

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6  
B6

本案已向：

國(地區)	申請專利，申請日期：	案號：	， <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無主張優先權
日本	1999年02月19日	特願平11-042236	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無 主張優先權
日本	1999年04月15日	特願平11-108499	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無 主張優先權
日本	1999年09月17日	特願平11-264539	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無 主張優先權

有關微生物已寄存於： 寄存日期： 寄存號碼：

裝  
訂  
線

## 五、發明說明( 1 )

## 發明之領域

本發明係有關於對需要細胞成長因子之產生增強之疾病有效的醫藥、製劑或者飲食品。

## 發明之背景

成長因子係在微量下即可促進細胞之成長、增殖的一群物質，亦被稱為增殖因子，其係進行細胞之增殖、伸長、肥大、分化等的控制。成長因子的生理機能已知有成長促進作用、胰島素型式作用、同化作用、骨形成作用、細胞增殖促進作用、神經營養因子型式作用、紅血球生成素型式作用、子宮內發育促進作用、腎血流增加、腎細胞保護作用、免疫增強作用等，從而可以期待適用於成長荷爾蒙失調症、糖尿病、異化狀態的改善、骨質疏鬆症、必須修復組織之疾病、神經變性疾病、貧血、子宮內發育不全、腎不全、免疫不全症等之疾病。

成長因子適用於疾病時，一般可以將成長因子以外部投與之方式進行，但是欲大量取得成長因子有其困難性。又，胜肽性成長因子雖可以基因工程製備，然所得到之成長因子常敏感度低而需要大量投與，而由於大量投與之結果，伴隨著發熱及食慾不振等的各種副作用。

被部分切除之肝臟，可迅速地再生並恢復原來的大小。此種肝臟再生因子之實體，多年以來都不清楚，其後才由重度肝炎疾病的血漿中找到該肝細胞增殖因子(hepatocytogrowth factor: HGF)，由該疾病血漿中分離並加以純化[Gohda, E. et al. J. Clin. Invest., 88:414-419 (1988)]。進一

## 五、發明說明( 2 )

步，人類HGF之cDNA亦被選殖成功，並解出了該HGF的1級構造[Miyakawa, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 163: 967-973 (1989)]。又，吾人亦了解了使細胞之運動性亢進之史凱特因子(scatter factor (SF))以及腫瘤細胞障礙因子(tumor cytotoxic factor (TCF))係與HGF為相同物質[Weidner, K. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7001-7005 (1991); Shima, N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 180: 1151-1158 (1991)]。

HGF不只肝細胞，亦會促進膽管上皮細胞、腎尿細管上皮細胞、胃黏膜細胞等許多上皮細胞之增殖。又，HGF可以誘導上皮細胞之運動性亢進、以及血管新生、上皮細胞之管腔形成之類的型態形成，而為一具有極為豐富多彩之生理活性之機能活性物質。亦即，HGF在各種器官中，可促進其在修復該器官傷害時之上皮細胞之增殖，進而進行誘導運動性亢進以及血管新生等的型態形成之誘導。

HGF具有肝細胞增殖作用、蛋白質合成作用、膽汁阻塞改善作用、甚至由於藥劑所導致之腎傷害預防作用。基於這些事實，吾人甚為期待HGF可作為一重度肝炎、肝硬化以及肝內膽汁阻塞之治療劑。然而，HGF本身目前則尚未達到作為治療劑之實用化程度。進一步，吾人亦嘗試了以基因治療來導入HGF之基因的方法，然而因為會在不必要的時期、場所產生副作用，因此亦距離實用階段尚遠。

人類的智慧功能、記憶、感情、行動等的精神活動上之維繫主要係由神經細胞負責。基於這些精神活動上之神經

## 五、發明說明 ( 3 )

細胞的分化、生存、功能表現，一般咸認各種神經細胞上皆需要特異性之神經性營養因子，但目前則無法測知其所在何處。唯一了解其存在以及功能者，係神經成長因子(以下稱為NGF)。由於NGF為前腦基底部之大細胞性膽鹼能神經細胞之神經性營養因子，因此其被認為與阿茲海默氏型癡呆症有相當之關聯(Pharmacia, Vol.22, No.2, 147-151 (1986); 老年精神醫學, Vol.3, No.6, 751-758 (1986))。

所謂阿茲海默氏型癡呆症，其常伴隨著發育障礙、巢症狀、下肢之僵硬痙攣、癲癇型發作等的臨床症狀，是一種老人性斑、阿茲海默氏原纖維變化等病理學上可察見之疾病，為老年性癡呆症之一病型。最近由於高齡化社會之傾向日益明顯，社會普遍地十分關心，但是尚未找出任何症狀之改善法以及治療法。

阿茲海默氏型癡呆症疾病的腦中，可發現以麥尼爾特基底核為中心之前腦基底部上有顯著之變性，以及乙醯膽鹼基轉移酵素(CAT)活性顯著降低之病狀[Annu. Rev. Neurosci., 3:77 (1980)]。1985年在一使用大鼠腦之研究中，明瞭NGF係在腦之此部位的神經性營養因子[EMBO J., 4: 1389 (1985)]，NGF因此被認為與本疾病有著十分之關聯性存在。又，抗亨頓氏舞蹈症疾病的腦纖維體中，GABA控制性神經細胞的脫落之同時，膽鹼能性神經細胞的脫落亦十分顯著，因此明瞭NGF亦可能作用於纖維體之內在性膽鹼能性神經細胞上[Science, 234: 1341 (1986)]、從而指出本疾病與NGF有著相當之關聯性。再者，在各種神經疾病

## 五、發明說明( 4 )

模式的大鼠等動物中研究其NGF之效果，發現如果在大鼠的神經細胞顯著變性前將NGF投與至腦內時，可以終止該變性，並防止CAT活性之降低[J. Neurosci., 6: 2155 (1986) ; Brain Res., 293:305 (1985) ; Science, 235: 214 (1986) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 9231 (1986)]。又，吾人亦證明了NGF於末梢交感神經支配組織以及腦中被生合成，且末梢組織或腦組織的間質細胞之纖維芽細胞或亞斯脫洛格利亞細胞對於該NGF之生合成係扮演重要之角色。[J. Biol. Chem., 259:1259 (1984) ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 136: 57 (1986)]。此外，亦證明由此纖維芽細胞以及亞斯脫洛格利亞細胞所產生之NGF的抗原性、分子量、等電點以及生物活性，與過去時常被研究之顎下腺NGF係相同者。而且，並發現若將各種神經傳導物質加入纖維芽細胞(L-M細胞)以及亞斯脫洛格利亞細胞之培養液中，兒茶酚胺(降腎上腺素、腎上腺素、多巴胺)將具有NGF合成促進效果(J. Biol. Chem., 201: 6039 (1986) ; FEBS Lett., 208: 258 (1986))。

由此，吾人正在期待針對NGF可作為神經營養因子所作用的部位有變性之這些神經疾病上，將NGF作為終止其變性之治療藥。又，若因腦血管障礙、腦腫瘤、腦尖、頭部外傷變性疾病、麻醉藥品中毒等一旦導致腦神經細胞變性時，其並無法回復，其結果不只造成智慧功能降低、記憶障礙外，甚至有感情障礙、行動異常等各種障礙產生，然而，神經纖維則有可塑性，當其受到損傷時，該神經纖維

## 五、發明說明( 5 )

附近之健康的纖維會發芽，受傷的突觸會改變成為新的突觸，吾人正在期待此時是否可以將NGF當作促進神經功能之修復再生的治療劑使用。

然而，若欲將NGF應用於各種神經疾病之治療使用時，NGF一定要到達NGF所必須之神經細胞的緊鄰處才可，即使是中樞神經疾病亦必須將NGF送至腦細胞的患部，但事實上NGF卻無法通過血管系統送至腦內部。其原因係，腦內的血管內皮細胞乃彼此緊密地結合(其被稱為腦血液關門)，水、氣體、脂溶性物質以外之物質若欲由血液輸至腦組織時，高分子物質之蛋白質(包含NGF等)是完全無法通過腦血液關門的。若欲將NGF以外科的技術直接投與至腦內時，以目前的技術而言又太過危險。

為預防或治療成長因子的失調疾病，吾人可以不投與成長因子但卻在生體內誘導該成長因子，此時由於不會有成長因子投與所造成之異常的副作用，所以是一種安全的疾病之治療或預防法。

舉例而言，若不是由體外投與HGF，而在生體內任意地誘導HGF時，則其在肝炎、肝硬化、肝內膽汁阻塞等的HGF表現增強上所必須之疾病的治療及預防上為有效。

又，藉由將誘導NGF之物質投與在腦內的NGF產生細胞上，已經可以在試管內將上述所得到之成果作為治療藥劑使用。

## 發明之目的

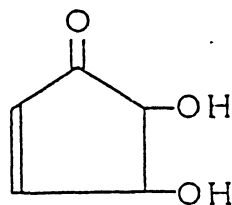
本發明之目的係提供一具有天然物衍生之高安全性成長

## 五、發明說明( 6 )

因子產生增強能力、及/或白血球間素-12產生增強能力之化合物，並提供一對於需要成長因子產生增強之疾病之治療或預防方面有用的醫藥以及飲食品。

## 發明之要旨

本發明大概言之，本發明的第1個發明係關於一種需要成長因子產生增強之疾病及/或需要白血球間素-12產生增強之疾病之治療劑或預防劑，其特徵為含有由下式(I)所表示之4,5-二羥基-2-環戊烯-1-酮、4-羥基-2-環戊烯-1-酮以及彼等之衍生物中所選出之化合物作為有效成分。



(I)

本發明之第2個發明係關於一種成長因子產生增強劑及/或白血球間素-12產生增強劑，其特徵為含有由式(I)所表示之4,5-二羥基-2-環戊烯-1-酮、4-羥基-2-環戊烯-1-酮以及彼等之衍生物中所選出之化合物作為有效成分。

本發明之第3個發明係關於一種成長因子產生增強用及/或白血球間素-12產生增強用食品、或成長因子產生增強用及/或白血球間素-12產生增強用飲料，其特徵為含有、稀釋及/或添加由式(I)所表示之4,5-二羥基-2-環戊烯-1-酮含有物、4-羥基-2-環戊烯-1-酮含有物、4,5-二羥基-2-環戊烯-1-酮衍生物含有物及4-羥基-2-環戊烯-1-酮衍生物含有物中所選出

## 五、發明說明( 7 )

之化合物作為有效成分。

本發明者們係發現由式(I)所表示之4,5-二羥基-2-環戊烯-1-酮、4-羥基-2-環戊烯-1-酮以及彼等之衍生物中所選出之化合物，具有成長因子產生增強以及白血球間素-12產生增強之效用，從而完成本發明。

## 附圖之簡單說明

圖1：表示加熱溫度與4HCP生成量之關係。

圖2：表示加熱溫度與4HCP生成量之關係。

圖3：pH與4HCP生成量之關係。

圖4：表示加熱溫度與4ACP生成量之關係。

圖5：表示加熱溫度與4GCP生成量之關係。

圖6：表示加熱溫度與4ACP生成量之關係。

圖7：表示加熱溫度與4GCP生成量之關係。

圖8：pH與4ACP生成量之關係。

圖9：pH與4GCP生成量之關係。

圖10：加熱時間與4,5-二羥基-2-戊烯醇生成量之關係。

## 發明之詳細說明

以下，將本發明具體地加以說明。

本發明之4,5-二羥基-2-環戊烯-1-酮(以下，只稱為環戊烯)之製造方法可使用任何方法皆可，可以化學合成法[碳水化合物研究(Carbohydrate Res.)、第247卷、第217~222頁(1993)、Helvetica Chimica Acta第55卷、第2838~2844頁(1972)]合成，又，亦可使用由糖醛酸、糖醛酸衍生物、含有糖醛酸及/或糖醛酸衍生物之糖化合物、含有糖醛酸及/或



## 五、發明說明( 8 )

糖醛酸衍生物之糖化合物含有物中選擇出至少一種物質之加熱處理物中所生成之環戊烯酮、其純化物。本發明可使用含有環戊烯酮的這些加熱處理物、其部分純化物以及純化物。又，這些係記載於WO 098/13328號公報，茲將該公報之內容在此處加入以供參考。

