(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
A61K 31/122

(11) 공개번호 특2001-0102134
(43) 공개일자 2001년11월15일

(21) 출원번호 10-2001-7010314
(22) 출원일자 2001년08월14일
번역문 제출일자 2001년08월14일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2000/00787
(86) 국제출원출원일자 2000년02월14일
(87) 국제공개번호 WO 2000/48586
(87) 국제공개일자 2000년08월24일

(81) 지정국
국내특허 : 아랍에미리트, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카연방, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그레나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 유고슬라비아, 남아프리카, 짐바브웨,
AP ARIPO특허: 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀랜드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 기네비쏘, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장

JP-P-1999-0004 2236		
JP-P-1999-0010 8499	1999년02월19일	일본(JP)
JP-P-1999-0026 4539	1999년04월15일	일본(JP)
	1999년09월17일	일본(JP)

(71) 출원인
다까라 슈조 가부시키가이샤
오미야 히사시
일본 교또후 교또시 후시미꾸 다께나까쵸 609반찌

(72) 발명자 오노기히로무
일본국교토617-0002무코시데라도초시부카와16다카라슈조-사타쿠에이-406
아키야마가오리
일본국교토612-8073교토시후시미쿠시모이타바시초598-1다카라슈조-시모이타바시료
도미나가다카나리
일본국시가520-0242오츠시혼카타타4-22-2-204
니시야마에이지
일본국시가524-0102모리야마시미주호초1411-7
우후아-캉
일본국시가520-2133오츠시노고하라1-4-3사로무-세타니시107
다츠미요코
일본국교토616-8396교토시우쿄쿠사가오구라야마야마모토초1
사가와히로아키
일본국시가525-0025가사츠시니시시부카와2초메12-1하모파레수-가사츠503
가토이쿠노신
일본국교토611-0028우지시난료초1-1-150

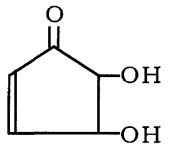
(74) 대리인 최규팔
이은선

심사청구 : 없음

(54) 치료제

요약

식(I)의 4,5-디하이드록시-2-시클로펜텐-1-온, 4-하이드록시-2-시클로펜텐-1-온 및 그의 유도체들로 구성된 그룹으로부터 선택되는 화합물을 활성 성분으로서 함유하는, 그의 치료 또는/예방을 위해 성장 인자 생산의 증강을 요하는 질환 및/또는 그의 치료 또는 예방을 위해 인터루킨-12 생산의 증강을 요하는 질환의 치료제 또는 예방제:



(I)

명세서

기술분야

본 발명은 그의 치료 또는 예방을 위해 세포 성장 인자 생산 증강을 요하는 질환에 유효한 약제 조성물, 제제, 또는 식품 또는 음료에 관한 것이다.

배경기술

성장 인자는 극미량으로 세포의 성장/증식을 촉진시키는 한 그룹의 물질이다. 그들은 세포의 증식, 신장, 확대, 분화 등을 조절한다. 성장 인자의 공지된 생리학적 작용은 성장 촉진 작용, 인슐린성 작용, 동화작용, 골형성 작용, 세포 성장 촉진 작용, 신경친화성 인자성 작용, 에리트로포이에틴성 작용, 자궁내 발육 촉진 작용, 신(renal)혈류 증가/신세포 보호 작용, 및 면역 증강성 작용을 포함한다. 따라서, 그들은 성장 호르몬불응증(unresponsiveness), 당뇨 및 이화 상태를 개선시키고, 골다공증과 같은 질환, 그들의 치료 또는 예방을 위해 조직 수복을 요하는 질환, 신경저하성 질환, 빈혈, 자궁내 발육부전(insufficient intrauterine growth), 신부전 및 면역결핍에 대한 이용성을 갖는 것으로 예상된다.

질환에 대한 성장 인자의 적용은 일반적으로 성장 인자를 외부로부터 투여하여 수행된다. 그러나, 다량으로 성장 인자를 수득하기는 어렵다. 또한, 유전공학에 의해 펩티드성 성장 인자를 제조할 수 있지만, 그러한 성장 인자는 대부분 민감성이 낮다. 따라서, 다량의 성장 인자를 필요로 한다. 다량의 성장 인자를 투여하는 것은 예를 들면, 발열 및 식욕부진과 같은 다양한 부작용을 동반한다고 공지되어 있다.

간은 부분 절제술 후, 신속하게 원래의 크기로 재생한다. 간 재생에 포함되는 필수 인자는 장기간동안 공지되지 않았다. 이어서, 간세포 성장 인자(HGF)를 전격성 간염(fulminant heptitis) 환자의 혈장으로부터 발견하고 그로부터 분리하고 정제하였다[Gohda, E. et al. J. Clin. Invest., 88:414-419(1988)]. 또한, 인간 HGF에 대한 cDNA를 클로닝하였고, HGF의 일차 구조를 밝혀냈다[Miyakawa, K. et a., Biochem. Biophys. Res. Commun., 163:967-973(1989)]. 또한, 세포의 운동성을 항진키는 산란 인자(SF), 및 종양 세포 독성 인자(TCF)가 HGF와 동일 물질임이 증명되었다[Weidner, K.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7001-7005(1991); Shima, N. et al., Biochem. Biophy. Res. Commun., 180:1151-1158(1991)].

HGF는 간세포 및 담낭 표피세포, 신세뇨관 표피세포 및 위점막 세포를 포함하는 다양한 형태의 표피 세포의 성장을 촉진시킨다. 또한, HGF는 표피 세포의 운동성 항진 및 혈관신생, 표피세포의 루멘 형성과 같은 형태 형성의 유도를 포함하는 매우 다양한 생리학적 작용을 나타내는 다기능 작용 물질이다. 즉, HGF는 다양한 기관에서 손상된 기관의 수복을 위해 표피 세포의 성장을 촉진하고, 운동성을 항진시키고, 혈관신생과 같은 형태 형성 등을 유도한다.

HGF는 또한 간세포 증식 작용, 단백질 합성 촉진 작용, 담즙울체 개선 작용, 약물 등에 의한 신장 상해 예방 작용을 나타낸다. 이들 사실에 기초하여, HGF가 간에서 중증간염, 경변증 및 담증울체에 대한 치료제로서 작용할 것으로 예상된다. 그러나, 실질적으로 HGF 그 자체는 치료제로서 사용되지 않았다. HGF에 대한 유전자를 도입시키는 유전자 치료법이 시도되었지만, 불필요한 시기 및 장소에서의 작용에 기이한 부작용 때문에 실용되기까지는 장시화될 것이다.

신경 세포가 지적 기능, 기억, 감정을 포함하는 인간의 정신적인 활동 및 행위를 유지시키는 주요 역할을 한다. 비록 가정이기는 하지만, 각 형태의 신경 세포에 특이적인 신경친화성 인자가 이들 정신적 활동이 기초하는 신경 세포의 분화, 생존 및 작용 발현에 필요하다고 추정된다. 그의 존재 및 기능이 명백한 인자만이 신경 성장 인자이다(본 명세서에서 NGF으로 약기됨). NGF는 전뇌 기저부에 콜린성 신경 대세포에 대한 신경친화성 인자이기 때문에, 알츠하이머 치매와 그것의 상관 관계에 대하여 주목되어 왔다[Pharmacia, 22(2):147-151 (1986); Ronen Seishin Igaku, 3(6):751-758(1986)].

알츠하이머 치매는 노인성 치매중 한 질환이고, 임상적으로 발육장해, 국소 증상, 하지의 긴장성 동통, 무전조간질발작 등을 동반하는 질환이고, 그의 병리학적 소견은 노인성 반점 및 알츠하이머 신경섬유 엉킴(Alzheimer nerofivrillary tnagles)을 포함한다. 최근 고령화 사회에서, 알츠하이머 치매가 증가하는 추세이고 심각한 사회적 관심사가 되어왔다. 그러나, 질환 상태를 개선시키거나 치료할 특별한 방법이 발견되지 않았다.

알츠하이머 치매을 앓는 환자의 뇌에서 메이너트(Meynert) 대뇌기저핵 중심부에 전뇌 기저부에서 콜린성 아세틸트랜스퍼라제(CAT) 작용이 두드러지게 저하하고 상당히 감소된 것이 관찰된다[Annu, Rev. Neurosci., 3:77(1980)]. 1

985년에는, 래트의 뇌를 사용한 연구에서 NGF가 뇌의 이 부위에서 신경친화성 인자로서 작용한다는 것이 밝혀졌다[EMBO J., 4:1389(1985)]. 이 후, NGF 및 이 질환의 상관 관계에 주목하게 되었다. 또한, 헌팅돈성 콜레라를 앓는 환자의 선상뇌에서 GABA성 신경 세포 및 콜린성 신경 세포가 상당히 제거된 것이 관찰되었다. 따라서, NGF 또한 선상에서 내인성의 콜린성 신경 세포로서 작용한다는 것이 발견되었다[Science, 234:1341(1986)]. 따라서, NGF 및 이 질환과 관계의 가능성을 지적하게 되었다. 또한, 다양한 신경 질환에 대한 모델로서 이용할 수 있는 동물들(예: 래트)를 사용하여 NGF의 효능을 연구하여 왔다. 래트에서 신경 세포가 상당히 저하되기 전에 NGF를 뇌내로 투여하는 경우, CAT 활성의 저하 및 감소를 예방할 수 있다고 보고되어 왔다[J. Neurosci., 6:2155(1986); Brain Res., 293:305(1985); Science, 235:214(1986); Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 83:9231(1986)]. 또한, NGF는 말초의 교감 신경 지배(innnervation) 조직 및 뇌에서 생합성되고, 말초 또는 뇌조직에 간질세포인 섬유 세포 또는 선유아세포(astroglial) 세포가 NGF의 생합성에서 중요한 작용을 한다는 것이 증명되었다[J. Biol. Chem., 259:1259(1984); Biochem. Biophys. Res. Commun., 136:57(1986)]. 또한, 섬유세포 또는 선유아세포에 의해 생산된 NGF는 악하선(submandibular gland) NGF의 것과 동일한 항원성, 분자량, 등전점 및 생물학적 작용을 갖는다는 것이 밝혀졌고, 이것은 장기간동안 연구되어 왔다. 또한, 다양한 신경전달물질을 섬유세포(L-M 세포) 또는 선유아세포 배양액에 가하였을 때, 카테콜아민(노르에피네프린, 에티테프린 및 도파민)이 NGF의 합성을 촉진시키는 효과가 나타났다[J. Biol. Chem., 201;6039(1986); FEBS Lett., 208:258(1986)].

