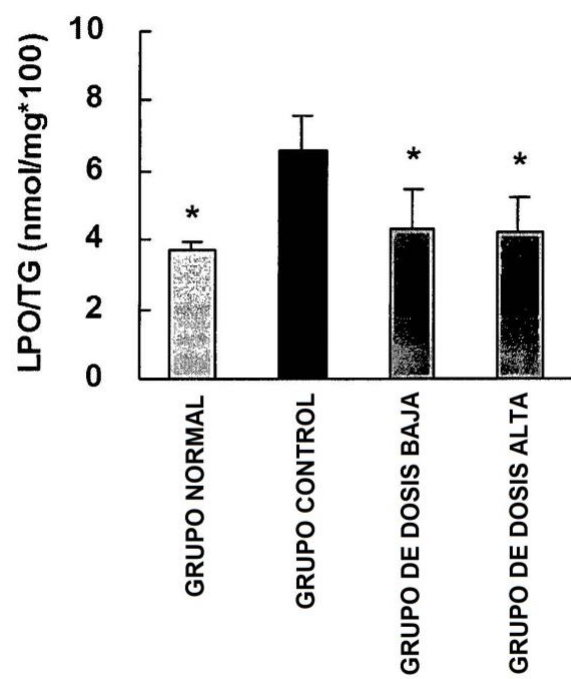


FIG. 5

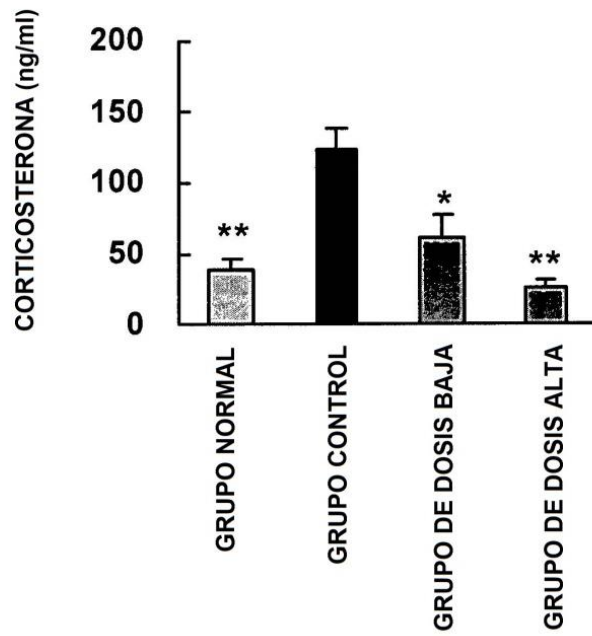


FIG. 6

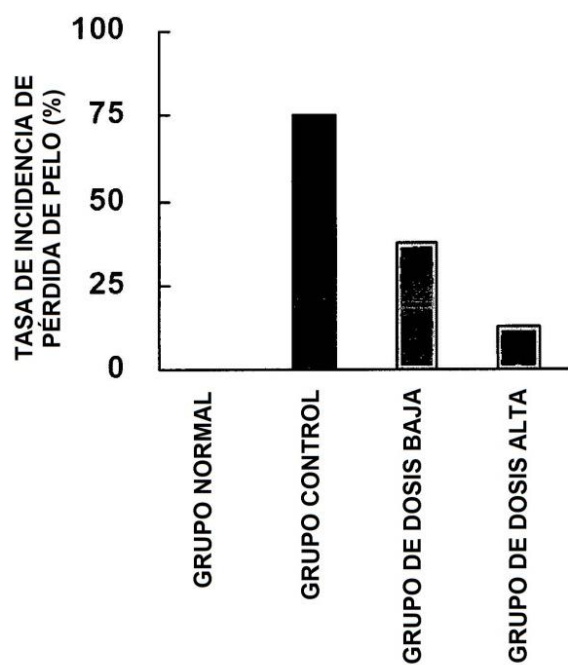


FIG. 7

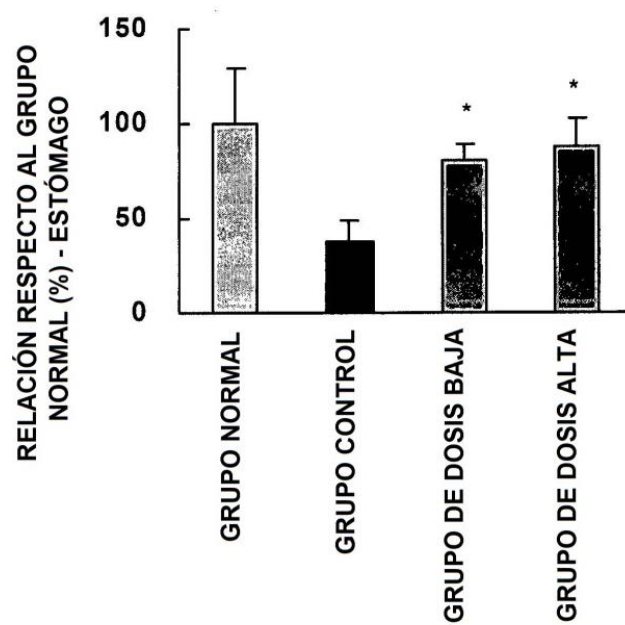


FIG. 8

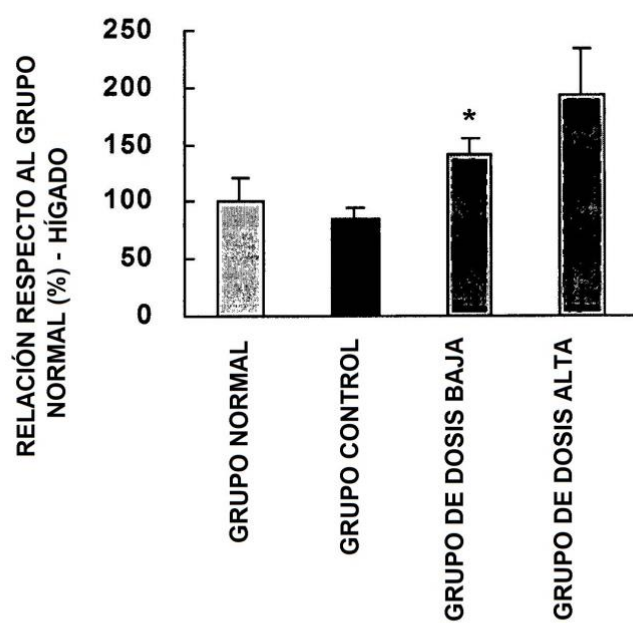


FIG. 9

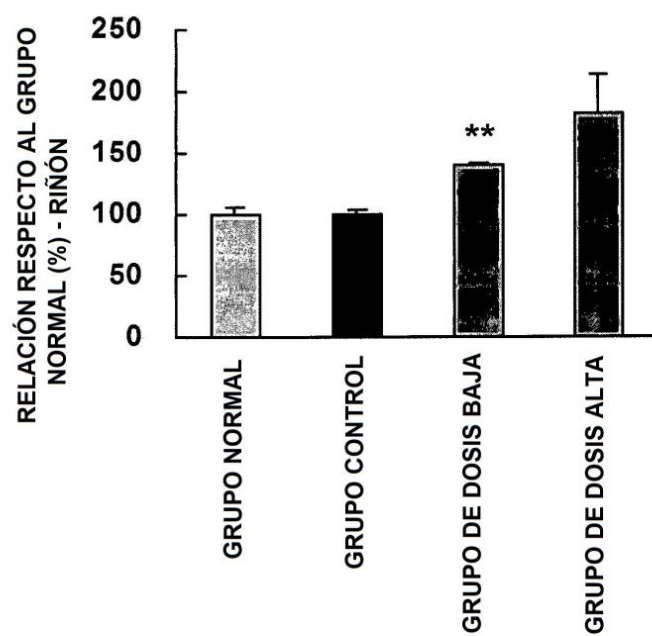


FIG. 10