又，環戊烯酮含有物並無特定之限制，含有環戊烯酮之上述加熱處理物、其部分純化物在本發明的第3發明中係特別適於使用。

本發明之4,5-二羥基-2-環戊烯-1-酮衍生物(以下只稱為環戊烯衍生物)係指環戊烯衍生物，其只要為具有成長因子產生增強能及/或白血球間素-12產生增強能之物質則無其他限制，茲以下式(II)~(V)所表示之環戊烯衍生物為例。

本發明之4-羥基-2-環戊烯-1-酮(以下，稱為4HCP)之製造方法可使用任何方法皆可，亦可以使用化學合成法。其習知之合成法有，田中(Tanaka, T.)等的方法[四面體(Tetrahedron)、第32卷、第1713頁(1976)]、奈良(Nara, M.)等的方法[四面體(Tetrahedron)、第36卷、第3161頁(1980)]，以及吉爾(Gill, M.)等的方法[Australian Journal of Chemistry (Aust. J. Chem.)、第34卷、第2587頁(1981)]。這些方法在合成階段都十分複雜，回收率低，並非效率良好之製造方法。藉由將4-環戊烯-1,3-二酮以氯化銻(III)及氫化硼鈉進行還原，可以在第一階段得到高產率之4HCP。

又，亦可以使用由戊糖、戊糖衍生物、含有戊糖之化合物、以及含有戊糖衍生物之化合物中所選出之至少1種的物

裝  
訂  
線

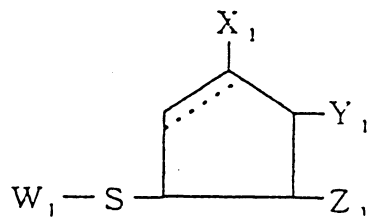
## 五、發明說明( 9 )

質之加熱處理物中所生成之4HCP、及其純化物，而在本發明中係使用含有4HCP的這些加熱處理物、其部分純化物以及純化物。又，這些並已經記載於WO 99/36383號公報中，茲將該說明書之內容在此加入以作為參考。

又，所謂之4HCP含有物並無特別之限制，但含有4HCP之上述加熱處理物、其部分純化物則特別適合於本發明之第3發明中使用。

又，所謂之4HCP衍生物係指4HCP的衍生物、其只要為具有成長因子產生增強能及/或白血球間素-12產生增強能之物質即可並無特別之限制，例如下述式(VI)、(VII)所表示之衍生物。又，由戊糖、戊糖衍生物、含有戊糖之化合物、以及含有戊糖衍生物之化合物中所選出之至少1種的物質之加熱處理物中所生成之4-(9-腺苷基)-2-環戊烯-1-酮(以下稱為4ACP)、4-(9-脛基)-2-環戊烯-1-酮(以下稱為4GCP)、及其純化物，本發明中可使用含有4ACP及/或4GCP之這些加熱處理物、其部分純化物以及純化物。

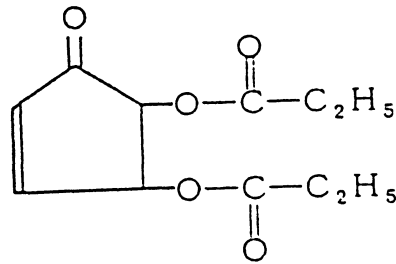
又，本發明可使用這些環戊烯酮衍生物含有物、4HCP衍生物含有物。又，亦可使用環戊烯酮、環戊烯酮衍生物、4HCP、4HCP衍生物之各種光學活性體或彼等之鹽。



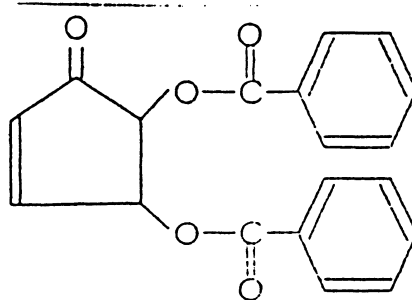
( I )

## 五、發明說明 ( 13 )

關於式(VIII)所表示之環戊烯酮衍生物係詳細記載於WO 98/40346號公報、PCT/JP99/04323號說明書中，其可藉由將環戊烯酮與具有脂肪族基、芳香族基或芳香脂肪族基之碳酸及/或其反應衍生物，同時地或依序地反應而獲得。該環戊烯酮衍生物之例子有二乙醯基環戊烯酮、二苯甲醯基環戊烯酮、二己醯基環戊烯酮、二肉苈蔻醯基環戊烯酮、二辛烷基環戊烯酮、二-3-辛烯基環戊烯酮、二丁醯基環戊烯酮、二十癸醯基環戊烯酮、二戊醯基環戊烯酮、二丙醯基環戊烯酮、二-2-己烯醯基環戊烯酮、二異丁醯基環戊烯酮、二甲氧基乙醯基環戊烯酮、甲氧基反丁烯二醯基環戊烯酮、甲氧基順丁烯二醯基環戊烯酮等。下式(XII)係表示二丙醯基環戊烯酮之構造。又，下式(XIII)係表示二苯甲醯基環戊烯酮之構造。



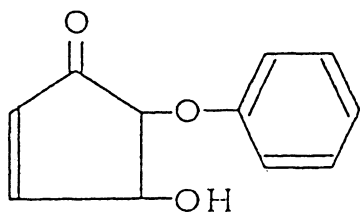
(XII)



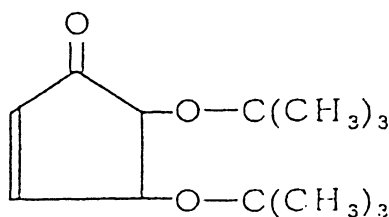
(XIII)

## 五、發明說明 ( 14 )

關於式(IV)所表示之環戊烯酮衍生物係詳細記載於WO 99/00349號公報說明書中，其可藉由將環戊烯酮與具有脂肪族基、芳香族基或芳香脂肪族基之醇類及/或其反應衍生物，同時地或依序地反應而獲得。該環戊烯酮衍生物之例子有4-苄基環戊烯酮醚、5-苄基環戊烯酮醚、4,5-二苄基環戊烯酮醚、4-t-丁基環戊烯酮醚、5-t-丁基環戊烯酮醚、4,5-二-t-丁基環戊烯酮醚。下式(XIV)係表示5-苄基環戊烯酮醚之構造。又，下式(XV)係表示4,5-二-t-丁基環戊烯酮醚之構造。



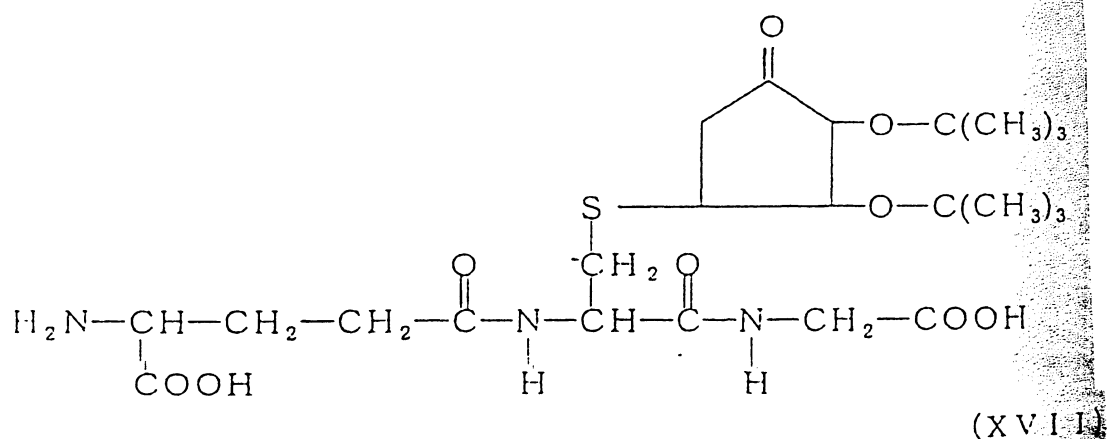
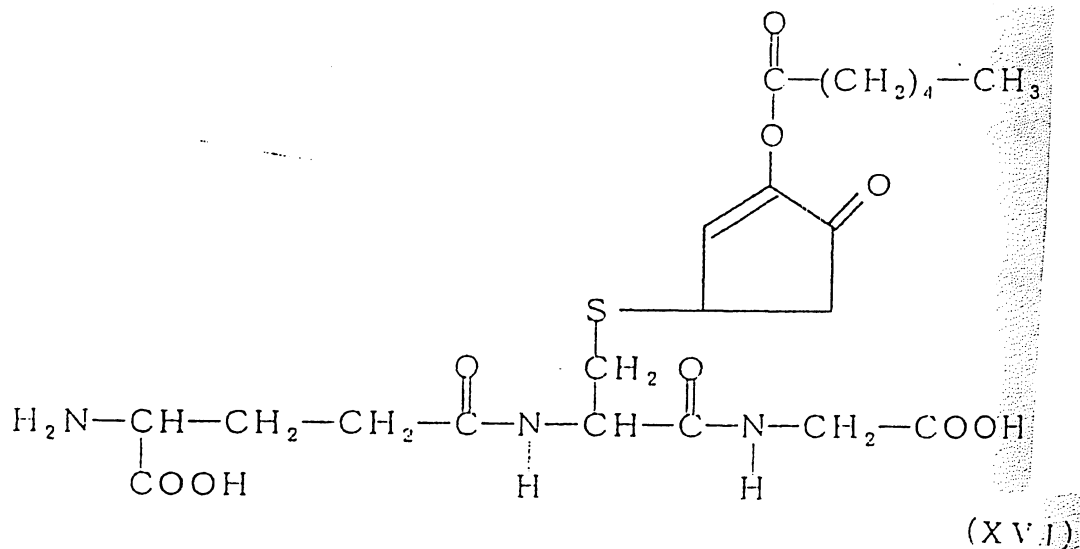
(XIV)



(XV)

## 五、發明說明 ( 15 )

關於式(V)所表示之環戊烯酮衍生物係詳細記載於PCT/JP99/04324號說明書中，其可藉由將式(III)所表示之化合物或者式(IV)所表示之化合物與例如半胱氨酸、谷胱甘肽等SH基含有化合物反應而獲得。該環戊烯酮衍生物含有物可以獲得。下式(XVI)、(XVII)係各自表示該衍生物之構造之例子。



式(VI)所表示之4HCP衍生物可藉由將4HCP與具有脂肪族基、芳香族基或芳香脂肪族基之碳酸及/或其反應衍生物反



## 五、發明說明 ( 17 )

由來成長因子、眼由來成長因子、精囊由來成長因子、賽脫利細胞由來成長因子、乳腺刺激因子、脊髓由來成長因子、巨噬細胞由來成長因子、回間葉成長因子、形質轉換增殖因子- $\alpha$ 、形質轉換增殖因子- $\beta$ 、肝素結合性EGF型式增殖因子、安斐列格林素、SDGF、潘塔賽林素、愛比格林素、新列格林素1、2、3、血管內皮增殖因子、新洛特分素、BDNF、NT-3、NT-4、NT-5、NT-6、NT-7、格利亞細胞株由來神經營養因子、幹細胞因子、密德細胞素、普來爾特洛分素、Ephrin、Angiopoietin、愛格丁素、腫瘤壞死因子、干擾素等。

HGF具有肝細胞增殖作用、蛋白質合成促進作用、膽汁阻塞改善作用、甚至由藥劑導致之腎障礙之預防作用。又，HGF之mRNA亦可以在腦、腎臟、肺臟等合成，即使在肝實質細胞、腎細尿管細胞、表皮細胞等亦有增殖活性，而為中胚葉性細胞成長因子。因此，藉由肝細胞增殖因子產生之增強，可以治療或預防肝炎、重症肝炎、肝硬化以及肝內膽汁阻塞、慢性腎炎、肺炎、創傷等。

NGF係內因性的成長因子，其維持神經細胞之生存及機能，根據NGF之濃度分配而伸長神經細胞，並藉由增強NGF之產生，而可以治療或預防阿茲海默氏症等的老年癡呆症以及末梢神經障礙、腦血管障礙、腦腫瘤、腦炎、頭部外傷變性疾病、麻醉藥物中毒等，進行所需要之神經機能的修復再生。