상기 언급된 발견에 기초하여, NGF를 NGF가 신경친화성 인자로서 작용하는 부위가 퇴화되는 신경 질환에서 상기 퇴화를 예방하기 위한 치료제로서 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 일단 대뇌 신경 세포가 뇌혈관 질환, 뇌종양, 뇌첨, 두부외상에 관련된 퇴행성 질환, 마취약물 중독 등에 의해 퇴화되면, 상기 세포들은 평생동안 회복되지 못할 것이다. 결과적으로, 지적 기능 저하 및 월경장애 및 감정장해 및 행동이상과 같은 다양한 장해를 유발한다. 신경 섬유는 가소성을 갖는다. 그들이 손상된 경우, 신경 섬유는 손상된 부위 주변의 건강한 섬유로부터 발생하여 손상된 시냅스를 대신하여 새로운 시냅스를 형성한다. 이 과정에서 NGF가 신경 작용의 수복 및 재생을 촉진시키기 위한 치료제로서 사용될 수 있다.

NGF를 다양한 신경 질환의 치료에 사용하는 경우, NGF는 NGF를 요하는 신경 세포의 매우 근접한 부위에 도달할 수 있어야 한다. 또한, 중추 신경계 질환인 경우, NGF는 영향을 받을 대뇌 세포까지 전달되어야 한다. 그러나, NGF를 혈관을 통해 뇌내로 전달하는 불가능하다. 뇌중의 혈관 내피세포는 물, 가스 및 지용성 물질 이외의 물질들이 혈액으로부터 뇌 조직으로 전달되는 것을 제한하기 위해 서로 고정되어 있기 때문이고(뇌혈액 관문(blood-brain barrier)으로 언급됨), 따라서 단백질(NGF을 포함)과 같은 거대분자는 결과 뇌혈액 관문을 통과할 수 없다. 따라서, 현재 기술을 사용하더라고, NGF를 외과적 수술에 의해 직접 뇌로 투여하는 것은 위험하다.

성장 인자가 사용될 수 있는 질환의 치료 또는 예방을 위해, 그를 투여하는 대신에 성장 인자를 생체내에서 유도하는 방법이 사용될 수 있다. 이러한 경우, 성장 인자 투여에 의한 특이한 부작용없이 질환을 안전하게 치료하거나 예방할 수 있을 것이다.

예를 들면, HGF를 외부로부터 투여하기보다는 그것이 생체내에서 원하는 부위에서 유도될 수 있다면, 그들의 치료 또는 예방을 위해 HGF 발현의 증강을 요하는 질환(간에, 간염, 경변증 및 담증울체를 포함)을 효과적으로 치료하거나 예방할 수 있다.

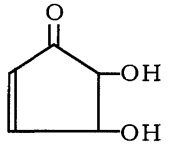
또한, NGF-유도 물질을 뇌에 NGF-생산 세포로 전달하므로써 시험관내에서 치료제를 성공적로 수득할 있다.

본 발명의 목적

본 발명의 주 목적은 성장 인자 생산 및/또는 인터루킨-12 생산을 증강시키는 능력을 갖는 천연물로부터 유래된 고도로 안전한 화합물, 그의 치료 또는 예방을 위해 성장 인자 생산의 증강을 요하는 질환의 치료 또는 예방에 유용한 약제 조성물 및 식품 및 음료를 제공하는 것이다.

발명의 요약

본 발명은 대략 하기와 같다. 본 발명의 제 1면은 식(I)의 4,5-디하이드록시 -2-시클로펜텐-1-온, 4-하이드록시-2-시클로펜텐-1-온 및 그의 유도체들로 구성된 그룹으로부터 선택되는 화합물을 활성 성분으로서 함유하는, 그의 치료 또는/예방을 위해 성장 인자 생산의 증강을 요하는 질환 및/또는 그의 치료 또는 예방을 위해 인터루킨-12 생산의 증강을 요하는 질환의 치료 또는 예방용 약제 조성물에 관한 것이다:



(I)

본 발명의 제 2면은 식(I)의 4,5-디하이드록시-2-시클로펜텐-1-온, 4-하이드록시-2-시클로펜텐-1-온 및 그의 유도체들로 구성된 그룹으로부터 선택되는 화합물을 활성 성분으로서 함유하는, 성장 인자 생산 및/또는 인터루킨-12 생산 증강용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 제 3면은 식(I)의 4,5-디하이드록시-2-시클로펜텐-1-온을 함유하는 물질, 4-하이드록시-2-시클로펜텐-1-온을 함유하는 물질, 4,5-디하이드록시-2-시클로펜텐-1-온 유도체를 함유하는 물질 및 4-하이드록시-2-시클로펜텐-1-온 유도체를 함유하는 물질로 구성된 그룹으로부터 선택되는 물질을 포함하고, 그 물질을 희석시켜 제조되고/거나 그 물질을 가하여 제조되는, 성장 인자 생산 및/또는 인터루킨-12 생산 증강용 식품 또는 음료에 관한 것이다.

본 발명자들은 식(I)의 4,5-디하이드록시-2-시클로펜텐-1-온, 4-하이드록시-2-시클로펜텐-1-온 및 그의 유도체들로 구성된 그룹으로부터 선택되는 화합물이 성장 인자 생산 증강 작용 및/또는 인터루킨-12 생산 증강 작용을 갖고, 성장 인자 생산 증강 및 인터루킨-12 생산 증강에 유용하다는 것을 발견하였다. 따라서, 본 발명이 완성되었다.

도면의 간단한 설명

도 1은 가열 온도 및 생산된 4HCP 양의 상관 관계를 나타낸다.

도 2는 가열 시간 및 생산된 4HCP 양의 상관 관계를 나타낸다.

도 3은 pH 및 생산된 4HCP 양의 상관 관계를 나타낸다.

도 4는 가열 온도 및 생산된 4ACP 양의 상관 관계를 나타낸다.

도 5는 가열 온도 및 생산된 4GCP 양의 상관 관계를 나타낸다.

도 6은 가열 시간 및 생산된 4ACP 양의 상관 관계를 나타낸다.

도 7은 가열 시간 및 생산된 4GCP 양의 상관 관계를 나타낸다.

도 8는 pH 및 생산된 4ACP 양의 상관 관계를 나타낸다.

도 9는 pH 및 생산된 4GCP 양의 상관 관계를 나타낸다.

도 10은 가열 시간 및 생산된 4,5-디하이드록시-2-펜테날 양의 상관 관계를 나타낸다.

발명의 상세한 설명

본 발명을 하기에 더욱 상세히 설명한다.

본 발명에서 사용되는 4,5-디하이드록시-2-시클로펜텐-1-온(이하, 시클로펜테논으로 언급함)을 제조하는 방법을 특정의 것으로 제한하지 않는다. 시클로펜테논은 화학적 합성법에 의해 제조될 수 있다[Carbohydrate Res., 247:217-222(1993); Helvetica Chimica Acta, 55:2838-2844(1972)]. 또한, 우론산, 우론산 유도체, 우론산 및/또는 우론산 유도체를 포함하는 사카라이드, 및 우론산 및/또는 우론산 유도체를 포함하는 사카라이드를 포함하는 물질로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 물질의 열처리물 및 그로부터 정제된 산물중 제조된 시클로펜텐 을 사용할 수 있다. 시클로펜테논을 함유하는 열처리물 및 그로부터 정제된 또는 일부 정제된 산물을 본 발명에서 사용할 수 있다. 상기는 WO 98/13328에 개시되어 있고, 이것은 본 명세서에서 참고 문헌으로 이용된다.

시클로펜테논을 함유하는 물질을 특정의 것으로 제한하지 않는다. 특히, 상기 언급된 시클로펜테논을 포함하는 열처리물 및 그로부터 일부 정제된 산물이 본 발명의 제 3면에서 바람직하게 사용될 수 있다.

본 발명에 따라, 4,5-디하이드록시-2-시클로펜텐-1-온 유도체(이하, 시클로펜테논 유도체로 언급함)이 시클로펜테논의 유도체이고 성장 인자 생산 및/또는 인터루킨-12 생산을 증강시키는 기능을 갖는 한, 그것을 특정의 것을 제한하지 않는다. 그의 예로서 식(II) 내지 (V)의 시클로펜테논 유도체를 포함한다.

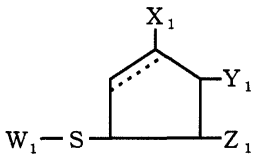
본 발명에서 사용되는 4-하이드록시-2-시클로펜텐-1-온(이하, 4HCP로 언급함)의 제조 방법을 특정의 것으로 제한하지 않는다. 4HCP는 화학적 합성법에 의해 제조될 수 있다. 그를 위한 공지된 합성법은 Tanaka, T. et al. 방법[Tetrahedron, 32:1713(1976)], Nara, M. et al. 방법[Tetrahedron, 36:3161(1980)] 및 Gill, M. et al.방법[Aust. J. Chem., 34:2587(1981)]을 포함한다. 이들 제조법은 많은 합성 단계를 포함하고, 복잡하며, 수득률이 낮고, 비효율적이다. 4-시클로펜텐-1,3-디온을 염화세륨(III) 및 소듐 보론 하이드라이드로 환원시키는 단일의 단계로 고수율의 4HCP를 수득할 수 있다.

펜토오스, 펜토오스 유도체, 펜토오스를 포함하는 화합물 및 펜토오스 유도체를 포함하는 화합물로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 열처리물, 및 그로부터 제조에서 생산된 4HCP 및 그로부터 정제된 산물중 제조된 4HCP를 사용할 수 있다. 4HCP를 함유하는 열처리물 및 그로부터 정제된 또는 일부 정제된 산물을 본 발명에서 사용할 수 있다. 상기는 WO 99/36383에 개시되어 있고, 이것은 본 명세서에서 참고 문헌으로 인용된다.

4HCP를 포함하는 물질을 특정의 것으로 제한하지 않는다. 특히, 상기 언급된 4HCP를 함유하는 열처리물 및 그로부터 정제된 또는 일부 정제된 산물을 바람직하게 본 발명의 제 3면에서 사용할 수 있다.

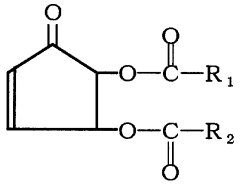
4HCP 유도체는 그것이 4HCP의 유도체이고 성장 인자 생산 및/또는 인터루킨-12 생산을 증강시키는 작용을 하는 한, 특정의 것으로 제한되지 않는다. 그의 예는 식(VI) 및 (VII)의 유도체를 포함한다. 또한, 펜토오스, 펜토오스 유도체, 펜토오스를 포함하는 화합물 및 펜토오스 유도체를 포함하는 화합물로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 물질의 열처리물 및 그로부터 제조된 산물중에 제조에서 4-(9-아데니닐-2-시클로펜텐-1-온(이하, 4ACP로 언급함) 및 4-(9-구아니닐)-2-시클로펜텐-1-온(이하, 4GCP로 언급함)을 사용할 수 있다. 이들 4ACP 및/또는 4GCP를 함유하는 열처리물 및 그로부터 정제된 또는 일부 정제된 산물을 바람직하게 본 발명에 사용할 수 있다.

또한 4HCP를 포함하는 물질 및 시클로펜테논 유도체를 포함하는 물질을 본 발명에 사용할 수 있다. 또한, 시클로펜텐, 시클로펜테논 유도체, 4HCP 및 4HCP 유도체의 광학 이성체, 및 그의 염들을 사용할 수 있다.