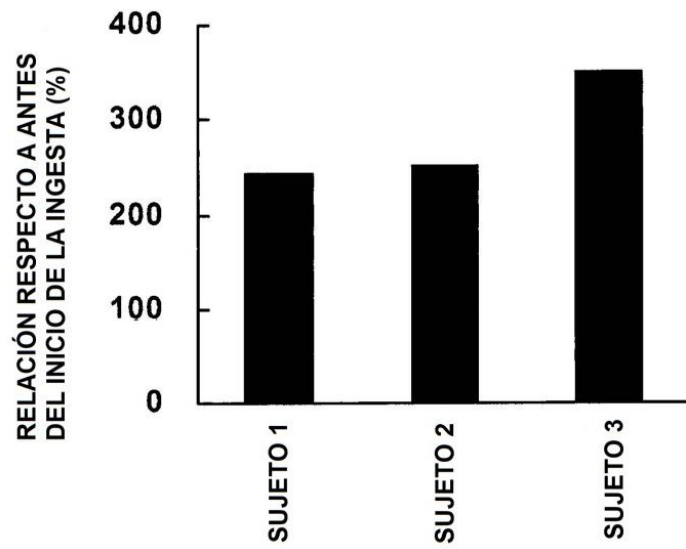


FIG. 11

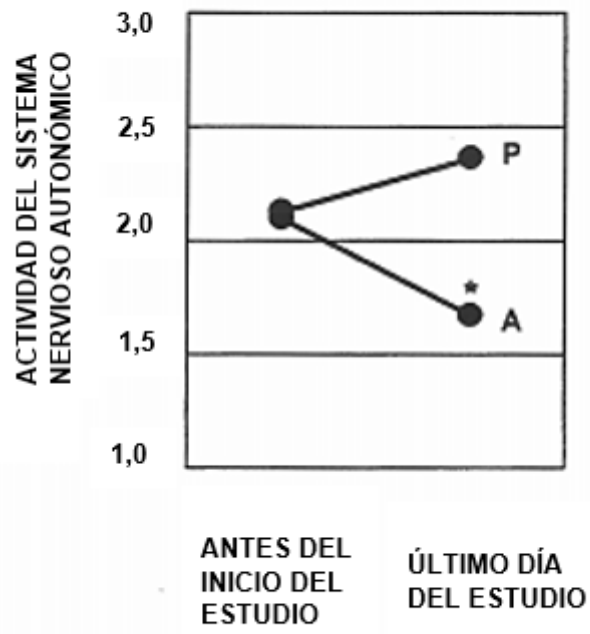


FIG. 12

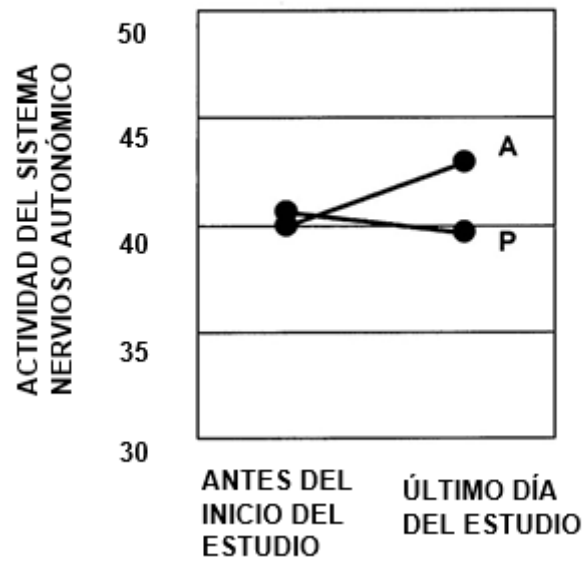


FIG. 13

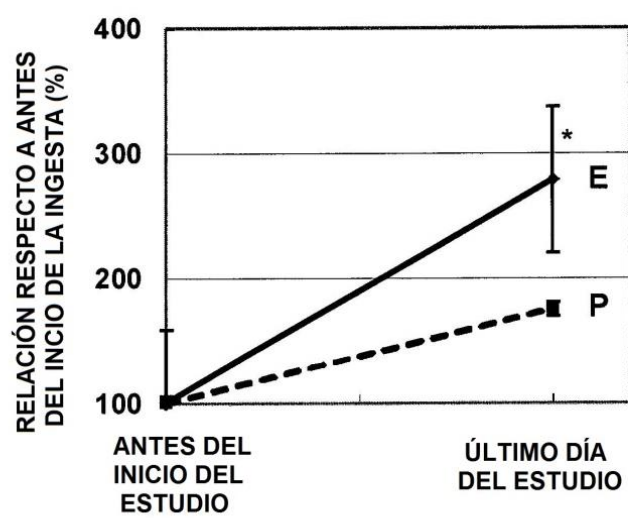


FIG. 14

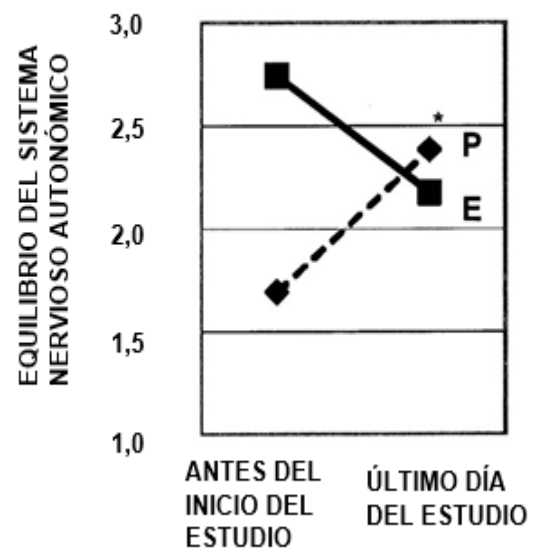
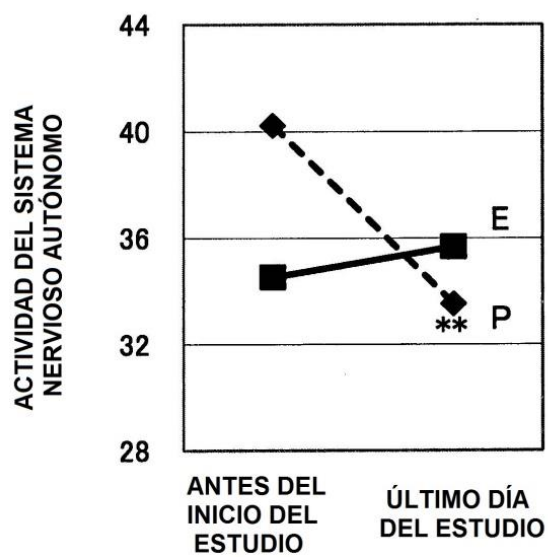


FIG. 15



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- JP 2007045750 A [0008]
- JP 2007230870 A [0008]
- JP 2011153125 A [0008]
- JP 2011277926 A [0120]

Bibliografía no especificada en la descripción de la patente

- XIAO-RONG CHANG et al. *World J Gastroenterol*, 2007, vol. 13 (32), 4355-4359 [0009]
- SARAH M. et al. *FASEB J.*, 2008, vol. 22, 3836-3845 [0009]
- HIRATA I et al. *Digestion*, 2009, vol. 79 (4), 243-50 [0009]
- TADASHI NISHIDA et al. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 2010, vol. 46 (1), 43-51 [0009]
- DAI YAN et al. *Cell Stress & Chaperones*, 2004, vol. 9 (4), 378-389 [0009]