胰島素型式增殖因子在各種細胞上具有豐富多彩的生理

## 五、發明說明 ( 18 )

作用，藉由增強胰島素型式增殖因子之產生，而可以治療或預防II-型糖尿病(胰島素非依存性)以及成長障礙疾病(侏儒症)。又，由於胰島素型式增殖因子可以促進坐骨神經障礙中的坐骨神經之再生，而可以治療或預防肌肉萎縮性側索硬化症。

又，環戊烯酮、環戊烯酮衍生物、4HCP以及4HCP衍生物係具有白血球間素-12之產生增強能，由環戊烯酮、環戊烯酮衍生物、4HCP以及4HCP衍生物中所選出之化合物可以作為白血球間素-12之產生增強劑之有效成分。藉由該製劑本身的習知方法，可將之製劑化，並作為需要白血球間素-12產生增強之疾病之治療劑或預防劑。

干擾素 $\gamma$  (IFN $\gamma$ )係由T細胞(Th1)的T細胞受體(TCR)因抗原展示細胞(APC)等的刺激而產生，此時，可進一步由APC產生的白血球間素-12(IL-12)而被誘導產生。亦即，藉由IL-12產生之增強，誘導了IFN $\gamma$ 的產生，被誘導之IFN $\gamma$ 可在病毒、真菌感染、以及癌症疾病等上活化其細胞傷害性T細胞、NK細胞、巨噬細胞等的細胞性免疫，而作用於生體防禦能之增強。另外，藉由抑制過敏疾病中的Th2的活性化等發病原因，吾人咸認其應可有效地治療及預防氣喘、花粉症、異位性皮膚炎等。

進一步，環戊烯酮、環戊烯酮衍生物、4HCP以及4HCP衍生物具有肌肉增強作用，而可以提供以這些的化合物、該化合物含有物作為有效成分的肌肉增強劑。該化合物含有物並無特別之限制，例如藉由將含有戊糖的化合物之DNA



## 五、發明說明 ( 19 )

加熱處理所得到之高量含有該4HCP之DNA加熱處理物即可被使用。

又，關於肌肉增強作用，係以坐骨神經有壓銼傷、萎縮之肌肉，就其功能面上之量的恢復程度來評估。已有報告指出在這些模型實驗中，由障礙恢復之神經再生程度很大。在雞胎知覺神經節以及脊髓的組織培養實驗中，維生素B1及B12對於神經纖維之伸長有著明顯的促進作用，即使在坐骨神經壓銼模型中，亦有比目魚肌等的統計學上有意義之肌肉量的恢復效果之報告(Folia pharmacol. Japon. 74:721-734 (1978))。

然而，該DNA加熱處理物在上述之模型實驗中並無有效之報告，甚至亦無增強胰島素型式之增殖因子、以及增強HGF與NGF的產生，從而具有肌肉增強以及機能的恢復效果之報告。亦即，如本發明者所發現者，因為該DNA加熱處理物可增強胰島素型式之增殖因子、以及增強HGF與NGF的產生之故，不只肌肉萎縮性側索硬化症、包括需要胰島素型式之增殖因子之成長障礙、骨疏鬆症、糖尿病、腎不全等的治療及預防上均可使用。

由環戊烯酮、環戊烯酮衍生物、4HCP以及4HCP衍生物中所選擇出之化合物係具有成長因子產生增強能力以及白血球間素-12產生增強能力，因此以這些化合物作為有效成分可製造需要長成因子產生增強之疾病及/或需要白血球間素-12產生增強之疾病之治療劑或預防劑。又，亦可製造以該化合物作為有效成分之肌肉增強劑。

## 五、發明說明 ( 20 )

治療劑或者預防劑可以環戊烯酮、環戊烯酮衍生物、4HCP以及4HCP衍生物所選擇出之化合物作為有效成分，並將其與習知之醫療用載體組合而作成製劑。一般而言，可將該組合物配合使用於藥學上可接受之液狀或固體狀的載體，同時可根據需要加入溶劑、分散劑、乳化劑、緩衝劑、安定劑、賦型劑、結合劑、崩壞劑、潤滑劑，而作成錠劑、顆粒劑、散劑、粉末劑、膠囊劑等的固型劑、一般的液體劑、懸浮劑、乳劑等的液體劑。又，其在使用前可藉由添加適當之載體而得到非液狀之乾燥品。

該治療劑或預防劑可藉由經口劑、以及注射劑、點滴用劑等的非經口劑之任一者而投與。

醫藥用載體可配合上述之投與型態及劑型而選擇，若為經口劑時，則例如可配合澱粉、乳糖、白糖、甘露糖醇、羧基甲基纖維素、玉米澱粉、無機鹽等。又，在調配經口劑時，甚至可配合結合劑、崩壞劑、界面活性劑、潤滑劑、流動性促進劑、矯味劑、著色劑、香料等。

另一方面，若為非經口劑時，可根據一般方法將該治療劑或預防劑之有效成分之由環戊烯酮、環戊烯酮衍生物、4HCP以及4HCP衍生物中所選擇出之化合物作為稀釋劑之注射用蒸餾水、生理食鹽水、葡萄糖水溶液、注射用植物油、芝麻油、花生油、大豆油、玉米油、丙二醇、聚乙二醇等中不溶解而懸浮，若有需要時，可再加入殺菌劑、安定劑、等張化劑、無痛化劑等調製而成。

本發明之治療劑或預防劑，可根據製劑型態以適當之投

## 五、發明說明 ( 21 )

與管道投與。其並無特定之投與方法，內用、外用、注射用皆可。注射劑可以例如靜脈內、肌肉內、皮下、皮內等進行投與。外用劑可包含如座劑等。

治療劑或預防劑之投與量，可根據其製劑型態、投與方法、使用目的以及其所適用之疾病年齡、體重、症狀而適當地設定，此雖無固定，但一般而言，製劑中所含有之有效分量為成人1日 $10\mu\text{g} \sim 200\text{mg/kg}$ 。當然，投與量可根據各種條件來變動，有較上述投與量少之情形，也可能會有超過此範圍之必要情況出現。除直接將本發明之藥劑直接經口投與，亦可以在任何的飲食品中添加以為日常攝取之用。

含有本發明之由環戊烯酮、環戊烯酮衍生物、4HCP以及4HCP衍生物中所選擇出之化合物作為有效成分的成長因子產生增強劑及白血球間素-12產生增強劑，其可依據上述之治療劑或預防劑而製造、投與。該成長因子產生增強劑及白血球間素-12產生增強劑可以在成長因子之增強方法上使用，另外在成長因子之功能研究以及與成長因子相關之藥劑篩選探索上亦相當有用。

本發明之成長因子產生增強劑並無特定之限制，但例如有HGF產生增強劑、NGF產生增強劑、h-IGF產生增強劑等，其可作為需要HGF產生增強、NGF產生增強、h-IGF產生增強之疾病之治療劑或預防劑使用。

本發明之HGF產生增強劑之有效成分，其只要是使用由環戊烯酮、環戊烯酮衍生物、4HCP以及4HCP衍生物中所選

## 五、發明說明( 22 )

擇出之化合物即可，並無特別之限制，但其中則以具有環戊烯酮環之化合物最宜使用。又，本發明之HGF產生增強劑中，亦可含有例如IL-1、前列腺素E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>等由誘導HGF基因的轉錄、增強HGF產生之細胞激素、前列腺素類中所選擇出之物質。更適宜者，為本發明之HGF產生增強劑若為具有誘導HGF基因的轉錄之作用，則藉由在本發明之HGF產生增強劑上，含有促進HGF基因之mRNA轉譯以後之步驟、增強HGF產生作用之物質，可以提供一HGF產生可相乘性地增強之HGF產生增強劑。使該相乘效果表現之物質，只要是能促進HGF基因之mRNA轉譯以後之步驟、增強HGF產生作用之物質即可，並無特別之限制，例如肝素、肝磷脂硫酸、岩藻聚糖等的硫酸化多糖以及彼等之分解物等。又，亦可以含有具有HGF產生增強作用之生薑等由來之生薑醇、薑醇、鬱金香等由來之薑黃素等，或其之含有物等本發明之HGF產生增強劑。進一步，本發明之成長因子產生增強劑及/或白血球間素-12產生增強劑可以添加於任意之飲食品，而為日常之攝取亦可。

本發明之由環戊烯酮、環戊烯酮衍生物、4HCP以及4HCP衍生物中所選擇出之化合物作為有效成分之肌肉增強劑，其可根據上述之治療劑或預防劑而製造、投與。

由環戊烯酮含有物、環戊烯酮衍生物含有物、4HCP含有物以及4HCP衍生物含有物所選擇出之化合物作為有效成分之含有、稀釋及/或添加之成長因子產生增強用及/或白血球間素-12產生增強用食品、或成長因子產生增強用及/或白血

## 五、發明說明 ( 23 )

球間素-12產生增強用飲料之製造法，並無特別之限制，但根據調理、加工及一般使用之食品或飲料之製造法所製造者皆可，只要被製造出的食品或飲料中具有有效量之生理作用的由環戊烯酮含有物、環戊烯酮衍生物含有物、4HCP含有物以及4HCP衍生物含有物中所選擇出之化合物即可作為具有成長因子產生增強作用及/或白血球間素-12產生增強作用之機能性食品或飲料。

又，由環戊烯酮含有物、環戊烯酮衍生物含有物、4HCP含有物以及4HCP衍生物含有物所選擇出之化合物作為有效成分之含有、稀釋及/或添加之肌肉增強用食品或肌肉增強用飲料之製造法，並無特別之限制，但根據調理、加工及一般使用之食品或飲料之製造法所製造者皆可，只要被製造出的食品或飲料中具有有效量之生理作用的由環戊烯酮含有物、環戊烯酮衍生物含有物、4HCP含有物以及4HCP衍生物含有物中所選擇出之化合物即可，就可作為肌肉增強作用之機能性食品或或飲料。

在本發明所使用之環戊烯酮、環戊烯酮衍生物、4HCP以及4HCP衍生物，其即使投與具生理活性之有效量並無任何毒性。又，其含有物亦無任何之毒性。

舉例而言，若是經口投與時，環戊烯酮、GM、4HCP、二丙醯基環戊烯酮、二己醯基環戊烯酮、二-2-己醯烯基環戊烯酮、二異丁基環戊烯酮、二苯甲醯環戊烯酮、4-t-丁基環戊烯酮醚、4,5-二-t-丁基環戊烯酮醚或彼等之光學活性體或其鹽的任一者，即使單次投與時以100 mg/kg 投與至老鼠

## 五、發明說明 ( 24 )

中亦無任何死亡之例子。

## 實施例

以下，以實施例更具體地說明本發明，但本發明並不限定於這些實施例。又，實施例中之%係指重量%。

## 參考例 1

(1)將10克的D-葡糖醛酸(西格馬公司製 G 5269)溶解於1升的水中，在121°C下加熱4小時之後減壓下濃縮至10毫升為止。加入40毫升之醋酸丁基：醋酸：水=3：2：2混合液的上層予以混合之後，藉由離心將所得到之上清液在減壓下濃縮至約10毫升為止。

將上述萃取液進行管柱色層分析用矽凝膠BW-300 SP (2×28公分，富士西立西亞公司製)，將醋酸丁基：醋酸：水=3：2：2的上層當作溶離液以壓縮機加壓至0.2 kg/cm<sup>2</sup>，並以每分鐘5毫升之流速進行分離。該級分係以每1部分10毫升進行，取各部分之一部份以薄層色層分析法分析時，在61號至80號之部分含有高純度之環戊烯酮。將這些部分收集在減壓下濃縮後以40毫升之氯仿萃取，將萃取液藉由減壓下濃縮獲得100毫克之環戊烯酮。

將此部分以八爾巴克型式之S管柱(寶酒造公司製)以順相HPLC進行分離，再以215 nm之紫外線吸收檢測，純度為98%。

(2)將環戊烯酮30毫克、二甲基胺基吡啶(DMAP)16毫克、三甲基胺66毫克以及無水丙酸(東京化成工業社製造之P0513)86毫克溶解於5.9毫升之二氯甲烷，冰浴中使其反應1