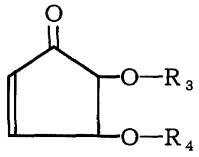
(II)

여기에서, 5원환중 점선으로 나타낸 결합은 5원환이 2중 결합을 갖는 시클로펜텐 환이거나 포화 시클로펜탄 환임을 의미한다; 시클로펜텐 환인 경우, X_1은 OH이고, Y_1은 =O이며 Z_1은 H이거나; 한편, 시클로펜탄 환인 경우, X_1은 =O이고, Y_1은 OH이며 Z_1은 OH이고; W_1은 SH 그룹이 SH 그룹-함유 화합물로부터 제거된 잔기이다.



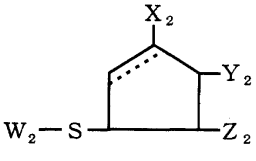
(III)

여기에서, R_1 및 R_2은 서로 동일하거나 상이할 수 있고, 수소이거나, 지방족, 방향족 또는 방향성 지방족 그룹이다.



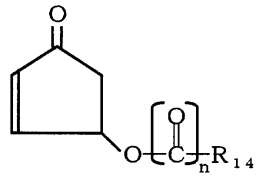
(IV)

여기에서, R_3 및 R_4는 서로 동일하거나 상이할 수 있고, 수소이거나, 지방족, 방향족 또는 방향성 지방족 그룹이며, 단, R_3 및 R_4은 동시에 H가 아니다.



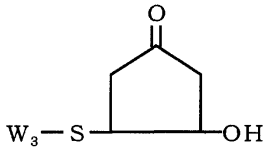
(V)

여기에서, 5원환중 점선 표시된 결합은 5원환이 이중결합을 갖는 시클로펜텐환이거나 포화된 시클로펜탄환임을 의미하고; 5원환이 시클로펜텐환인 경우, X_2는 OR_5이고, Y_2는 =O이며, Z_2는 H이고; 5원환이 시클로펜탄환인 경우, X_2는 =O이고, Y_2는 OR_6이며, Z는 OR_7이고; R_5은 R_8또는 -(CO)-R_9이고; R_6는 H, R_{10} 또는 -(CO)-R_{11} 이며; R_8은 H, R_{12} 또는 -(CO)-R_{13} 이고(여기에서 R_8,R_9,R_{10},R_{11},R_{12} 및 R_{13} 이 서로 동일하거나 상이할 수 있고, 지방족 그룹, 방향족 그룹 또는 방향성 지방족 그룹이며, R_9, R_{11} 및R_{13} 은 H일 수 있다), 단, R_2 및 R_3은 동시에 H가 아니며; W_2는 SH 그룹이 SH 그룹-함유 화합물로부터 제거된 잔기이다.



(VI)

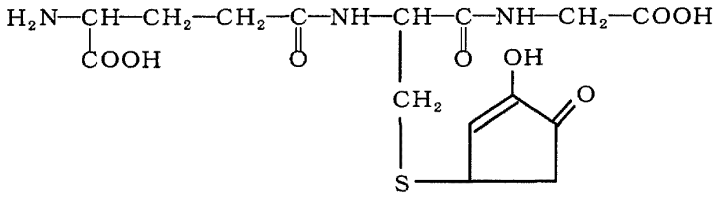
여기에서, R_{14} 는 지방족, 방향족 또는 방향성 지방족 그룹이고, n은 0 또는 1이며, 단, n이 0이면, R_{14} 는 H가 아니다.



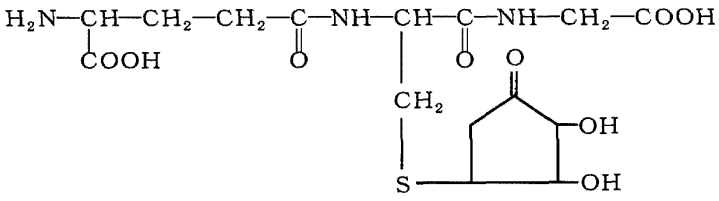
(VII)

W_3 은 SH 그룹이 SH 그룹-함유 화합물로부터 제거된 잔기이다.

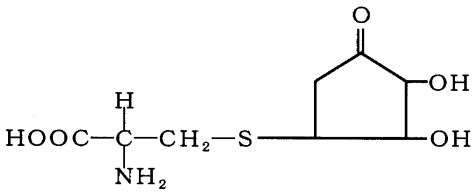
식(II)의 시클로펜테논 유도체가 WO 98/39291호에 상세히 개시되어 있다. 상기 유도체는 시클로펜테논을 시스테인 또는 글루타티온과 같은 SH 그룹-함유 화합물과 반응시켜 수득할 수 있다. 또한, 시클로펜테논 유도체를 함유하는 물질은 SH 그룹-함유 화합물을 시클로펜테논을 함유하는 물질에 가하여 수득할 수 있다. 유도체의 예는 식(VIII) 내지 (XI)의 화합물을 포함한다. 이하, 식(VIII)의 화합물을 GM으로서 언급한다.



(VIII)

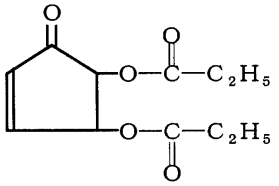


(IX)

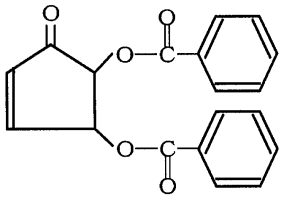


(XI)

식(III)의 시클로펜테논 유도체가 WO 98/40346호 및 PCT/JP99/04323호에 상세히 개시되어 있다. 시클로펜테논을 지방족, 방향족 또는 방향성 지방족 그룹을 갖는 카르복실산 및/또는 그의 반응성 유도체와 동시 또는 연속하여 반응시켜 유도체를 수득할 수 있다. 시클로펜테논 유도체의 예는 디아세틸시클로펜테논, 디벤조일시클로펜테논, 디헥사노일시클로펜테논, 디미리스토일시클로펜테논, 디옥타노일시클로펜테논, 디-3-옥테노일시클로펜테논, 디부티릴시클로펜테논, 디데카노일시클로펜테논, 디발레릴시클로펜테논, 디프로피오닐시클로펜테논, 디-2-헥사노일시클로펜테논, 디이소부티릴시클로펜테논, 디메톡시아세틸시클로펜테논, 메톡시푸마릴시클로펜테논, 메톡시말레릴시클로펜테논을 포함한다. 식(XII)은 디프로피오닐시클로펜테논의 구조를 나타낸다. 식(XIII)은 디벤조일시클로펜테논의 구조를 나타낸다.

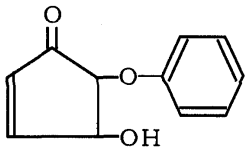


(XII)

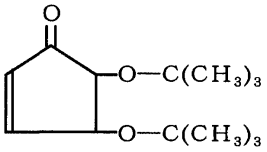


(XIII)

식(IV)의 시클로펜테논 유도체가 WO 99/00349 호에 상세히 개시되어 있다. 시클로펜테논을 지방족, 방향족 또는 방향성 지방족 그룹을 갖는 카르복실산 및/또는 그의 반응성 유도체와 동시 또는 연속하여 반응시켜 유도체를 수득할 수 있다. 시클로펜테논 유도체의 예는 4-벤질시클로펜테논 에테르, 5-벤질시클로펜테논 에테르, 4,5-벤질시클로펜테논 에테르, 4-t-부틸시클로펜테논 에테르, 5-t-부틸시클로펜테논 에테르, 4,5-디-t-부틸시클로펜테논 에테르를 포함한다. 식(XIV) 및 (XV)는 각각 5-벤질시클로펜테논 에테르 및 4,5-디-t-부틸시클로펜테논 에테르를 나타낸다.

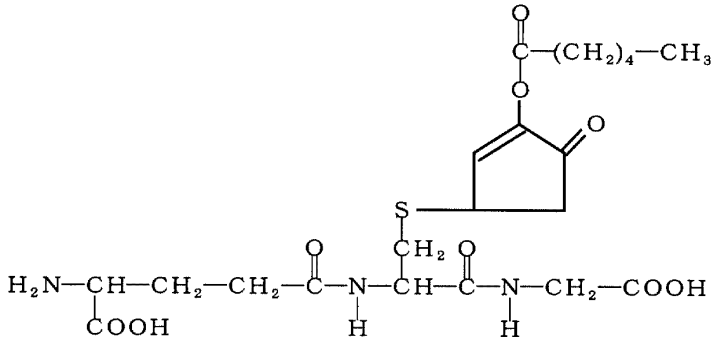


(XIV)

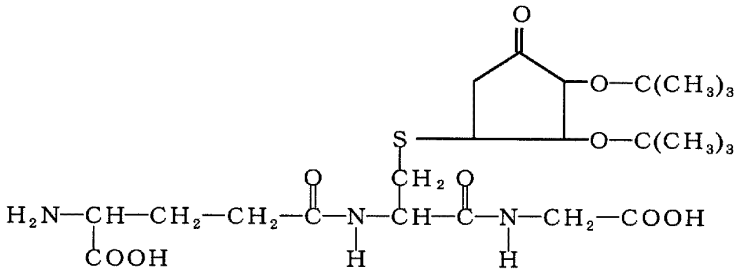


(XV)

식(V)의 시클로펜테논 유도체가 PCT/JP99/04323호에 상세히 개시되어 있다.식(III) 또는 (IV)의 화합물을 시스테인 또는 글루타티온과 같은 SH 그룹-함유 화합물과 반응시켜 시클로펜테논 유도체를 포함하는 물질을 수득할 수 있다. 시클로펜테논 유도체의 예는 식(XVI) 및 (XVII)의 화합물을 포함한다.



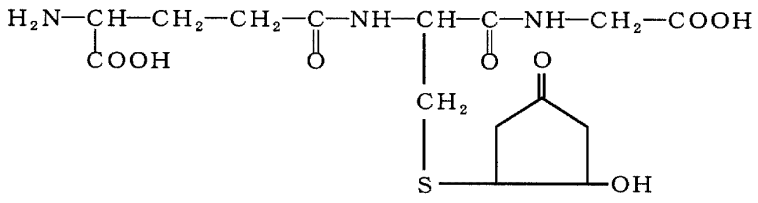
(XVI)



(XVII)

식(VI)의 4HCP 유도체는 4HCP를 지방족, 방향족 또는 방향성 지방족 그룹을 갖는 카르복실산 및/또는 그의 반응성 유도체와 반응시키거나, 4HCP를 지방족, 방향족 또는 방향성 지방족 그룹을 갖는 알콜 및/또는 그의 반응성 유도체와 반응시켜 수득할 수 있다.

식(VII)의 4HCP 유도체는 WO 99/36383 호에 개시된 바와 같이, 4HCP를 시스테인 또는 글루타티온과 같은 SH 그룹-함유 화합물과 반응시켜 수득할 수 있다. 또한, 4HCP 유도체를 함유하는 물질은 SH 그룹-함유 화합물을 4HCP를 포함하는 물질에 가하여 수득할 수 있다. 유도체의 예는 식(XVIII)의 화합물을 포함한다.