## 五、發明說明 ( 25 )

小時。將該反應液以氯仿：甲醇=200：1當作展開溶劑藉由矽凝膠薄層色層分析法展開，再將 $R_f=0.5\sim 0.6$ 之部分的矽凝膠由薄層刮下，以氯仿萃取而獲得31毫克之二丙醯基環戊烯酮。

將所得到之二丙醯基環戊烯酮以核磁共振獲得以下之構造解析結果。

 $^1\text{H-NMR}$ 

$\delta 7.45$  (1H, dd,  $J_{2-3}=6.27\text{Hz}$ ,  $J_{3-4}=2.15\text{ Hz}$ , H-3)、 $6.42$  (1H, dd,  $J_{2-3}=6.27\text{ Hz}$ ,  $J_{3-4}=1.49\text{ Hz}$ , H-2)、 $5.91$  (1H, m, H-4)、 $5.16$  (1H, d,  $J_{4-5}=2.97\text{Hz}$ , H-5)、 $2.46$  (2H, dd,  $J=15.01$ ,  $7.59\text{ Hz}$ )、 $2.42$  (2H, dd,  $J=15.01$ ,  $7.59\text{Hz}$ )、 $1.18$  (6H, dd,  $J=7.59$ ,  $7.59\text{Hz}$ )

(3)將環戊烯酮之1M水溶液 $100\mu\text{l}$ 與200 mM谷胱甘肽(還原型：納克萊公司製：170-10)水溶液(pH 3.0) $500\mu\text{l}$ 混合，並於 $60^\circ\text{C}$ 下反應5小時。將該反應液以 $0.5\mu\text{m}$ 克斯默奈斯濾片(納克萊公司製)過濾，用以下之條件以HPLC分離。

管柱：TSK凝膠 ODS-80Ts( $5\mu\text{m}$ )、 $20\text{ mm}\times 25\text{ cm}$  (東碩公司製)

移動相：A 0.1%三氟醋酸(TFA)水溶液

B 0.1%TFA/50%乙腈水溶液

流速：7.5毫升/分鐘

梯度：10分鐘移動相A→經55分鐘由移動相A至A：B=1：

1→經15分鐘由移動相A：B=1：1至移動相B

檢測：220 nm之吸光度

## 五、發明說明 ( 26 )

以上述反應液 200  $\mu$ l 進行 HPLC，分別取該滯留時間 35.7 分鐘、36.1 分鐘之峰部，並於減壓下濃縮乾燥，獲得 5.5 毫克之乾燥物。

解析此乾燥物之構造。測定其核磁共振(NMR)之光譜，質譜儀(MS)之光譜。其結果表示如以下。

 $^1\text{H-NMR}$ 

$\delta$ 2.09 (2H, m, 5'-H)、2.28 (1H, dd, J=13.0, 20.0 Hz, 5-H)、2.44 (2H, m, 4'-H)、2.78 (1H, dd, J=8.5, 14.0, 1'-H)、2.85 或 2.89 (1H, dd, J=3.0, 6.0 Hz, 5-H)、2.92 或 2.95 (1H, dd, J=1.0, 5.5 Hz, 1'-H)、3.86 (2H, s, 9'-H)、3.95 (2H, m, 4-H, 6'-H)、4.46 (1H, m, 2'-H)、6.47 或 6.49 (1H, d, J=3.0 Hz, 3-H)

試料係溶解於 0.1N 之 DC 1 重水溶液中，將 HOD 之化學遷移值以 4.65 ppm 表示。

 $^{13}\text{C-NMR}$ 

$\delta$ 26.3 (5'-C)、31.7 (4'-C)、31.9 或 32.1 (1'-C)、39.3 (4-C)、41.9 (9'-C)、42.2 或 42.3 (5-C)、53.3 (6'-C)、54.1 (2'-C)、133.5 (3-C)、154.4 (2-C)、173 附近 (3'-C, 7'-C, 8'-C, 10'-C)、205.8 (1-C)

試料係溶解於 0.1N 之 DC 1 重水溶液中，將二氧雜環己烷之化學遷移值以 67.4 ppm 表示。

又， $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$  之峰值的編號係表示如下式 (XIX)。



## 五、發明說明 ( 28 )

及12 mM之4HCP水溶液，各以 $1\mu\text{l}$ 點入並以氯仿：甲醇=4：1之混合液展開。以苔黑酚硫酸呈色試驗使呈紅色之後，將該板之畫像以光/分析保持器(Photo/Analyst Archiver) (福特迪因公司Fotodyne inc.)照相，並以1-DBasic (進階美國生物技術軟體)將點的強度數值化，再由4HCP的檢量線求出各試料之濃度。

該結果示於表1。亦即，圖1係表示加熱溫度以及4HCP生成量之關係圖，縱軸係4HCP生成量(mM)、橫軸為加熱溫度( $^{\circ}\text{C}$ )。如圖所示之4HCP生成量，在加熱溫度增高的同時亦增加。

(5)5W/V% DNA·Na(二次洛公司製)水溶液加入稀釋之HCl，調整pH值為5.5後，高溫殺菌，並於 $120^{\circ}\text{C}$ 下加熱0、1、3、5及9小時。

將加熱處理液的上清液中之4HCP之濃度，以參考例1-(4)記載之方法測定。

該結果示於圖2。亦即，圖2係表示加熱溫度以及4HCP生成量之關係圖，縱軸係4HCP生成量(mM)、橫軸為加熱時間(小時)。如圖所示之4HCP生成量，在加熱3小時後到達高峰。

(6)在5W/V% DNA·Na(二次洛公司製)水溶液上加入稀HCl，調整pH值為4.0、5.0、5.5、6.0者，以及加入稀NaOH調整pH值為7.0者，將其高溫殺菌，並於 $120^{\circ}\text{C}$ 下加熱3小時。

將加熱處理液的上清液中之4HCP之濃度，以參考例1-(4)

## 五、發明說明 ( 29 )

記載之方法測定。

該結果示於圖3。亦即，圖3係表示pH值以及4HCP生成量之關係圖，縱軸係4HCP生成量(mM)、橫軸為pH值。如圖所示之4HCP生成量，在pH值5附近到達高峰。

(7)在5W/V% DNA·Na(二次洛公司製)水溶液上加入稀HCl，調整pH值為5.5之後，熱中止，並於50、60、70、80、90、100、110以及120°C下加熱3小時。

將加熱處理物之上清液以逆相HPLC法進行分析。分析條件係如以下所述。

管柱：YMCpackODS-AM( $\phi$  4.6mm×25cm、YMC公司製)

移動相：3%乙腈水溶液0.8毫升/分鐘

檢測：210 nm

求出25分鐘所溶離出之4GCP以及33分鐘所溶離出之4ACP的峰部面積，並藉由各檢量線，求出各試料之濃度。

結果係表示於圖4以及圖5。亦即，圖4係表示加熱溫度以及4ACP生成量之關係圖，縱軸則表示4ACP生成量(mM)、橫軸為加熱溫度(°C)。圖5係表示加熱溫度以及4GCP生成量之關係圖，縱軸則表示4GCP生成量(mM)、橫軸為加熱溫度(°C)。

如圖4、圖5所示，4ACP以及4GCP在3小時加熱中係由100°C開始產生，其生成量在加熱溫度升高時亦同時增加。

(8)在5W/V% DNA·Na(二次洛公司製)水溶液上加入稀HCl，調整pH值為5.5後，高溫殺菌，並於120°C下加熱0、1、3、5及9小時。

## 五、發明說明 ( 30 )

將加熱處理液的上清液中之4ACP以及4GCP之濃度，以參考例1-(7)記載之方法測定。

該結果示於圖6及圖7。亦即，圖6係表示加熱時間以及4ACP生成量之關係圖，縱軸係4ACP生成量(mM)、橫軸為加熱時間(小時)。圖7係表示加熱時間以及4GCP生成量之關係，縱軸係4GCP生成量(mM)、橫軸為加熱時間(小時)。

如圖6、圖7所示，4ACP以及4GCP同時於3小時到達峰部，其後則減少。

(9)在5W/V% DNA·Na(二次洛公司製)水溶液上加入稀HCl，調整pH值為4.0、5.0、5.5、6.0者，以及加入稀NaOH調整pH值為7.0者。高溫殺菌，並於120°C下加熱3小時。

將加熱處理液的上清液中之4ACP以及4GCP之濃度，以參考例1-(7)記載之方法測定。

該結果示於圖8及圖9。亦即，圖8係表示pH值以及4HCP生成量之關係圖，縱軸係4ACP生成量(mM)、橫軸為pH值。圖9係表示pH值以及4GCP生成量之關係圖，縱軸係4GCP生成量(mM)、橫軸為pH值。

如圖8、圖9所示之4ACP以及4GCP生成量，在pH值5附近到達高峰。

(10)將0.1M之2-去氧-D-核糖(西格馬公司製)水溶液，以121°C加熱處理0.5、1、2、4、15小時。

將加熱處理物之上清液以逆相HPLC法進行分析。分析條件係如以下所示。

## 五、發明說明 ( 31 )

管柱：YMCpackODS-AM( $\phi$  4.6mm $\times$ 25cm、YMC公司製)

移動相：A：1%TFA水溶液

B：0.1%TFA80%乙腈水溶液

流速0.8毫升/分鐘

溶離：移動層A(5分鐘) $\rightarrow$ 由移動層A至移動層B之直線濃度梯度(20分鐘) $\rightarrow$ 移動層B

檢測：215 nm

求出7分鐘所溶離出之5-羥基-2-環戊烯酮的峰部面積，並藉由檢量線，求出各試料之濃度。

結果係表示於圖10。亦即，圖10係表示加熱小時以及4,5-羥基-2-環戊烯酮生成量之關係圖，縱軸則表示4,5-羥基-2-環戊烯酮生成量(mM)、橫軸為加熱時間(小時)。如圖10所示，以5小時之加熱可使4,5-羥基-2-環戊烯酮的生成量到達水平。

## 實施例1

以含有0.5%之貝克托蛋白腴(吉甫克公司製)的M199培養基(吉甫克公司製)，將大鼠纖維芽L-M細胞(ATCC CCL-1.2)懸浮於 $1.0 \times 10^5$ 細胞/毫升，並於24孔盤上各進行1毫升之無菌培養。培養2天後，去除培養基，換成含有0.5%牛血清白蛋白(西格馬公司製)之M199培養基。然後再添加環戊烯酮(最終濃度1~25  $\mu$ M)、4HCP(亞爾多利琪公司製)(最終濃度12.5  $\mu$ M)、二丙醯基環戊烯酮(最終濃度3.1~9.4  $\mu$ M)，培養24小時。

培養結束後，將培養液中之神經成長因子的濃度以酵素

## 五、發明說明 ( 32 )

免疫分析法(NGF Emax Immuno Assay System: 普羅美加公司製)進行測定。其結果, 環戊烯酮、4HCP、二丙醯基環戊烯酮皆與濃度有依存性地, 其L-M細胞的神經成長因子產生有增強現象。該結果並示於表1~表4。

表1 由環戊烯酮所導致之神經成長因子產生之增強

環戊烯酮濃度( $\mu$ M)	神經成長因子之濃度(ng/ml)
0	0.570
1	0.700
2.5	0.740
5	0.870
7.5	0.900
10	1.080
12.5	1.340
15	1.550
17.5	2.150
20	1.900
25	1.540

## 五、發明說明 ( 33 )

表2 由4HCP所導致之神經成長因子產生之增強

4HCP濃度( $\mu$ M)	神經成長因子之濃度(ng/ml)
0	0.138
12.5	0.327

表3 由二丙醯基環戊烯酮所導致之神經成長因子產生之增強

二丙醯基環戊烯酮濃度( $\mu$ M)	神經成長因子之濃度(ng/ml)
0	0.132
3.1	0.164
6.3	0.259
9.4	0.257

表4 由環戊烯酮所導致之神經成長因子產生之增強(時間表)

環戊烯酮濃度( $\mu$ M)	環戊烯培養時間					
	0小時	3小時	6小時	12小時	24小時	48小時
0	0.000	0.028	0.233	0.575	0.658	0.736
15	0.000	0.050	0.359	0.686	1.186	1.236
17.5	0.000	0.054	0.205	0.635	1.535	1.492
20	0.000	0.082	0.179	0.581	1.681	1.874