(XVIII)

본 발명에서, 생산 증강을 위해 요구되는 성장 인자는 그것이 세포 성장 촉진 활성을 갖는 한 특정의 것으로 제한되지 않는다. 그의 예로는, HGF, NGF, 표피 성장 인자, 우유-유도 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, 뇌-유도성 섬유아세포 성장 인자, 산성 섬유아세포 성장 인자, 혈소판-유도 성장 인자, 혈소판 염기성 단백질, 결합 조직-활성화 펩티드, 인슐린성 성장 인자, 집단자극인자(colony stimulating factors), 에리트로포이에틴, 트롬보포이에틴, T-세포 성장 인자, 인터루킨(예: 인터루킨-2,3,4,5,7,9,11 또는 15), B 세포 성장 인자, 연골-유도 인자, 연골-유도 성장 인자, 골-유도 성장 인자, 골격 성장 인자, 내피세포 성장 인자, 내피세포-유도 성장 인자, 눈-유도 성장 인자, 고환-유도 성장 인자, 세르토리(sertoli) 세포-유도 성장 인자, 유선자극 인자, 척수-유도 성장 인자, 대식세포-유도 성장 인자, 재생산 중배엽 성장 인자, 형질전환 성장인자-α, 형질전환 성장인자-β, 헤파린-결합 EGF성 성장 인자, 앰피레굴린, SDGF, 베타셀룰린, 에피레굴린, 뉴레굴린 1, 2, 및 3, 혈관 내피세포 성장인자, 뉴로프로핀, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5, NT-6, NT-7, 아교세포주-유도 신경친화성 인자, 간세포(stem cell), 미드카인(modkine), 플레이오트로핀(pleiotropin), 에프린(ephrin), 앤지오포이에틴(angiopoietin), 엑티빈, 종양 괴사 인자 및 인터페론을 포함한다.

HGF는 간세포 증식 작용, 단백질 합성 작용, 담즙울체 개선 작용, 약물에 의한 신장애 예방 작용 등을 보인다. HGF에 대한 mRNA는 뇌, 신장, 폐 등에서 합성된다. HGF는 간세포, 신세뇨관 세포, 내피 세포 증식 작용을 보인다. 따라서, HGF는 중배엽성 세포 성장 인자이다. 따라서, 간세포 성장 인자 생산을 증강시킴으로써, 간에서 간염, 중증간염, 간경변, 담즙울체, 만성 신염, 폐렴 등을 치료하거나 예방할 수 있다.

NGF는 신경 세포의 생존 및 기능을 유지시키거나 NGF 농도 구배에 따라 신경 세포를 신장시키는 내인성 성장 인자이다. 따라서, NGF 생산을 증강시켜, 그들의 치료 또는 예방을 위해 신경 기능의 수복/재생을 요하는 질환. 예를 들면, 알츠하이머 질환과 같은 노인성 치매, 말초신경장애, 뇌혈관장애, 뇌종양, 뇌첨, 두부외상 퇴화성 질환, 마취 약물 중독 등을 치료 또는 예방할 수 있다.

인슐린성 성장 인자는 다양한 세포에 대하여 다양한 생리 작용을 보인다. 인슐린성 성장 인자 생산을 증강시켜 당뇨병 II형(인슐린 비의존성 당뇨병) 및 성장장애(소인증)를 치료하거나 예방할 수 있다. 또한, 인슐린성 성장 인자는 궁둥신경장애에서 궁둥신경의 재생을 촉진한다. 따라서, 그것을 근위축성측삭경화증을 치료용 또는 예방용으로 사용할 수 있다.

시클로펜테논, 시클로펜테논 유도체, 4HCP 및 4HCP 유도체는 인터루킨-12 생산을 증강시키는 능력을 보인다. 그러므로, 시클로펜테논, 시클로펜테논 유도체, 4HCP 및 4HCP 유도체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 화합물을 활성 성분으로서 포함하는, 인터루킨-12 생산 증강용 조성물을 제공한다. 언급된 조성물은 통상의 방법으로 제조될 수 있고 그의 치료 또는 예방을 위해 인터루킨-12 생산의 증강을 요하는 질환의 치료 또는 예방용 약제 조성물로서 사용할 수 있다.

인터페론γ(IFNγ)은 T세포(Th1)가 항원 전달 세포 (APCs) 등에 의해 T세포 수용체(TCR)을 통해 자극받을 경우 생산된다. 또한, 상기 생산은 APCs로부터 생산된 인터루킨-12에 의해 유도된다. 따라서, IFNγ의 생산은 IL-12 생산의 증강에 의해 유도된다. 유도된 IFNγ은 생물학적 방어 능력을 증강시키기 위해 바이러스 감염, 진균 감염, 암질환 등에 대한 세포 면역을 작용화시킨다(세포독성 T 세포, NK 세포, 대식 세포 등). 한편, 앨러지성 질환을 유발한다고 판단되는 Th2의 작용을 억제하는 것이 천식, 화분증, 아토피성 피부염 등을 치료 또는 예방하는데 효과적일 수 있다.

또한, 시클로펜테논, 시클로펜테논 유도체, 4HCP 및 4HCP 유도체는 근육 증가/강화 작용을 갖는다. 그러므로, 활성 성분으로서 이들 화합물중 하나 또는 상기 화합물들을 포함하는 물질을 포함하는 근육 증강용/강화용 조성물을 제공한다. 상기 화합물들을 포함하는 물질을 특정의 것으로 제한하지 않는다. 예를 들면, 다량의 4HCP를 포함하는 DNA의 열처리물을 사용할 수 있다. 펜토오스를 함유하는 물질인 DNA를 열처리하여 열처리물을 수득한다.

압좌골신경을 압좌(crush)시켜 수축된 근육의 회복 정도를 기능 및 양으로 측정하여 근육 증강/강화 작용을 판단할 수 있다. 이 모델 시험에서 장애로부터의 회복은 주로 신경 재생에 의한다고 보고되어 왔다. 비타민B1 및 비타민 B12은

닭 태아의 감각 신경절 또는 척수의 조직 배양 시험에서 신경 섬유의 신장을 현저하게 촉진시키고, 또한 좌골신경 압좌 모델에서 근육(예: 가자미근)의 양을 회복시키는 상당한 효과를 갖는다고 보고되었다(Folia pharmacol. Japon. 74:721-734(1978)].

상기 기재된 모델 시험에서는 DNA의 열처리물이 유효하다고 보고되어 있지 않다. 그의 인슐린성 성장 인자, HGF 또는 NGF의 생산 증강 효과, 또는 근육 증강 또는 근육 기능 회복의 효과는 보고되어 있지 않다. 본 발명자는 DNA의 열처리물이 인슐린성 성장 인자, HGF 또는 NGF의 생산을 증강시킨다는 것을 발견하였다. 따라서, 그들의 치료 또는 예방을 위해 인슐린성 성장 인자를 요하는 근위축성측각경화증 및 성장장애, 골다공증, 당뇨 및 신부전의 치료 또는 예방용으로 사용할 수 있다.

시클로펜테논, 시클로펜테논 유도체, 4HCP 및 4HCP 유도체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 화합물은 성장 인자 생산 및/인터루킨-12 생산을 증강시키는 능력을 갖는다. 따라서, 그의 치료 또는 예방을 위해 성장 인자 생산 증강을 요하는 질환 및/또는 그의 치료 또는 예방을 위해 인터루킨-12 생산 증강을 요하는 질환의 치료 또는 예방용 약제 조성물은 활성 성분으로서 이들 화합물들 중 하나를 사용하여 제조될 수 있다. 또한, 활성 성분으로서 상기 화합물을 사용하여 근육 증강/강화용 조성물을 제조할 수 있다.

치료 또는 예방용 약제 조성물은 시클로펜테논, 시클로펜테논 유도체, 4HCP 및 4HCP 유도체으로 구성된 그룹으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 화합물을 그의 활성 성분으로 사용하고, 그것을 공지된 약제학적 담체와 제제화하여 제조될 수 있다. 상기 조성물을 일반적으로 약제학적으로 허용가능한 액체 또는 고체 담체 및, 임의로 용매, 분산제, 유화제, 완충제, 안정화제, 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제 등과 혼합하여 제제화한다. 제제는 정제, 과립, 산제, 산포제 및 캡슐제와 같은 고체 제제의 형태, 또는 일반 액제, 현탁제 및 유제와 같은 액체 제제의 형태로 제조될 수 있다. 또한, 그것은 건성 제제로 제조되어 사용전에 적절한 담체를 가함으로써 액체 제제로 재구성될 수 있다.

치료용 또는 예방용 약제 조성물은 경구용 제제 또는 주사제 및 드롭제와 같이 비경구용 제제로서 투여될 수 있다.

상기-언급된 특정 투여 경로와 제형에 따라, 약제학적 담체를 선택할 수 있다. 예를 들면, 전분, 락토오스, 수크로오스, 만닛, 카복시메틸셀룰로오스, 옥수수전분, 무기염 등이 경구용 제제를 위해 사용된다. 결합제, 붕해제, 계면 활성제, 활택제, 유동성-촉진제, 감미제, 착색제, 향미제 등이 또한 경구용 제제에 포함될 수 있다.

통상의 방법에 따라 치료 또는 예방용 약제 조성물의 활성 성분으로서 시클로펜테논, 시클로펜테논 유도체, 4HCP 및 4HCP 유도체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 화합물을 희석제에 용해시키거나 현탁시켜 비경구용 제제를 제조할 수 있다. 희석제는 주사용 증류수, 생리식염수, 포도당 수용액, 주사용 식물성 오일, 참기름, 땅콩 기름, 콩유, 옥수수유, 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 임의로, 살균제, 안정화제, 삼투압 조절제, 유연제 등을 액제 또는 현탁제에 가할 수 있다.

본 발명의 치료 또는 예방용 약제 조성물은 조성물의 제형에 따라 적절한 경로를 통해 투여된다. 투여 경로는 특정의 것으로 제한되지 않는다. 조성물은 내부로 또는 외부로(또는 국소적으로) 또는 주사에 의해 투여될 수 있다. 주사제는 예를 들면, 정맥내로, 근육내로, 피하로, 내피 등으로 투여될 수 있다. 외부용 제제는 좌제를 포함한다.

치료 또는 예방용 약제 조성물의 용량은, 특정 제형, 투여 경로 및 목적 및, 치료 받는 환자의 나이, 몸무게 및 상태에

따라 적절히 결정되고 변화된다. 일반적으로, 제제에 함유되어 있는 활성 성분의 양에 기초하여, 성인 1일 복용량은 10μg 내지 200mg/kg이다. 물론, 복용량은 다양한 인자에 따라 달라질 수 있다. 그러므로, 어느 경우에는 상기의 것보다 적은 양이 충분할 수 있지만, 다른 경우에는 상기의 것보다 더 많은 양이 요구된다. 본 발명의 약제 조성물은 그 자체로 경구로 투여될 수 있거나, 선택된 식품 및 음료에 가해져 매일 섭취될 수 있다.

시클로펜테논, 시클로펜테논 유도체, 4HCP 및 4HCP 유도체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 화합물을 활성 성분으로서 함유하는 성장 인자 생산 또는 인터루킨-12 생산 증강용 조성물은 치료 또는 예방용 약제 조성물을 위해 상기 기재된 것과 유사한 방법으로 제조 및 투여될 수 있다. 성장 인자 생산 또는 인터루킨-12 생산 증강용 조성물은 성장 인자 생산 증강을 위한 방법에 사용될 수 있고, 성장 인자의 기능 연구 및 성장 인자와 관련된 의약 조사에 유용하다.

본 발명의 성장 인자 생산 증강용 조성물을 특정의 것으로 제한하지 않는다. 그의 예로 HGF 생산 증강을 요하는 질환의 치료 또는 예방용 약제 조성물, NGF 생산 증강을 요하는 질환의 치료 또는 예방용 약제 조성물, h-IGF 생산 증강을 요하는 질환의 치료 또는 예방용 약제 조성물로서 각각 사용할 수 있는 HGF 생산 증강용 조성물, NGF 생산 증강용 조성물, 및 h-IGF 생산 증강용 조성물을 포함한다.

시클로펜테논, 시클로펜테논 유도체, 4HCP 및 4HCP 유도체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 화합물을 본 발명의 HGF 생산 증강용 조성물의 활성 성분으로서 사용할 수 있다. 본 발명을 제한하는 것은 아니지만, 시클로펜텐환을 갖는 화합물이 바람직하게 사용된다. 또한, 본 발명의 HGF 생산 증강용 조성물은 HGF 유전자의 트랜스크립션(transcription)을 유도하여 HGF 생산을 증강시키는, 사이토카인 및 IL-1, 프로스타글란틴 E_1 및 프로스타글란딘 E_2 을 포함하는 프로스타글란딘으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 물질을 포함할 수 있다. 본 발명의 HGF 생산 증강용 조성물이 HGF 유전자의 트랜스크립션을 유도 작용을 하는 경우, 조성물은 HGF 생산을 증강시키기 위해 HGF 유전자에 대한 mRNA의 트랜스레이션(translation) 단계 이하의 단계를 촉진시키는 작용을 갖는 물질을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 그것에 의해 HGF 생산을 동시에(synergistically) 증강시키는 HGF 생산 증강용 조성물이 제공된다. 그것이 HGF 생산을 증강시키기 위해 HGF 유전자에 대한 mRNA의 트랜스레이션(translation) 단계 이하의 단계를 촉진시키는 작용을 갖는 한 시너지(synergistic) 효과을 위해 사용되는 물질을 특정의 것으로 제한하지 않는다. 그의 예로 헤파린, 헤파란 설페이트 및 푸코이단과 같은 황산화 폴리사카라이드 및 그의 분해산물을 포함한다. HGF 생산 증강 작용을 갖는 쇼가올(shogaol) 또는 진저(ginger)로부터 유래된 진저롤(gingerol), 큐큐마(curcuma)로부터 유래된 큐큐민(cucumin) 등, 또는 이들 물질들을 포함하는 물질들이 본 발명의 HGF 생산 증강용 조성물에 포함될 수 있다. 또한, 본 발명의 성장 인자 생산 및/또는 인터루킨-12 생산 증강용 조성물을 선택된 식품 및 음료에 가해져 매일 섭취될 수 있다.

본 발명의 시클로펜테논, 시클로펜테논 유도체, 4HCP 및 4HCP 유도체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 화합물을 활성 성분으로서 함유하는 근육 증강/강화용 조성물은 치료 또는 예방용 약제 조성물을 위해 상기 기재된 것과 유사한 방법으로 제조 및 투여될 수 있다.

시클로펜테논을 함유하는 물질, 시클로펜테논 유도체를 함유하는 물질, 4HCP을 함유하는 물질 및 4HCP 유도체를 함유하는 물질로 구성된 그룹으로부터 선택되는 물질을 활성 성분으로서 포함하고, 그 물질을 희석시켜 제조되고/거나 그 물질을 가하여 제조되는, 성장 인자 생산 및/또는 인터루킨-12 생산 증강용 식품 또는 음료의 제조 방법을 특정의 것으로 제한하지 않는다. 생산된 식품 또는 음료가 시클로펜테논을 함유하는 물질, 시클로펜테논 유도체를 함유하는 물질, 4HCP을 함유하는 물질 및 4HCP 유도체를 함유하는 물질로 구성된 그룹으로부터 선택되는, 생리학적 작용을 갖는 유효량의 물질을 포함하는 한, 쿠킹, 처리 및 식품 또는 음료 제조를 위해 통상 사용되는 어느 가공도 사용될 수 있다. 식품 또는 음료는 성장 인자 생산 및/또는 인터루킨-12 생산 증강 작용을 갖는 기능성 식품 또는 음료로서 섭취될 수 있다.

또한, 시클로펜테논을 함유하는 물질, 시클로펜테논 유도체를 함유하는 물질, 4HCP를 함유하는 물질 및 4HCP 유도체를 함유하는 물질로 구성된 그룹으로부터 선택되는 물질을 활성 성분으로서 함유하고, 그 물질을 희석시켜 제조되고/거나 그물질을 가하여 제조되는, 근육 증강/강화용 식품 또는 음료 제조 방법을 특정의 것으로 제한하지 않는다. 생산된

식품 또는 음료가 시클로펜테논을 함유하는 물질, 시클로펜테논 유도체를 함유하는 물질, 4HCP을 함유하는 물질 및 4HCP 유도체를 함유하는 물질로 구성된 그룹으로부터 선택되는, 생리학적 작용을 갖는 유효량의 물질을 포함하는 한, 쿠킹, 처리 및 식품 또는 음료 제조를 위해 통상 사용되는 어느 가공도 사용될 수 있다. 식품 또는 음료는 근육 증강/강화 작용을 갖는 기능성 식품 또는 음료로서 섭취될 수 있다.

본 발명에서 사용되는 시클로펜테논, 시클로펜테논 유도체, 4HCP 및 4HCP 유도체가 생리학적 유효량으로 투여되는 경우, 독성은 관찰되지 않는다. 또한, 이들 물질을 포함하는 물질들에 대하여도 비독성이다.

예를 들면, 시클로펜테논, GM, 4HCP, 디프로피오닐시클로펜테논, 디헥사노일시클로펜테논, 디-2-헥세노일시클로펜테논, 디이소부틸시클로펜테논, 디벤조일시클로펜테논, 4-t-부틸시클로펜테논 에테르, 또는 4,5-디-t-부틸시클로펜테논 에테르 또는 그의 광학 이성체 또는 염을 100mg/kg으로 마우스에 경구 투여한 경우, 죽은 것은 관찰되지 않았다.

실시예

본 발명을 하기 실시예에 의해 추가로 상세히 설명할 것이다. 그러나, 본 발명을 그의 실시예로 제한하는 것은 아니고, 실시예에서 사용되는 "%" 는 "중량%" 를 의미한다.

참조 실시예 1

(1) 10g의 D-글루쿠론산(Sigma, G 5269)을 물 1ℓ에 용해시켰다. 용액을 121℃에서 4시간동안 가열한 뒤 감압하에서 약 10㎖로 농축시켰다. 부틸 아세테이트 : 아세트산 : 물 = 3:2:2 혼합물의 상층 40㎖를 그것에 가하고 혼합하였다. 혼합물을 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 생성된 상등액을 감압하에서 약 10㎖로 농축시켰다.

추출액을 칼럼 크로마토그래피 BW-300SP용 실리카겔(2x28 cm, Fuji Sylysia)에 가하고 압축기를 사용하여 0.2kg/㎠의 압력을 이용하면서 5㎖/분의 유속으로 용리제로 부틸 아세테이트 : 아세트산 : 물 = 3:2:2 혼합물의 상층을 사용하여 분리하였다. 각 분획이 10㎖의 용출액을 함유하도록 분별법을 수행하였다. 각 분획의 일부를 박층 크로마토그래피상에서 분석하였다. 61번째 내지 80번째 분획은 고순도의 시클로펜테논을 함유하였다. 이들 분획을 회수하고 감압하에서 농축시킨 후, 40㎖의 클로로포름으로 추출했다. 추출액을 감압하에서 농축시켜 100mg의 시클로펜테논을 수득하였다.

분획을 팔팩 타입 에스 칼럼(Palpack Type S column)(Takara Shuzo)을 사용하여 정규상 HPLC상에서 분리하였다. 215nm에서 자외선 흡광도를 사용하여 검출하하였을 때, 순도가 98%임을 확인하였다.

(2) 30mg의 시클로펜테논, 16mg의 디메틸아미노피리딘(DMAP), 66mg의 트리에틸아민 및 86mg의 프로피온산 무수물(Tokyo kasei Kogyo, PO513)을 5.9㎖의 디클로로메탄에 용해시켰다. 혼합물을 얼음 냉각하면서 1시간동안 반응시켰다. 이어서, 반응 혼합물을 전개액으로서 클로로포름:메탄올=200:1을 사용하여 실리카겔 박층 크로마토그래피상에서 전개시켰다. 박층의 Rf가 0.5 내지 0.6인 부분으로부터 실리카겔을 스크래핑(scraping)하고 클로로포름으로 추출하여 31mg의 디프로피오닐시클로펜테논을 수득하였다.

핵자기공명에 의해 생산된 디프로피오닐시클로펜테논의 구조적 분석 결과를 하기에 나타내었다.

^{1}H-NMR

δ7.45 (1H, dd, J2-3=6.27 Hz, J3-4=2.15 Hz, H-3), 6.42 (1H, dd, J2-3=6.27 Hz, J3-4=1.49 Hz, H-2), 5.91 (1H, m, H-4), 5.16 (1H, d, J4-5=2.97 Hz, H-5), 2.46 (2H, dd, J=15.01, 7.59 Hz), 2.42 (2H, dd, J=15.01, 7.59 Hz), 1.18 (6H, dd, J=7.59, 7.59 Hz)

(3) 100㎕의 1M 시클로펜테논 수용액 및 500㎕의 200mM 글루타티온 수용액(환원된 형태: Nacalai Tesque사로부터 구입: 170-10)(pH 3.0)을 함께 혼합하였다. 상기 혼합물을 5시간동안 60℃에서 반응시켰다. 반응 혼합물을 0.5㎛ 코스모니스 필터(Cosmonice Filter)(Nacalai Tesque)를 통해 여과하고, 하기 조건하에 HPLC 상에서 분리하였다.

칼럼 : TSKgel ODS-80Ts(5㎛), 20mm x 25㎝(Tosoh);

이동상 A: 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA) 수용액;

B: 0.1% TFA/50% 아세토니트릴 수용액;

유속: 7.5㎖/분;

구배: 이동상 A(10분) →이동상 A에서 A : B = 1:1으로(55분) →이동상 A:B = 1:1 에서 이동상 B로(15분);

검출: 220 nm에서 흡광도.

200㎕의 반응 혼합물을 HPLC시켰다. 체류시간 35.7분 및 36.1분에 피크를 회수하고, 감압하에서 건조 농축시켜 건조 고체 5.5mg을 수득하였다.