進一步，此外之環戊烯酮衍生物亦同樣地會增強L-M細胞之神經成長因子之產生。

## 五、發明說明 ( 34 )

## 實施例2

在含有10%牛胎兒血清之DME培養基(生物維特克公司製)上，將濃度達 $1 \times 10^5$ 細胞/ml之懸浮MRC-5細胞(CCL171、大日本製藥公司製)  $500 \mu\text{l}$ 加入48孔的細胞培養盤中，在 $37^\circ\text{C}$ 、5%二氧化碳存在下，於24小時培養後，改為含有1%牛胎兒血清之DME培養基。其後，添加試料，並於24小時培養之後，回收培養基，使用匡特坎人類肝細胞生長因子ELISA套組(Quantikine Human Hepatocyte Growth Factor (HGF) ELISA Kit)(船越公司製)，測定培養基中之HGF的量。HGF的生產量係以負控制組作為100%。又，負控制組之HGF的生產量為 $7.2 \text{ ng/ml}$ 。上述之試料，其各自之添加最終濃度為，環戊烯酮係20、40、 $160 \mu\text{M}$ ，GM係20、40、 $80 \mu\text{M}$ ，二丙醯基環戊烯酮係32、 $64 \mu\text{M}$ 。至於負控制組，則添加與試料同量之蒸餾水。正控制組部分，則係將前列腺素 $E_1$ 添加成為0.01、0.1、1、 $10 \mu\text{M}$ 。

其結果，添加有環戊烯酮及其衍生物之細胞群，其全部皆較添加蒸餾水之負控制組，在HGF之生產量上具有統計上有意義之增加。甚且，較正控制組之添加前列腺素 $E_1$ 組，其HGF之生產量亦具有統計上有意義之增加。由此，在環戊烯酮及其衍生物上，顯示了較目前為止HGF之增強已被確認之前列腺素更高之增強HGF生產之活性。添加環戊烯酮、GM及二丙醯基環戊烯酮之結果係各示於表5、表6、表7。

## 五、發明說明 ( 35 )

表 5

環戊烯酮濃度( $\mu$ M)	HGF生長量之增加(%)
0	100
20	144
40	218
160	238

表 6

GM濃度( $\mu$ M)	HGF生長量之增加(%)
0	100
20	154
40	179
80	243
160	319

表 7

二丙醯基環戊烯酮濃度( $\mu$ M)	HGF生長量之增加(%)
0	100
32	120
64	144

## 實施例 3

(1) 將人類嬰兒包皮上皮細胞株之Hs68細胞(ATCC CRL-1635)於含有10%牛胎兒血清(FBS: 吉甫克BRL公司製)之D-MEM培養基(生物維特克公司製)上, 於5%二氧化碳存在下, 以37°C在培養器將細胞培養至飽和, 以胰蛋白酶-EDTA



## 五、發明說明 ( 36 )

溶液(生物維特克公司製)將細胞於上述培養基中懸浮至 $3 \times 10^5$ 個/ml之濃度，並分注 $200 \mu\text{l}$ 於96孔微滴定盤之各井中。培養5天後，在細胞幾乎已於培養器中飽和之時間點丟棄培養基，並加入含有40、100或 $200 \mu\text{M}$ 的4HCP之培養基。以96小時的流程，每24小時定時地回收培養上清液，使用h-IGF-1之ELISA-套組(診斷技術系統實驗室公司製)，測定4HCP對於Hs68細胞中的人類胰島素型式增殖因子-1(h-IGF-1)產生增強之影響。其結果示於表8。

表8

4HCP濃度 ( $\mu\text{M}$ )	培養時間			
	24小時	48小時	72小時	96小時
	h-IGF-1產生增強之活性( $\text{ng/ml}$ )			
0	0	0	0	0
40	0	0	0	0
100	39.9	10.0	9.6	4.4
200	37.9	10.4	9.9	4.2

如表8所示，在Hs68細胞中，若添加 $100 \mu\text{M}$ 以上之4HCP時，h-IGF產生增強之活性係於第24小時到達最大，其後定期地減少。

(2)將Hs68細胞於含有10%牛胎兒血清之D-MEM培養基上，於5%二氧化碳存在下，以 $37^\circ\text{C}$ 在培養器將細胞培養至飽和，以胰蛋白酶-EDTA溶液將細胞於上述培養基中懸浮至 $3 \times 10^5$ 個/ml之濃度，並分注 $200 \mu\text{l}$ 於96孔微滴定盤之各井中。培養5~7天後，在細胞幾乎已於培養器中飽和之時間點丟

## 五、發明說明 ( 37 )

棄培養基，並加入含有0、2.5、5、10、或20  $\mu$  M的環戊烯酮或GM之上述培養基。

以48小時的流程，於1、3、6、12、24、48小時定時地回收培養上清液，使用h-IGF-1之ELISA-套組，測定環戊烯酮或GM對於Hs68細胞中的h-IGF-1產生(表現增強)增強之影響。

其結果，在Hs68細胞中，若添加10~20  $\mu$  M時，h-IGF-1係自添加後3小時開始產生，在6小時後與無添加之對照組相比，約產生2倍量之h-IGF-1。

又，若添加10~20  $\mu$  M之環戊烯酮時，則自添加後1小時至6小時，有h-IGF-1產生。

(3)將Hs68細胞於含有10%牛胎兒血清之D-MEM培養基上，於5%二氧化碳存在下，以37°C在培養器將細胞培養至飽和，以胰蛋白酶-EDTA溶液將細胞於上述培養基中懸浮至 $3 \times 10^5$ 個/ml之濃度，並分注200  $\mu$  l於96孔微滴定盤之各井中。培養5~7天後，在細胞幾乎已經培養器中飽和之時間點丟棄培養基，並加入含有0、25、50、100、或200  $\mu$  M的4HCP、式(XVIII)所表示之化合物(4HCP-GSH)、或谷胱甘肽(GSH)之上述培養基。以48小時的流程，於1、3、6、12、24、48小時定時地回收培養上清液，使用h-IGF-1之ELISA-套組，測定其對於Hs68細胞中的h-IGF-1產生(表現增強)增強之影響。

其結果，在Hs68細胞中，若添加25~200  $\mu$  M的4HCP時，h-IGF-1最早將從第1小時產生量最大，其後定時地減少。

## 五、發明說明 ( 38 )

又，第48小時中的h-IGF-1表現則以100  $\mu$  M以上的4HCP可觀察到處理之細胞。式(XVIII)所表示之化合物在100~200  $\mu$  M的濃度，可確認其有濃度依存性地h-IGF-1增強活性產生。這些結果各示於表9及表10。又，培養時間在10~30分鐘亦可發現有統計學上有意義之h-IGF-1產生增強。另外，在單獨添加谷胱甘肽的培養基中則沒有發現有統計學上有意義之h-IGF-1增強活性。

表9 由4HCP所導致之h-IGF-1產生之增強活性(ng/ml)

4HCP 添加量 ( $\mu$ M)	培養時間					
	1小時	3小時	6小時	12小時	24小時	48小時
	h-IGF-1產生之增強活性(ng/ml)					
0	7.2	8.9	6.3	0	0	0
25	30.6	29.5	9.6	0	0	0
50	49.5	42.1	27.8	0	0	0
100	52.8	47.2	31	22.1	25.6	32
200	59.2	51.7	44.4	42.1	50.3	50.2

表10 由4HCP-GSH所導致之h-IGF-1產生之增強活性  
(ng/ml)

4HCP-GSH 添加量 ( $\mu$ M)	培養時間					
	1小時	3小時	6小時	12小時	24小時	48小時
	h-IGF-1產生之增強活性(ng/ml)					
0	7.2	8.9	6.3	0	0	0
100	8.4	12	10.6	6.1	6.7	1.4
200	33.3	37.9	24.7	20.4	20.9	27.8

## 五、發明說明 ( 39 )

## 實施例4

使用5週大之雄性Wistar系大鼠，製作由坐骨神經的壓銼所導致之後肢肌肉之萎縮模型。壓銼的2週後摘取後肢腓腹肌肉測定該肌肉重量，記下壓銼肢體相對於正常肢體之肌肉重量的比率。

在10W/V% DNA·Na(二次洛公司製)水溶液上加入稀HCl，調整pH值為5者，高溫殺菌，並於120°C下加熱3小時，製備DNA加熱處理物。

製備上述之DNA加熱物之10倍水稀釋液(4HCP約11mg/kg/日)以及100倍之水稀釋液(4HCP約1mg/kg/日)，由壓銼之3天前使其由飲水中攝取(N=9~10)。對照組則給予自來水(N=10)。

其結果示於表11。表中之數字係表示平均值±標準誤差。表中之\*係指與對照組比較具有5%以下之危險率的統計上有意義之差。

對照組上因壓銼有顯著之肌肉萎縮產生，即使在壓銼2週之後亦幾乎沒有回復之跡象。相對於此，在DNA加熱物飲水投與組中，其與用量有依存性地促進肌肉重量之回復，且在DNA加熱物之10倍稀釋液飲水組中，則由於統計學上有意義之肌肉增量效果，改善了對照組之肌肉萎縮狀態。

表11

	肌肉重量(%)
	平均值±標準誤差
對照組(N=10)	49.0±2.58

## 五、發明說明 ( 40 )

DNA加熱物之100倍稀釋液 飲水組(N=9)	49.8±1.16
DNA加熱物之10倍稀釋液飲 水組(N=10)	58.2±2.64

\* ;  $p < 0.05$  vs 對照組

## 實施例5

## (1) 注射劑

在生理食鹽水中加入1%濃度之環戊烯酮或GM，製成注射劑。

## (2) 錠劑

製備含有100毫克之二丙醯基環戊烯酮或4HCP、以及適量之微結晶性纖維素之錠劑，加上糖衣，而製作各錠劑。

## 參考例6

ddY老鼠(美斯、5週大、體重約25克)係由日本SLC所購得，在1週的預備飼養之後，用於實驗之上。在老鼠的腹腔內接種 $1 \times 10^6$ 個細胞的愛立西癌細胞，並於接種一週後進行10 mg/kg環戊烯酮的腹腔內投與。在癌細胞接種後8日或12日後切下老鼠的頭，放血，將含有對照組之腹水貯存量與同量(2毫升)之1%牛血清白蛋白(西格馬公司製)的PBS(-)(日水製藥公司製)，注入老鼠的腹腔內，適當地加以按摩之後，回收。對照組則直接回收腹水。被回收之腹水以及腹腔洗淨液以2000 rpm、5分鐘離心之後，回收上清液，並使用老鼠白血球間素-12測定用之ELISA套組(安德傑公司製)，對於該白血球間素-12加以定量。

## 五、發明說明 ( 41 )

癌細胞接種8天後以及12天後之各老鼠的腹腔內白血球間素-12的量係示於表12。相對於癌細胞接種8天後的對照組中，3例的老鼠完全都在可檢測極限以下，在環戊烯酮投與組中，各老鼠上皆可觀察到環戊烯酮的白血球間素-12的產生增強之活性，顯示局部的T細胞以及NK/LAK細胞呈現活化性的狀態。又，即使在癌細胞接種12天後，在環戊烯酮投與組中其腹腔內亦確認有白血球間素，顯示由免疫賦活導致之抗腫瘤效果之表現。又，即使在環戊烯酮衍生物亦同樣地顯示具有白血球間素-12產生增強活性。

表12

		腹腔內白血球間素-12之量(pg/ml)					
		對照組			環戊烯酮投與組		
8天後	ND	ND	ND	11.0	100.0	25.0	
12天後	全部死亡			43.0	97.2	66.4	

ND：可檢測極限以下

產業上可利用性

本發明係提供一種需要成長因子產生增強之疾病及/或需要白血球間素-12產生增強之疾病之有效的醫藥品，其係以含有成長因子產生增強活性及/或白血球間素-12產生增強活性之化合物作為有效成分。該醫藥品係具有生體內之HGF產生增強活性、NGF產生增強活性、h-IGF產生增強活性、白血球間素-12產生增強活性等，作為肝炎、阿茲海默氏症、糖尿病、癌症等的需要成長因子產生增強之疾病及/或需要白血球間素-12產生增強之疾病之治療劑或預防劑極有用