건조 고체의 구조를 분석하였다. 핵자기공명(NMR) 스펙트럼 및 질량 스펙트럼(MS)을 측정하였다. 결과는 하기에 나타낸다.

^{1}H-NMR

δ2.09 (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 or 2.89 (1H, dd, J=3.0, 6.0 Hz, 5-H), 2.92 or 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 or 6.49 (1H, d, J=3.0 Hz, 3-H)

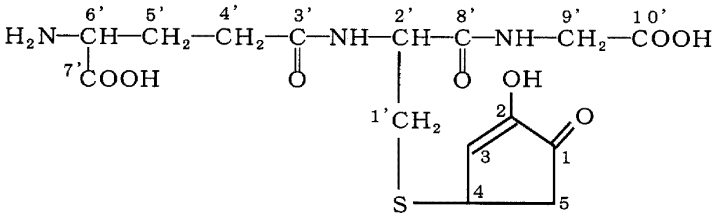
샘플을 중수중의 0.1N DCl 용액에 용해시켰다. HOD의 화학적 시프트값을 4.65ppm으로 가정하고 결과를 나타낸다.

^{13}C-NMR

δ26.3 (5'-C), 31.7 (4'-C), 31.9 or 32.1 (1'-C), 39.3 (4-C), 41.9 (9'-C), 42.2 or 42.3 (5-C), 53.3 (6'-C), 54.1 (2'-C), 133.5 (3-C), 154.4 (2-C), 약 173 (3'-C, 7'-C, 8'-C, 10'-C), 205.8 (1-C)

샘플을 중수중의 0.1N DCl 용액에 용해시켰다. HOD의 화학적 시프트값을 67.4ppm으로 가정하고 결과를 나타낸다.

^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR에서 피크 동정에 대한 번호를 하기 식(XIX)에 명시한다.



(XIX)

FAB-MS

m/z 404 $(M+H)^{+}$, 426$(M+Na)^{+}$

글리세롤을 매트릭스로 사용하였다.

UV $\lambda_{최대}$ 251nm(물)

IR υ^{KBr} $_{최대}$ cm^{-1} 2949, 1710, 1660, 1539, 1404, 1203

확산 반사율법(diffuse reflectance method)에 따라 측정하였다.

상기 언급된 결과는 건조 고체가 GM, 즉, 2-하이드록시-4-글루타티온-S-일-2-시클로펜텐-1-온임을 나타내었다.

(4) 5%(w/v)의 DNA·Na(Nichiro) 수용액은 pH 5.6을 가졌다. 희석된 HCl을 가하여 용액의 pH를 5.5로 조정한 후, 혼합물을 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 또는 120℃에서 3시간동안 열 블록(heat block)에서 가열하였다.

가열된 혼합물의 상등액중에 4HCP의 농도를 박층 크로마토그래피 방법으로 측정하였다.

간단히, 각각의 1㎕의 가열된 혼합물의 상등액 및 2,4,6,8,10 및 12mM 4HCP 수용액을 박층 크로마토그래피(MERCK)용 실리카겔 플레이트상에 스팟팅(spotting)하고, 클로로포름: 메탄올=4:1의 혼합물을 사용하여 전개시켰다. 오르시놀-황산 시약을 사용하여 붉은색을 전개시킨 후, 포토/아날리스트 아치버(Photo/Analyst Archiver(Fotodyne inc.)를 사용하여 플레이트의 상을 판독하고, 각 스팟의 세기를 1-DBasic(Advanced American Biotechnology software)를 사용하여 수로 표현하여 4HCP에 대한 표준화곡선을 사용하여 각 샘플에 대한 농도를 측정하였다.

상기 결과를 도 1에 나타낸다. 도 1은 가열 온도와 생산된 4HCP의 양의 상관 관계를 나타낸다. 도에서, 세로축은 생산된 4HCP의 양(mM) 및 가로축은 가열 온도(℃)를 나타낸다. 도에 나타낸 바와 같이, 생산된 4HCP의 양은 가열 온도가 증가함에 따라 증가하였다.

(5) 희석된 HCl을 가하여 5%(w/v) DNA·Na 수용액(Nichiro)의 pH를 5.5로 조정한 후, 혼합물을 오토클레이브(autoclave)를 사용하여 120℃에서 0,1,3,5 또는 9시간동안 가열하였다.

가열된 혼합물의 상등액중에 4HCP의 농도를 참조 실시예 1-(4)에 기재된 방법으로 측정하였다.

상기 결과를 도 2에 나타낸다. 도 2는 가열 시간 및 생산된 4HCP 양의 상관 관계를 나타낸다. 도에서, 세로축은 생산된 4HCP의 양(mM) 및 가로축은 가열 시간(시간)을 나타낸다. 도에 나타낸 바와 같이, 생산된 4HCP의 양은 가열 시간 3시간째 그의 피크에 도달하였다.

(6) 5%(w/v) DNA·Na 수용액(Nichiro)의 pH를 희석된 HCl를 가하여 4.0, 5.0, 5.5 또는 6.0으로 조정하거나, 희석된 NaOH를 가하여 7.0으로 조정한 후, 혼합물을 오토클레이브를 사용하여 120℃에서 3시간동안 가열하였다.

가열된 혼합물의 상등액중에 4HCP의 농도를 참조 실시예 1-(4)에 기재된 방법으로 측정하였다.

상기 결과를 도 3에 나타낸다. 도 3은 pH 및 생산된 4HCP 양의 상관 관계를 나타낸다. 도에서, 세로축은 생산된 4HCP의 양(mM) 및 가로축은 pH를 나타낸다. 도에 나타난 바와 같이, 약 pH 5에서 생산된 4HCP의 양은 최고로 증가하였다.

(7) 희석된 HCl을 가하여 5%(w/v)의 DNA·Na(Nichiro) 수용액의 pH를 5.5로 조정한 후, 혼합물을 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 또는 120℃에서 3시간동안 열 블록중에서 가열하였다.

가열된 혼합물의 상등액을 하기 조건하에 역상 HPLC상에서 분석하였다.

칼럼: YMCpack ODS-AM(φ4.6mm x 25㎝, YMC);

이동상 : 3% 아세토니트릴 수용액, 0.8㎖/분;

검출: 210nm.

25분에 용출된 4GCP에 대한 피크 범위 및 33분에 용출된 4ACP에 대한 피크 범위를 측정하였다. 이어서, 각 화합물에 대한 표준화 곡선을 사용하여 샘플들중의 각 화합물의 농도를 측정하였다.

상기 결과를 도 4 및 5에 나타낸다. 도 4는 가열 온도 및 생산된 4ACP 양의 상관관계를 나타낸다. 도에서, 세로축은 생산된 4ACP의 양(mM) 및 가로축은 가열 온도(℃)를 나타낸다. 도 5는 가열 온도 및 생산된 4GCP 양의 상관관계를 나타낸다. 도에서, 세로축은 생산된 4GCP의 양(mM) 및 가로축은 가열 온도(℃)를 나타낸다.

도 4 및 5에 나타낸 바와 같이, 3시간동안 100℃ 이상에서 가열하였을 때, 4ACP 및 4GCP가 생산된 것이 관찰되었고, 더욱 고온에서 가열하여 더 많은 양의 생산물을 수득하였다.

(8) 희석된 HCl을 가하여 5%(w/v)의 DNA·Na(Nichiro) 수용액의 pH를 5.5로 조정한 후, 혼합물을 0,1,3,5 또는 9시간동안 오토클레이브를 사용하여 120℃에서 가열하였다.

가열된 혼합물의 상등액중의 4ACP 및 4GCP의 농도를 참조 실시예 1-(7)에 기재된 방법으로 측정하였다.

상기 결과를 도 6 및 7에 나타낸다. 도 6은 가열 시간 및 생산된 4ACP 양의 상관 관계를 나타낸다. 도에서, 세로축은 생산된 4ACP의 양(mM) 및 가로축은 가열 시간(시간)을 나타낸다. 도 7은 가열 시간 및 생산된 4GCP 양의 상관 관계를 나타낸다. 도에서, 세로축은 생산된 4GCP의 양(mM) 및 가로축은 가열 시간(시간)을 나타낸다.

도 6 및 7에 나타낸 바와 같이, 4ACP 및 4GCP의 양은 3시간째 그들이 피크에 도달하였고, 그 이후 감소하였다.

(9) 5%(w/v) DNA·Na 수용액(Nichiro)의 pH를 희석된 HCl를 가하여 4.0, 5.0, 5.5 또는 6.0으로 조정하거나, 희석된 NaOH를 가하여 7.0으로 조정한 후, 혼합물을 오토클레이브를 사용하여 120℃에서 3시간동안 가열하였다.

가열된 혼합물의 상등액중에 4ACP 및 4GCP의 농도를 참조 실시예 1-(7)에 기재된 방법으로 측정하였다.

상기 결과를 도 8 및 9에 나타내었다. 도 8은 pH 및 생산된 4ACP 양의 상관 관계를 나타낸다. 도에서, 세로축은 생산된 4ACP의 양(mM) 및 가로축은 pH를 나타낸다. 도 9는 pH 및 생산된 4GCP 양의 상관 관계를 나타낸다. 도에서, 세로축은 생산된 4GCP의 양(mM) 및 가로축은 pH를 나타낸다.

도 8 및 9에 나타난 바와 같이, 약 pH 5에서 4ACP 및 4GCP 모두 최대로 증가하였다.

(10) 0.1M 2-데옥시-D-리보스(Sigma) 수용액을 0.5, 1, 2, 4 또는 15시간동안 121℃에서 가열하였다.

가열된 용액의 상등액을 하기 조건하에 역상 HPLC상에서 분석하였다.

칼럼: YMCpack ODS-AM(φ4.6mm x 25㎝, YMC);

이동상 A : 0.1% TFA 수용액;

B : 0.1% TFA/80% 아세토니트릴 ;

유속 : 0.8㎖/분;

용출: 이동상 A(5분) →이동상 A으로부터 B로의 선상 구배(20분) →이동상 B;

검출: 215nm.

7분에 용출된 4,5-디하이드록시-2-펜테날에 대한 피크 범위를 측정하여, 표준화 곡선을 사용하여 샘플들중의 각 화합물의 농도를 측정하였다.

상기 결과를 도 10에 나타낸다. 도 10은 가열 시간 및 생산된 4,5-디하이드록시-2-펜테날의 상관 관계를 나타낸다. 도에서, 세로축은 생산된 4,5-디하이드록시-2-펜테날의 양(mM) 및 가로축은 가열 시간(시간)을 나타낸다. 도 10에 나타난 바와 같이, 5시간동안 가열한 후 4,5-디하이드록시-2-펜테날의 양은 피크에 도달하였다.

실시예 1

0.5% 박토 펩톤(Gibco)를 함유하는 M199 배지(gibco)중에 래트 섬유아세포 L-M 세포(ATCC CCl-1.2)를 1.0 x 10^5 세포/㎖ 농도로 현탁시켰다. 1㎖의 현탁액을 24-웰 플레이트의 각 웰내에 접종하였다. 각 세포를 무균상태로 배양하였다. 2일동안 배양한 후, 배지를 제거하고 0.5% 우아혈청 알부민(Sigma)를 함유하는 M199 배지로 대신하였다. 이어서, 시클로펜테논(최종 농도 1 내지 25μM), 4HCP(Aldrich)(최종 농도 12.5μM) 또는 디프로피오닐시클로펜테논(최종 농도 3.1 내지 9.4μM)을 그것에 가하였다. 이어서, 플레이트를 24시간동안 인큐베이션시켰다.

인큐베이션 종료후, 배양액중의 신경 성장 인자의 농도를 효소 면역분석법(NGF Immuno Assay System: Promega)에 의해 측정하였다. 결과, 시클로펜테논, 4HCP 및 디프로피오닐시클로펜테논은 농도에 의존하는 방법으로 L-M 세포에 의해 신경 성장 인자의 생산을 증강시켰다. 상기 결과를 표 1 내지 4에 나타내었다.

표 1 : 시클로펜테논에 의한 신경 성장 인자 생산의 증강

시클로펜테논 농도 (μM)	신경 성장 인자 농도 (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

표 2 : 4HCP에 의한 신경 성장 인자 생산의 증강

4HCP 농도 (μM)	신경 성장 인자 농도 (ng/ml)
0	0.138
12.5	0.327

표 3 : 디프로피오닐시클로펜테논에 의한 신경 성장 인자 생산의 증강

디프로피오닐시클로펜테논 농도 (μM)	신경 성장 인자 농도 (ng/ml)
0	0.132
3.1	0.164
6.3	0.259
9.4	0.257

표 4 : 시클로펜테논에 의한 신경 성장 인자 생산의 증강(시간 곡선)

시클로펜테논 농도	배양시간 (hour)					
	0	3	6	12	24	48
(μM)	신경 성장 인자 농도 (ng/ml)					
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

다른 시클로펜테논 유도체 또한 L-M 세포에 의해 신경 성장 인자의 생산을 증강시켰다.

실시예 2

10% 우태혈청을 함유하는 DME 배지(Bio Whittaker)중에 MRC-5 세포(CCL171, Dainippon Pharmaceutical)를 1.0×10^5 세포/㎖ 농도로 현탁시켰다. 500㎕의 현탁액을 48-웰 세포 배양 플레이트에 위치시켰다. 24시간동안 5% CO_2의 존재에 37℃에서 배양한 후, 배지를 1% 우태혈청을 함유하는 DME 배지로 교환하였다. 이어서, 샘플중 하나를 그에 가하였다. 플레이트를 추가로 24시간동안 인큐베이션하였다. 이어서, 배지를 회수하고, 퀀티킨 휴먼 헤파토사이트 그로쓰 팩터 엘자 키트(Quantikine Human Hepatocyte Growth Factor(HGF) ELISA Kit(Funakoshi))를 사용하여 배양액중의 HGF의 양을 측정하였다. 음성 대조군을 100%로서 정의하면서 생산된 HGF의 양을 나타내었다. 이러한 경우, 음성 대조군에 대하여 생산된 HGF의 양은 7.2ng/㎖이었다. 시클로펜테논(최종 농도 20, 40 또는 160㎛), GM(최종 농도 20, 40, 80 또는 160㎛), 또는 디프로피오닐시클로펜테논(최종 농도 32 또는 64㎛)를 샘플로서 가하였다. 음성 대조군으로서, 증류수를 샘플과 동일한 부피로 가하였다. 양성 대조군으로서, 프로스타글란딘 E_1을 최종 농도 0.01, 0.1, 1 또는 10㎛으로 가하였다.

결과, 각 경우에서 시클로펜테논 또는 그의 유도체를 가한 세포에 의해 생산된 HGF의 양은 증류수를 가한 음성 대조군과 비교하여 현저하게 증가하였다. 또한, 상기의 생산된 HGF의 양은 프로스타글란딘 E_1을 가한 양성 대조군과 비교하여 현저하게 증가하였다. 따라서, HGF를 증강시킨다고 확인된 프로스타글란딘보다 시클로펜테논 및 그의 유도체가 더욱 강한 HGF 생산 증강 작용을 갖는다는 것이 밝혀졌다. 시클로펜테논, GM 및 디프로피오닐시클로펜테논을 가하여 수득한 결과를 표 5, 6, 7에 각각 나타낸다.

표 5

시클로펜테논 농도 (μM)	HGF 생산 증가 (%)
0	100
20	144
40	218
160	238

표 6

GM 농도 (μM)	HGF 생산 증가 (%)
0	100
20	154
40	179
80	243
160	319

표 7

디프로피오닐시클로펜테논 농도 (μM)	HGF 생산 증가 (%)
0	100
32	120
64	144

실시예 3

(1) 5% CO_2의 존재에 37℃에서 배양 베쓸에서 인간 신생아의 포피(foreskin) 표피 세포 Hs68 세포(ATCC CRL-1635)를 10% 우태혈청(FBS; Gibco BRL)을 함유하는 D-MEM 배지(Bio Whittaker)중에서 포화될 때까지 배양하였다. 이어서, 트립신-EDTA 용액(Bio Whittaker)을 사용하여 세포를 3 x 10^5/㎖의 농도로 배지중에 현탁시켰다. 200㎕의 현탁액을 96-웰 마이크로틸터 플레이트의 각 웰에 분배하였다. 5일동안 배양한 후 세포가 배양 베쓸에 거의 포화되었을 때, 배지를 버리고 4HCP를 40, 100 또는 200㎛M의 농도로 포함하는 배지를 그것에 가하였다. 배양 상등액을 96시간 이하동안 24시간 간격으로 회수하였다. Hs68 세포중의 인간 인슐린성 성장 인자-1(h-IGF-1)의 증강에 대한 4HCP의 효과를 h-IGF-1용 ELISA-Kit(Diagnostic System Labo)를 사용하여 측정하였다. 결과를 표 8에 나타낸다.

표 8

4HCP 농도 (μM)	배양 시간 (시간)			
	24	48	72	96
	h-IGF-1 생산 증강 활성 (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

표 8에 나타난 바와 같이, 4HCP를 100㎛M 이상의 농도로 가하였을 때, Hs68 세포에서 h-IGF 생산 증강 활성은 24시간째 최대였고 그 이후로 시간이 경과함에 따라서 감소하였다.

(2) 5% CO_2의 존재에 37℃에서 배양 베쓸에서 Hs68 세포를 10% 우태혈청을 함유하는 D-MEM 배지중에서 포화될 때까지 배양하였다. 이어서, 트립신-EDTA 용액을 사용하여 세포를 3 x 10^5/㎖의 농도로 배지중에 현탁시켰다. 200㎕의 현탁액을 96-웰 마이크로틸터 플레이트의 각 웰에 분배하였다. 5 내지 7일동안 배양한 후 세포가 배양 베쓸에 거의 포화되었을 때, 배지를 버리고 시클로펜테논 또는 GM을 0, 2.5, 5, 10 또는 20㎛M의 농도로 포함하는 배지를 그것에 가하였다.

배양 상등액을 1, 3, 6, 12, 24 또는 48시간째 회수하였다. Hs68에서 h-IGF-1의 생산(발현 증강)에 대한 시클로펜테논 또는 GM의 효과를 h-IGF-1용 ELISA-Kit(Diagnostic System Labo)를 사용하여 측정하였다.

결과, GM을 10 내지 20㎛M으로 가하였을 때, 첨가 3시간 후, Hs68세포에서 h-IGF가 생산된 것이 관찰되었다. 첨가 6시간 후 생산된 h-IGF-1의 양은 첨가되지 않은 대조군의 양의 약 2배였다.

또한, 시클로펜테논을 10 내지 20㎛M의 농도로 가하였을 때, 첨가 1시간 내지 6시간 후 h-IGF-1이 생산된 것이 관찰되었다.

(3) 5% CO_2의 존재에 37℃에서 배양 베쓸에서 Hs68 세포를 10% 우태혈청을 함유하는 D-MEM 배지중에서 포화될 때까지 배양하였다. 이어서, 트립신-EDTA 용액을 사용하여 세포를 3 x 10^5/㎖의 농도로 배지중에 현탁시켰다. 200㎕의 현탁액을 96-웰 마이크로틸터 플레이트의 각 웰에 분배하였다. 5 내지 7일동안 배양한 후 세포가 배양 베쓸에 거의 포화되었을 때, 배지를 버리고 4HCP, 식(XVIII)의 화합물(4HCP-GSH) 또는 글루타티온(GSH)를 0, 25, 50, 100 또는 200㎛M의 농도로 포함하는 배지를 그것에 가하였다. 배양 상등액을 1, 3, 6, 12, 24 또는 48시간째 회수하였다. Hs68 세포에서 h-IGF-1의 생산(발현 증강)에 대한 효과를 h-IGF-1용 ELISA-Kit(Diagnostic System Labo)를 사용하여 측정하였다.

결과, 4HCP를 25 내지 200㎛M의 농도로 가하였을 때, 1시간째 Hs68 세포에서 h-IGF가 최대로 생산되었고 그 이후로 시간이 경과함에 따라서 감소하였다. 48시간째 100㎛M 이상의 농도로 4HCP로 처리된 세포에 대하여 h-IGF-1가 발현되는 것이 관찰되었다. 농도 100 내지 200㎛M 범위의 식(XVIII)의 화합물은 농도에 의존하는 방법으로 h-IGF-1을 증강시키는 활성을 보였다. 결과를 표 9 및 10에 나타낸다. 10 내지 30분동안 배양한 경우, h-IGF-1 생산이 현

저하에 증강된 것이 관찰되었다. 한편, 글루타티온만이 첨가된 배지에 대하여 h-IGF-1 증강 활성은 관찰되지 않았다.

표 9: 4HCP에 의한 h-IGF-1 생산 증강 활성

첨가된 4HCP 의 양 (μM)	배양 시간 (시간) 1	3	6	12	24	48
	IGF-1 생산 증강 활성 (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

표 10: 4HCP-GSH(ng/㎖)에 의한 h-IGF-1 생산 증강 활성

첨가된 4HCP-GSH 의 양 (μM)	배양 시간 (시간) 1	3	6	12	24	48
	IGF-1 생산 증강 활성 (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

실시예 4

5주령된 수컷 윈스타(Winstar) 래트의 좌골 신경을 압좌시켜 뒷다리 근육에 위축증 모델을 제조하였다. 압좌 2주후 제거된 뒷다리의 비복근(gastrocnemius)의 중량을 측정하고, 정상의 다리 것에 대하여 압좌시킨 다리 근육의 중량비로 나타내었다.

희석된 HCl를 가하여 pH가 5로 조정된 10%(w/v) DNA · Na(Nichiro) 수용액을 3시간동안 오토클레이트브를 사용하여 120℃에서 가열하여 DNA의 열처리물을 제조하였다.

물중의 DNA의 열처리물의 10배 희석액(약 11mg/kg/일의 4HCP) 및 100배 희석액(약 11mg/kg/일의 4HCP)을 제조하고, 압좌시키기 3일전(N=9-10)으로부터 출발하여 식수로서 래트에게 공급하였다.