## 五、發明說明 ( 42 )

再者，可由具有成長因子產生增強能力及/或白血球間素-12產生增強能力之環戊烯酮含有物、環戊烯酮衍生物含有物、4HCP含有物、4HCP衍生物含有物中選出作為製造飲食品之用，藉由以日常飲食品的方式攝取，可以改善需要成長因子產生增強之疾病及/或需要白血球間素-12產生增強之疾病。

因此，由環戊烯酮含有物、環戊烯酮衍生物含有物、4HCP含有物、4HCP衍生物含有物中選出作為有效成分之機能性飲食品，其係藉由成長因子產生增強作用及/或白血球間素-12產生增強作用，而為維持生體恆定性上有用之機能性飲食品。

又，本發明亦提供成長因子產生增強劑及/或白血球間素-12產生增強劑，該增強劑則在於成長因子之機能研究、以及與成長因子相關之疾病用醫藥之篩選上十分有用。

進一步，本發明亦提供肌肉增強劑、其在起因於神經壓迫之疾病的治療上極為有用。

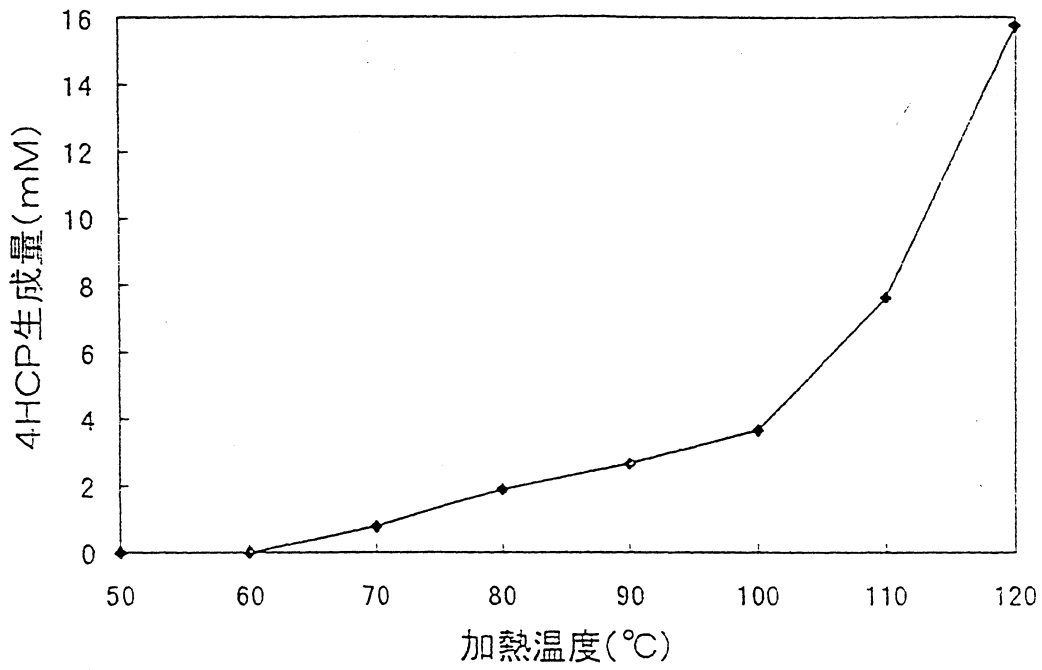


圖 1

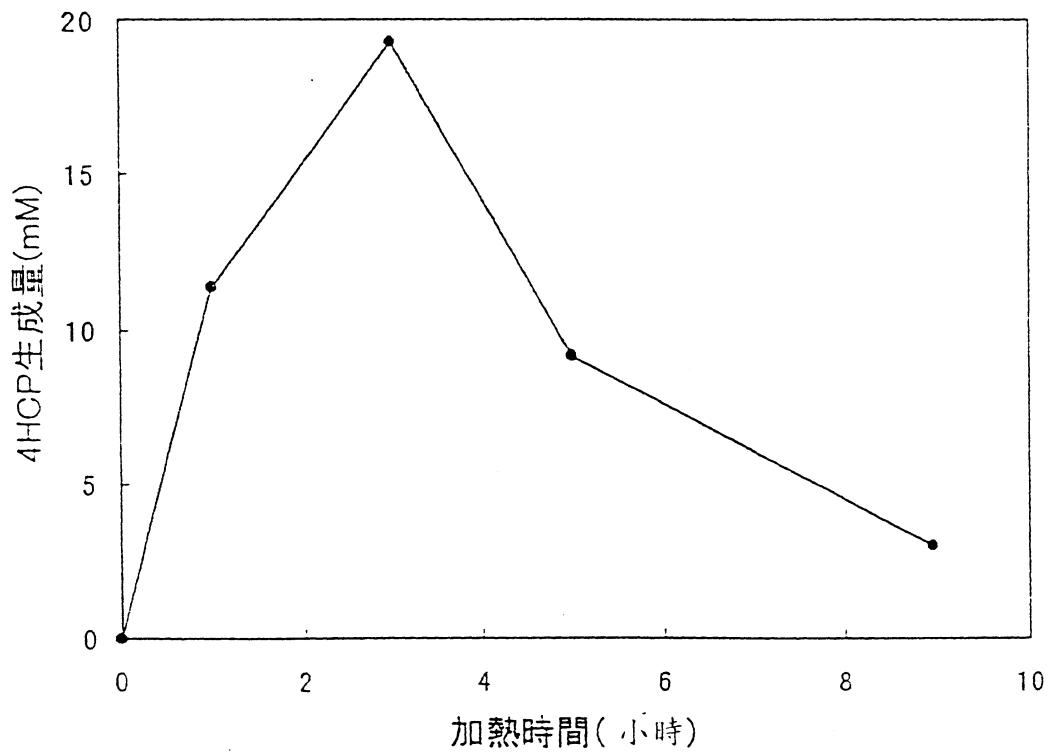


圖 2



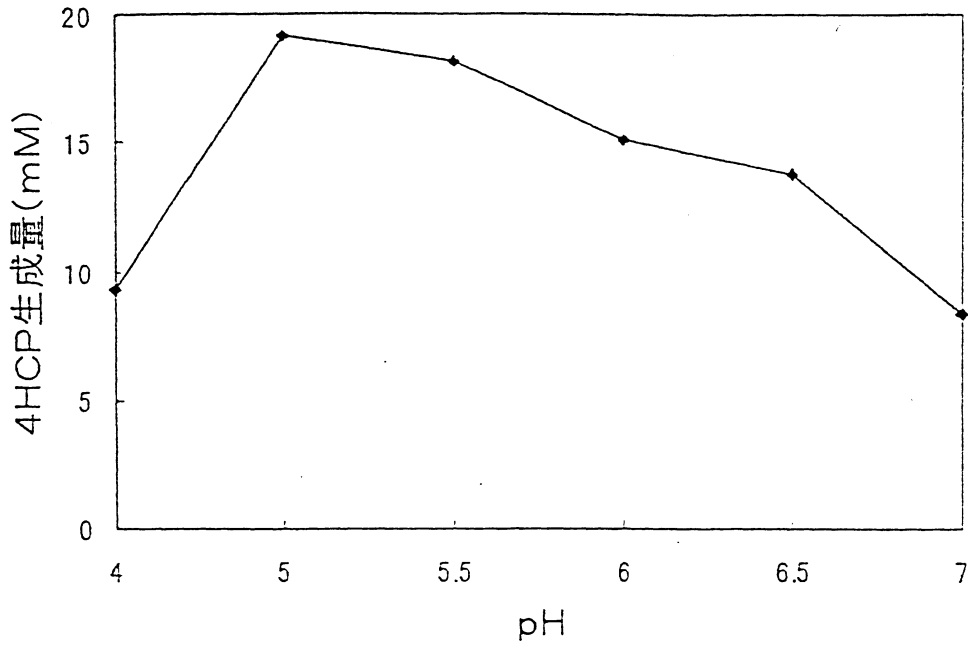


圖 3

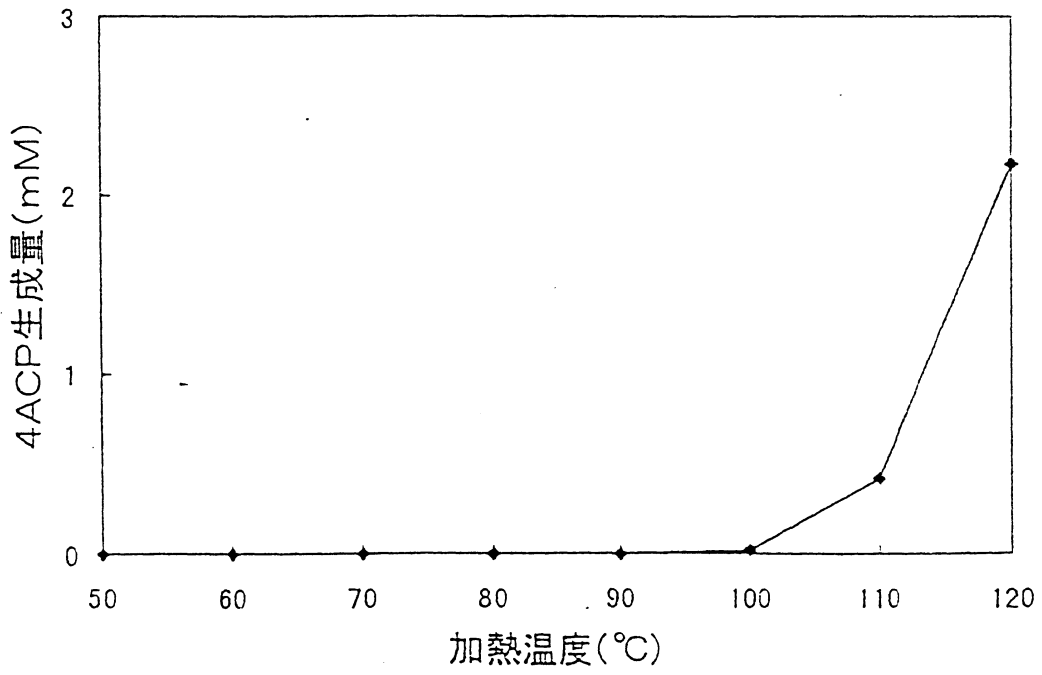


圖 4

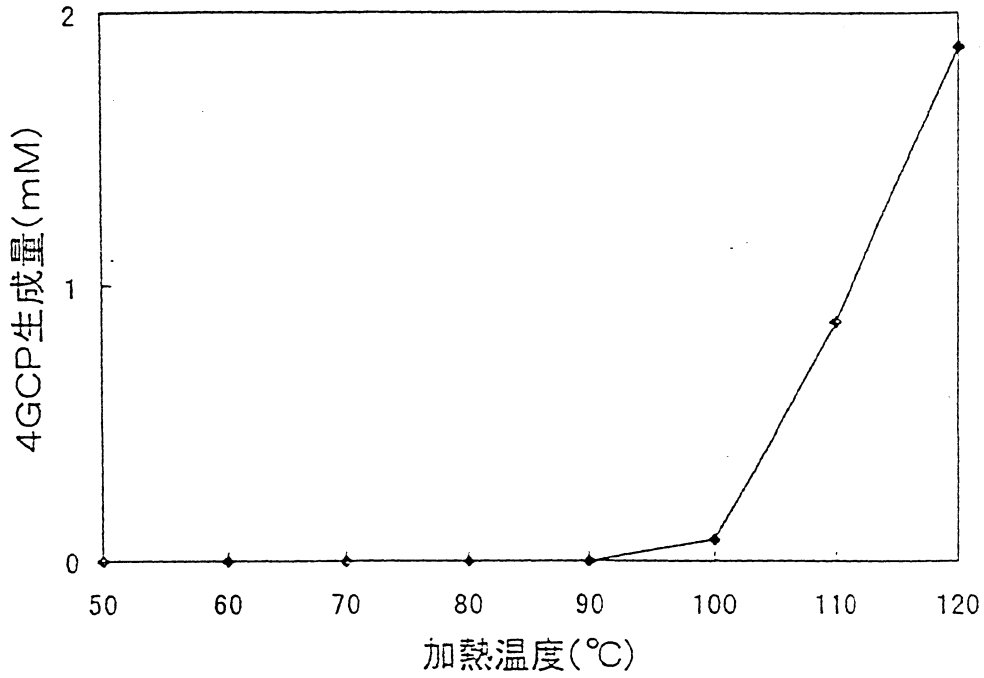


圖 5

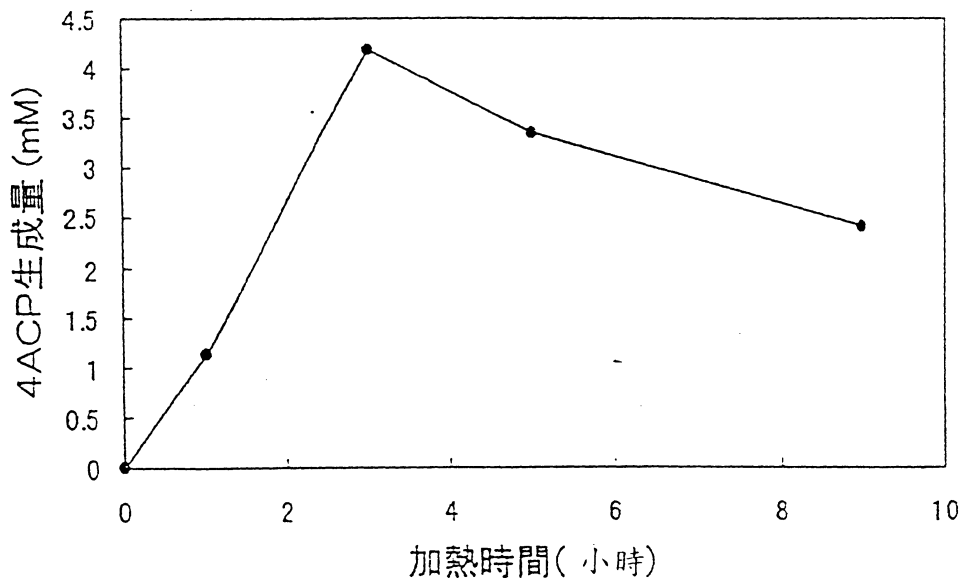


圖 6

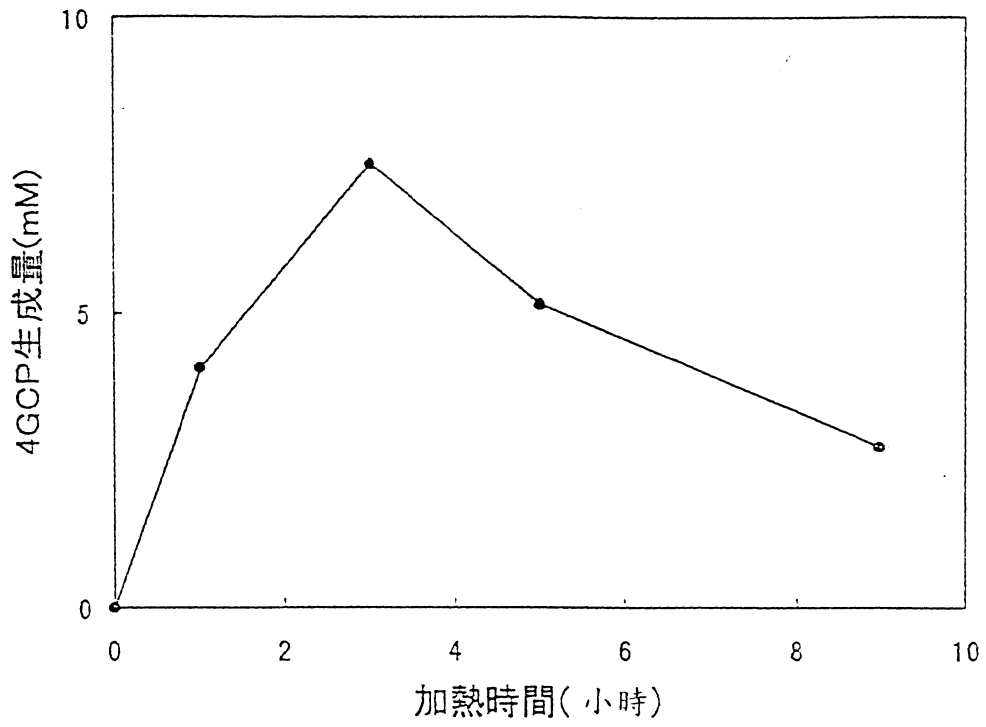


圖 7

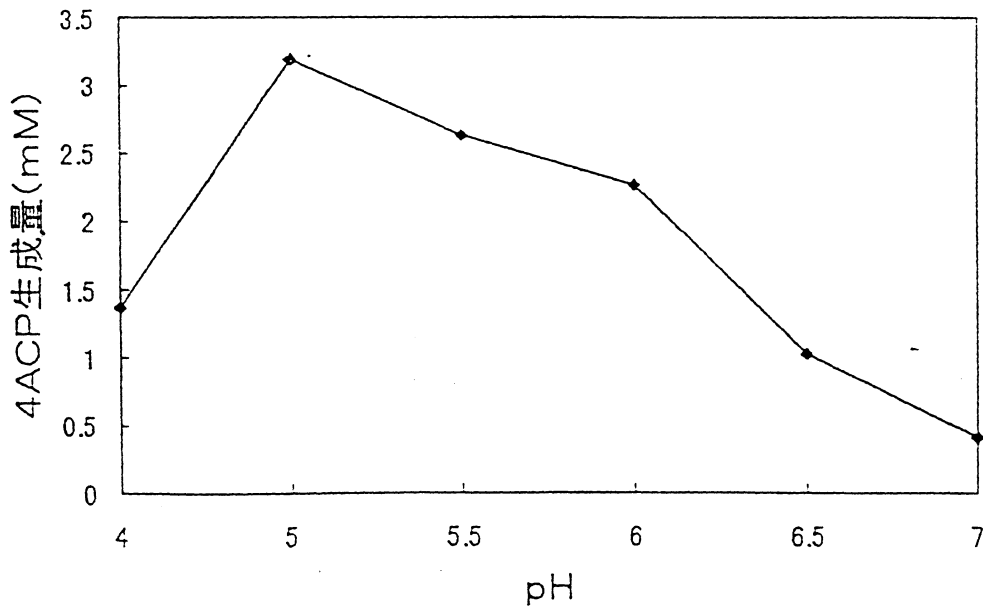


圖 8

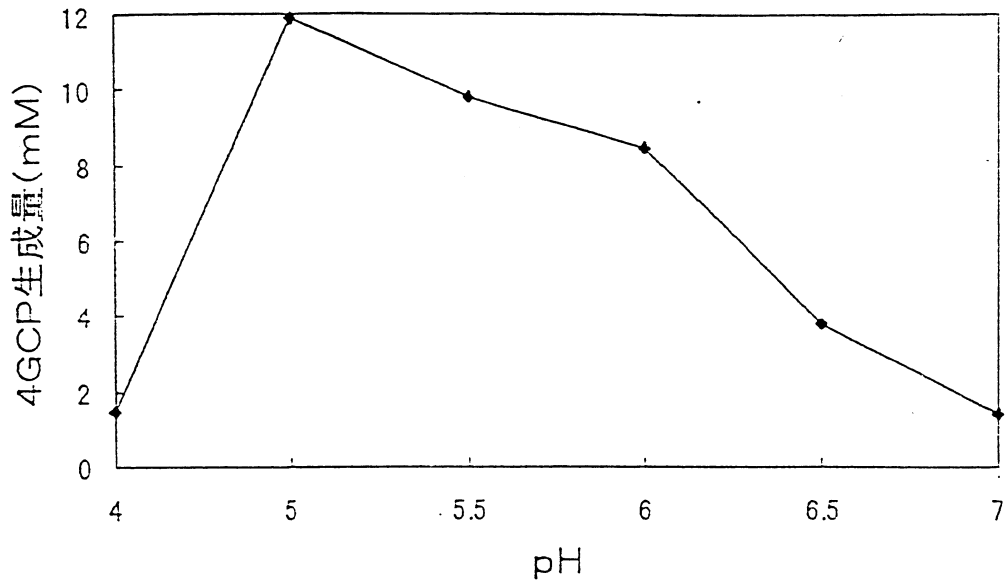


圖 9

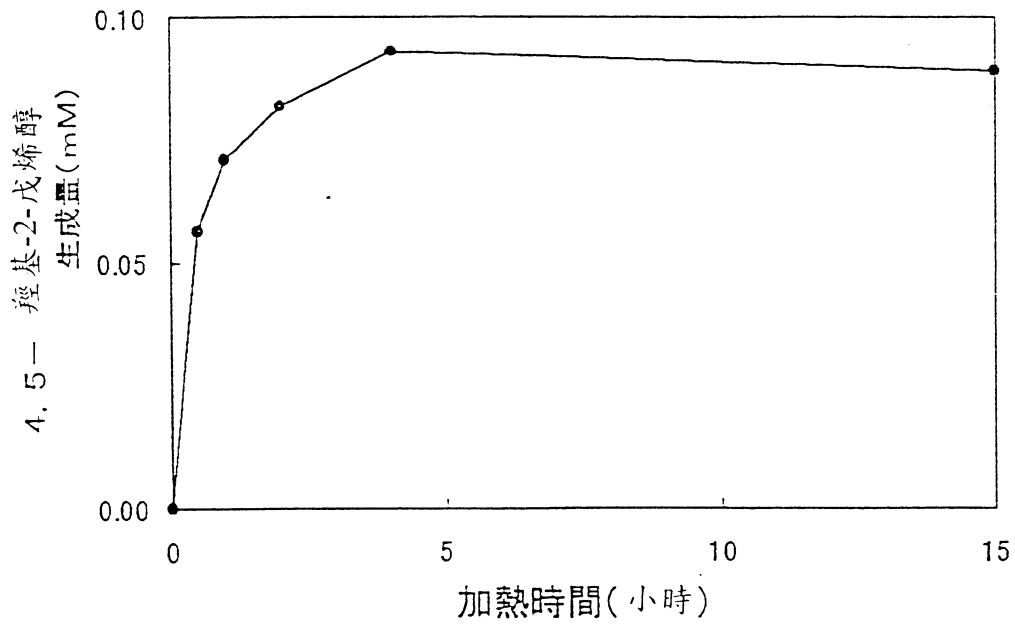


圖 10

# 公 告 本

I242432  
89年5月26日  
補充

申請日期	89. 2. 16
案 號	089102607
類 別	A61K 3/12, A23L 1/30, A23L 2/00

A4  
C4

中文說明書替換頁(93年5月)

(以上各欄由本局填註)

## 發 明 專 利 說 明 書

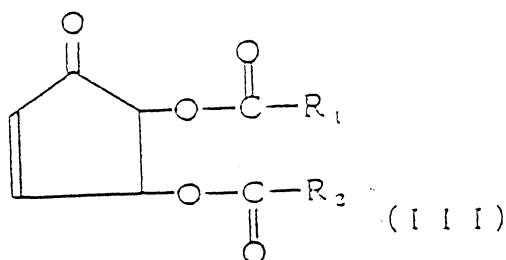
一、發明名稱	中 文	用於需要成長因子產生增強之疾病及/或需要白血球間素-12產生增強之疾病之治療劑
	日 文	成長因子產生增強を要する疾患及び/又はインターロイキン-12產生增強を要する疾患に使用される
二、發明人	姓 名	1.大野木 宏      2.明山 香織 3.富永 隆生      4.西山 英治 5.務 華康      6.巽 容子 7.佐川 裕章      8.加藤 郁之進
	國 籍	1.2.3.4.6.7.8皆日本      5.加拿大
三、申請人	住、居所	1.日本國京都府向日市寺戶町涉川16寶酒造社宅A-406號 2.日本國京都府京都市伏見區下板橋町598-1 寶酒造下板橋寮 3.日本國滋賀縣大津市本堅田4-22-2-204 4.日本國滋賀縣守山市水保町1411-7 5.日本國滋賀縣大津市野鄉原1-4-3 夏洛姆瀨田西107 6.日本國京都府京都市右京區嵯峨小倉山山本町1番地 7.日本國滋賀縣草津市西涉川2丁目12-1 哈莫帕雷斯草津503號 8.日本國京都府宇治市南陵町1-1-150
	姓 名 (名稱)	日商寶生物股份有限公司
代 表 人 姓 名	國 籍	日本
	住、居所 (事務所)	日本國滋賀縣大津市瀨田三丁目4番1號
代 表 人 姓 名		加藤 郁之進

裝 訂 線

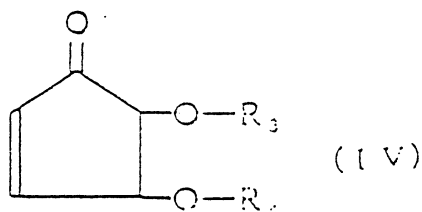
93-7-10

五、發明說明 ( 10 )

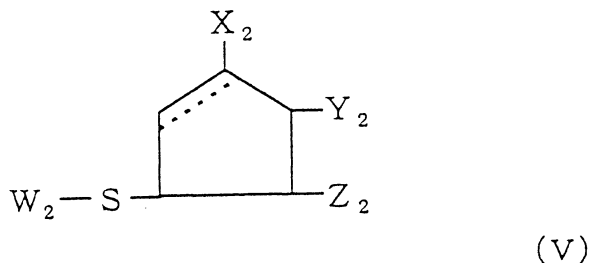
(式中，五碳環內以虛線表示之鍵結，係表示該五碳環可為具有雙鍵之環戊烯環、或者飽和之環戊烷環之任一者皆可。此外，若為環戊烯環時， $X_1$ 為OH、 $Y_1$ 為=O、 $Z_1$ 為H，另外，若為環戊烷環時， $X_1$ 為=O、 $Y_1$ 為OH、 $Z_1$ 為OH。又， $W_1$ 為扣除SH基之SH基含有化合物之殘基。)



(式中， $R_1$ 、 $R_2$ 可相同或相異、而為氫、脂肪族基、芳香族基或芳香脂肪族基。)



(式中， $R_3$ 、 $R_4$ 可相同或相異、而為氫、脂肪族基、芳香族基或芳香脂肪族基，但 $R_3=R_4=H$ 的情況除外。)



[式中，五碳環內以虛線表示之鍵結，係表示該五碳環為具有雙鍵之環戊烯環、或者飽和之環戊烷環之任一者皆可。此外，若為環戊烯環時， $X_2$ 為 $OR_5$ 、 $Y_2$ 為=O、 $Z_2$ 為H，另

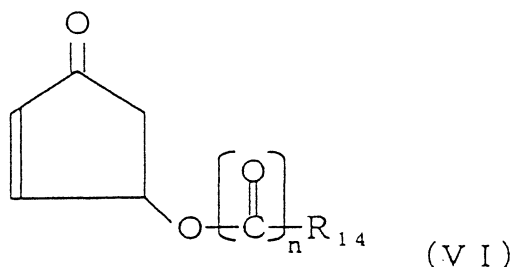
裝訂線

A7  
B7

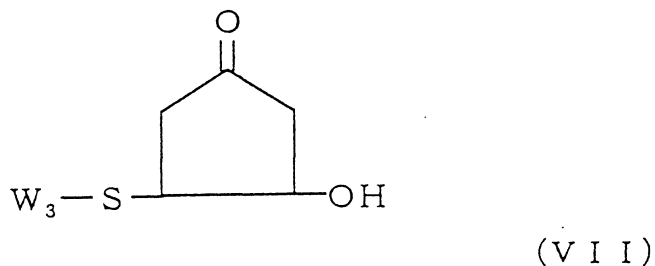
93.7.16

五、發明說明 ( 11 )

外，若為環戊烷環時， $X_2$ 為=O、 $Y_2$ 為 $OR_6$ 、 $Z_2$ 為 $OR_7$ ， $R_5$ 為 $R_8$ 、或 $-(CO)-R_9$ 、 $R_6$ 為H、 $R_{10}$ 、或 $-(CO)-R_{11}$ 、 $R_8$ 為H、 $R_{12}$ 、或 $-(CO)-R_{13}$  ( $R_8$ 、 $R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 可相同或相異，而為脂肪族基、芳香族基、或芳香脂肪族基， $R_9$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{13}$ 可為H)。但扣除 $R_6=R_7=H$ 。又 $W_2$ 為扣除SH基之SH基含有化合物之殘基。]



(式中， $R_{14}$ 為脂肪族基、芳香族基、或芳香脂肪族基， $n$ 為0或1。但， $n=0$ 時 $R_{14}$ 為H者除外。)



(式中， $W_3$ 為扣除SH基之SH基含有化合物之殘基。)

關於式(II)所表示之環戊烯酮衍生物係詳細記載於WO 98/39291號公報，該衍生物可藉由環戊烯酮與SH基含有化合物(例如半胱氨酸、谷胱甘肽等)反應而獲得。又，藉由將SH基含有化合物添加於環戊烯酮含有物中，可獲得該環戊烯酮衍生物含有物。該衍生物例如有下述式(VIII)~(XI)所

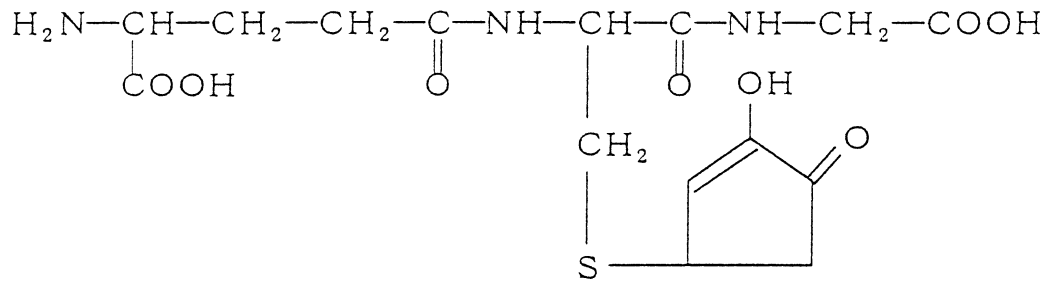
裝  
訂  
線

五、發明說明 ( 12 )

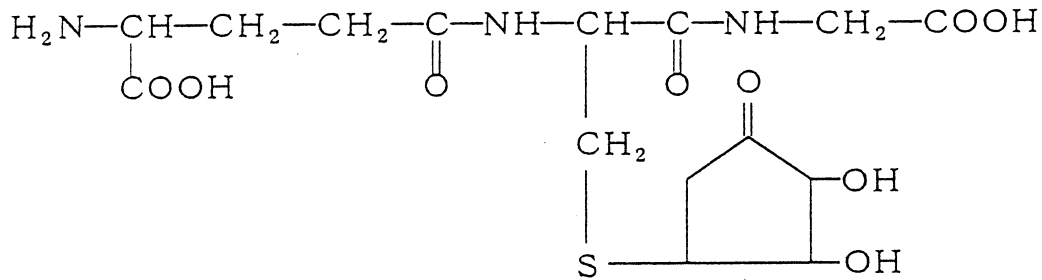
公告本

93年7月14日 補充

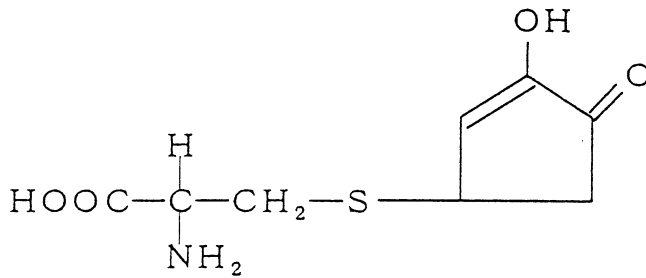
表示之化合物。又，以下，式(VIII)所表示之化合物只稱為GM。



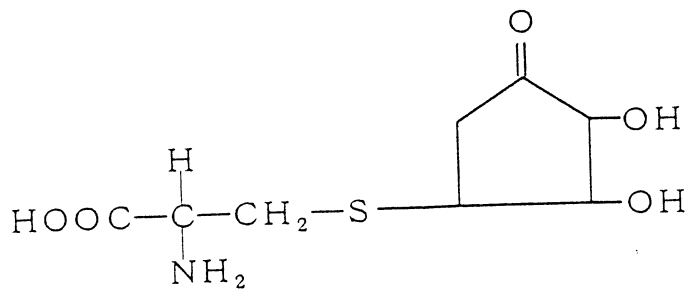
(VIII)



(IX)



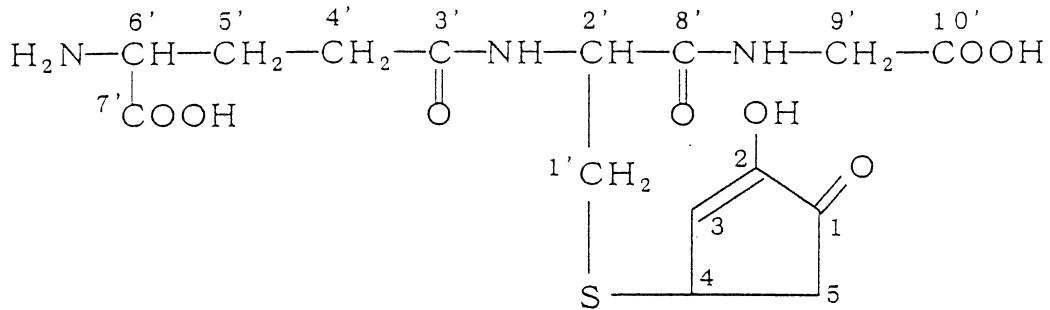
(X)



(XI)



五、發明說明 ( 27 )



(XIX)

FAB-MS

$m/z$  404 (M+H)<sup>+</sup>, 426 (M+Na)<sup>+</sup>

將甘油使用於黏結劑上。

UV  $\lambda$  max 251nm(水)

IR  $\nu$  KBr max  $cm^{-1}$  2949, 1710, 1660, 1539, 1404, 1203

以擴散反射法進行。

由上述結果，乾燥物係GM，亦即2-羥基-4-谷胱甘肽-S-基-2-環戊烯-1-酮 (2-hydroxy-4-glutathion-S-yl-2-cyclopenten-1-one)。

(4)5W/V% DNA • Na(二次洛公司製)水溶液加入稀釋之HCl，調整pH值為5.5後，熱中止，並於50、60、70、80、90、100、110以及120°C下加熱3小時。

將加熱處理液的上清液中之4HCP之濃度，以薄層色層分析法測定。

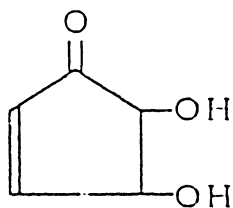
亦即，在薄層色層分析法用之矽凝膠板(MERCK公司製)上，將上述之加熱處理物之上清液以及2、4、6、8、10以

四、中文發明摘要（發明之名稱：用於需要成長因子產生增強之疾病及/或需要白血球間素-12產生增強之疾病之治療劑）

一種需要成長因子產生增強之疾病及/或需要白血球間素-12產生增強之疾病之治療劑或預防劑，其特徵為含有由下式(I)所表示之4,5-二羥基-2-環戊烯-1-酮、4-羥基-2-環戊烯-1-酮以及彼等之衍生物中所選出之化合物作為有效成分。

英文發明摘要（發明之名稱：成長因子產生增強を要する疾患及び/又はインターロイキン-12產生增強を要する疾患に使用される）

下記式(1)で表される4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及びそれらの誘導体から選択される化合物を有効成分として含有することを特徴とする成長因子產生增強を要する疾患及び/又はインターロイキン-12產生增強を要する疾患の治療剤又は予防剤。



(I)





## 六、申請專利範圍

合物中所選出之化合物作為有效成分。

5. 根據申請專利範圍第4項之成長因子產生增強劑，其中之成長因子為肝細胞增殖因子、神經成長因子及/或胰島素型式增殖因子。
6. 根據申請專利範圍第4項之成長因子產生增強劑及/或白血球間素-12產生增強劑，其係用於食品或飲料。