결과를 표 11에 나타낸다. 표 11의 수는 평균±표준편차를 나타낸다. 표중의 *의 표시는 대조군과 비교하여 5% 이하의 상당 수준이 현저하게 다름을 의미한다.

대조군에서, 현저한 근위축증은 압좌에 의해 유발되었고, 압좌 2주후까지 거의 회복되지 않았다. 한편, DNA의 열처리물을 식수로서 공급받은 그룹은 복용량에 의존하는 방법으로 근육 중량의 회복이 촉진되었다. 근육 증강/강화의 현저한 효과에 의해 DNA의 열처리물의 10배 희석액을 식수로서 공급받은 그룹에 대하여 대조군에 대하여 관찰된 근위축증 상태가 호전되었다.

표 11

	근육 중량 (%) 평균 ± 표준 편차
대조군 (N=10)	49.0 ± 2.58
DNA의 열처리물의 100배 희석액 (N=9)	49.8 ± 1.16
DNA의 열처리물의 10배 희석액 (N=10)	58.2 ± 2.64*

*;p<0.05 vs. 대조군

실시예 5

(1) 주사제

시클로펜테논 또는 GM을 1% 농도로 염수에 가하여 주사제를 제조하였다.

(2) 정제

각각 100mg의 디프로피오닐시클로펜테논 또는 4HCP 및 적절한 양의 결정질 셀룰로오스를 함유하는 정제를 제조하고, 당으로 피복시켰다.

참조 실시예 6

일본 SLC사로부터 구입한 ddY 마우스(암컷, 5주령, 중량 약 25g)를 일주일간 예비 사육시킨 후 시험에 사용하였다. 1 x 10^6 Ehrlich 종양 세포를 마우스에 복강내로 접종시켰다. 10mg/kg 시클로펜테논을 접종 1일 후 복강내로 투여하였다. 종양 세포로 접종시킨지 8 또는 12일 후 목을 베거나 사혈시켜 마우스를 희생시켰다. 대조군 마우스에 유지된 복수(ascites)의 것과 동일한 부피인 2㎖의, 1% 우아혈청 알부민(Sigma)를 함유하는 PBS(-)(Nissui Pharmaceutical)를 상기 마우스내로 복강내 주사하고, 체외 마사지후 회수하였다. 대조군에 대하여, 복수를 직접 회수하였다. 회수한 복수 및 복수세정액을 5분동안 2000rpm으로 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 상등액을 사용하여 측정용 ELISA 키트(Endogen)로 마우스 인터루킨-12의 양을 측량하였다.

종양 세포로 접종 8일 및 12일 후 각 마우스에 대하여 복강내 인터루킨-12의 양을 표 12에 나타낸다. 종양 세포로 접종 8일 후 대조군의 3마리 모두에 대하여 상기의 양은 검출 한도 미만이었다. 한편, 시클로펜테논에 의한 인터루킨-12 생산 증강은 시클로펜테논이 투여된 그룹의 각 마우스에 대하여 관찰되었고, 이것은 국소 부위에서 T 세포 및 NK/LAK 세포가 작용한다는 것을 암시한다. 또한, 종양 세포로 접종 12일 후 시클로펜테논이 투여된 그룹에 대하여 인터루킨이 복강내에서도 관찰되었고, 이것은 면역 자극에 의한 항암 효과를 보인다는 것을 암시한다. 또한, 시클로펜테논 유도체는 인터루킨-12 생산 증강 작용을 보인다.

표 12

	복강내 인터루킨-12의 양 (pg/ml)					
	대조군			시클로펜테논으로 투여된 그룹		
8일 후	ND	ND	ND	11.0	100.0	25.0
12일 후	모두 죽음			43.0	97.2	66.4

ND: 미검출

산업상 이용가능성

본 발명은 그의 치료 또는 예방을 위해 성장 인자 생산 증강을 요하는 질환 및/또는 그의 치료 또는 예방을 위해 인터루킨-12 생산 증강을 요하는 질환에 유효한, 활성 성분으로서 성장 인자 생산 및/또는 인터루킨-12 생산 증강 작용을 보이는 화합물을 함유하는 약제 조성물을 제공한다. 약제 조성물은 생체내에서 HGF 생산, NGF 생산, h-IGF-1 생산, 인터루킨-12 생산 등의 증강 작용을 갖는다. 따라서, 약제 조성물은 간염, 알츠하이머 질환, 당뇨 및 암을 포함하는, 그들의 치료 또는 예방을 위해 성장 인자 생산 증강을 요하는 질환 및/또는 그의 치료 또는 예방을 위해 인터루킨-12 생산 증강을 요하는 질환의 치료 또는 예방용 약제 조성물로서 유용하다.

또한, 현재 시클로펜테논을 함유하는 물질, 시클로펜테논 유도체를 함유하는 물질, 4HCP를 함유하는 물질, 4HCP 유도체를 함유하는 물질로 구성된 그룹으로부터 선택되는, 성장 인자 생산 및/또는 인터루킨-12 생산 증강 능력을 갖는 물질을 사용하여 식품 또는 음료를 제조할 수 있다. 따라서, 상기 식품 또는 음료를 일상적으로 섭취하는 경우, 그들의 치료 또는 예방을 위해 성장 인자 생산 증강을 요하는 질환 및/또는 그의 치료 또는 예방을 위해 인터루킨-12 생산 증강을 요하는 질환의 질환 상태는 호전될 수 있다.

따라서, 시클로펜테논을 함유하는 물질, 시클로펜테논 유도체를 함유하는 물질, 4HCP를 함유하는 물질, 4HCP 유도체를 함유하는 물질로 구성된 그룹으로부터 선택되는 물질을 활성 성분으로서 함유하는 기능성 식품 또는 음료는 그의 성장 인자 생산 및/또는 인터루킨-12 생산 증강 작용에 기초하여 생체의 항상성을 유지시키는데 유용하다.

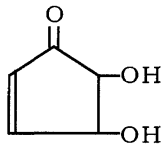
본 발명은 또한 성장 인자 생산 및/또는 인터루킨-12 생산 증진용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 성장 인자의 기능 연구, 성장 인자와 관련된 의약 조사에 유용하다.

또한, 본 발명은 근육 증강/강화용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 신경압박(neurothlipsis)에 기인한 질환의 치료에 유용하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

식(I)의 4,5-디하이드록시-2-시클로펜텐-1-온, 4-하이드록시-2-시클로펜텐-1-온 및 그의 유도체들로 구성된 그룹으로부터 선택되는 화합물을 활성 성분으로서 함유하는, 그의 치료 또는/예방을 위해 성장 인자 생산의 증강을 요하는 질환 및/또는 그의 치료 또는 예방을 위해 인터루킨-12 생산의 증강을 요하는 질환의 치료 또는 예방용 약제 조성물:



(I)

청구항 2.

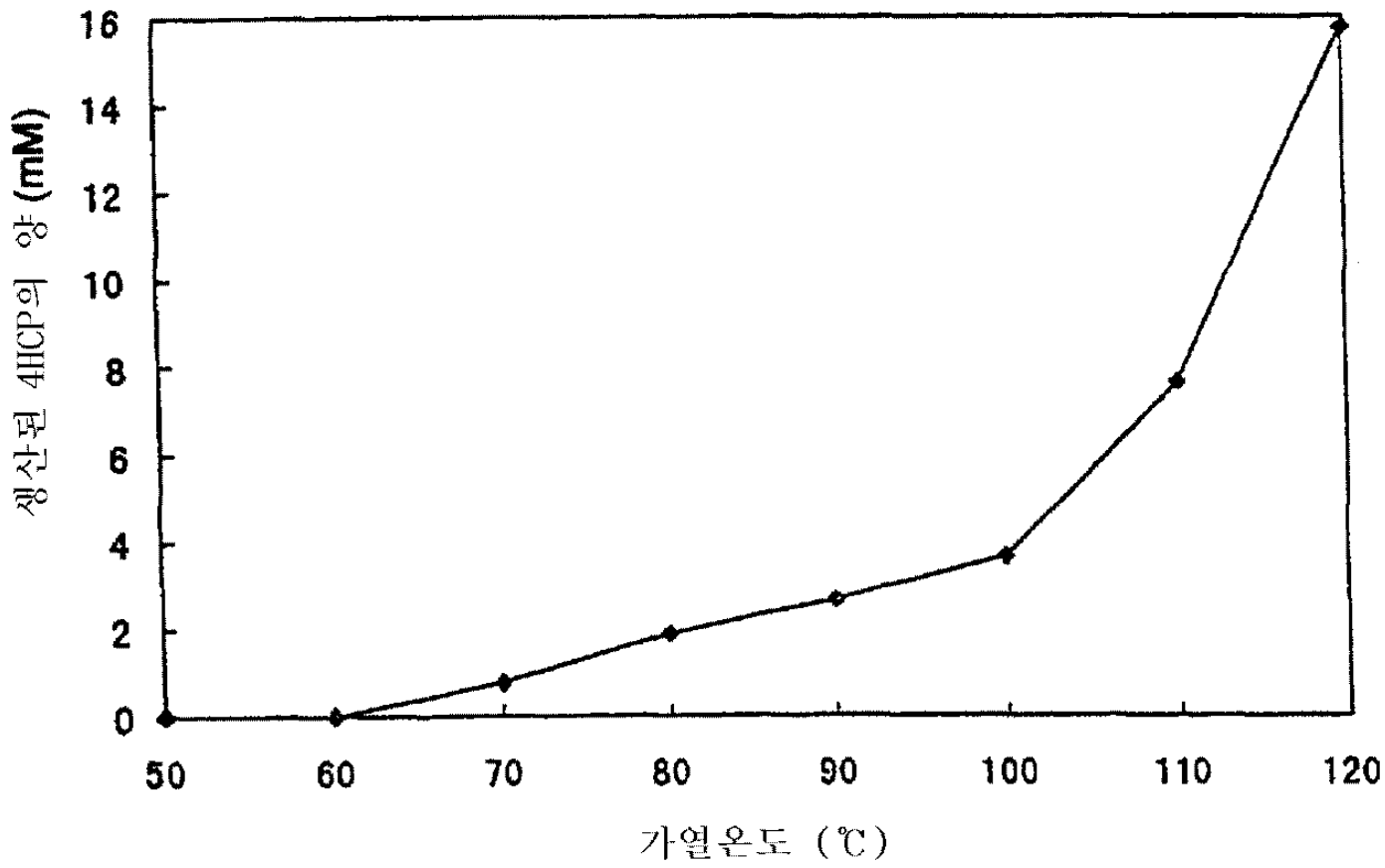
식(I)의 4,5-디하이드록시-2-시클로펜텐-1-온, 4-하이드록시-2-시클로펜텐-1-온 및 그의 유도체들로 구성된 그룹으로부터 선택되는 화합물을 활성 성분으로서 함유하는, 성장 인자 생산 및/또는 인터루킨-12 생산 증강용 조성물.

청구항 3.

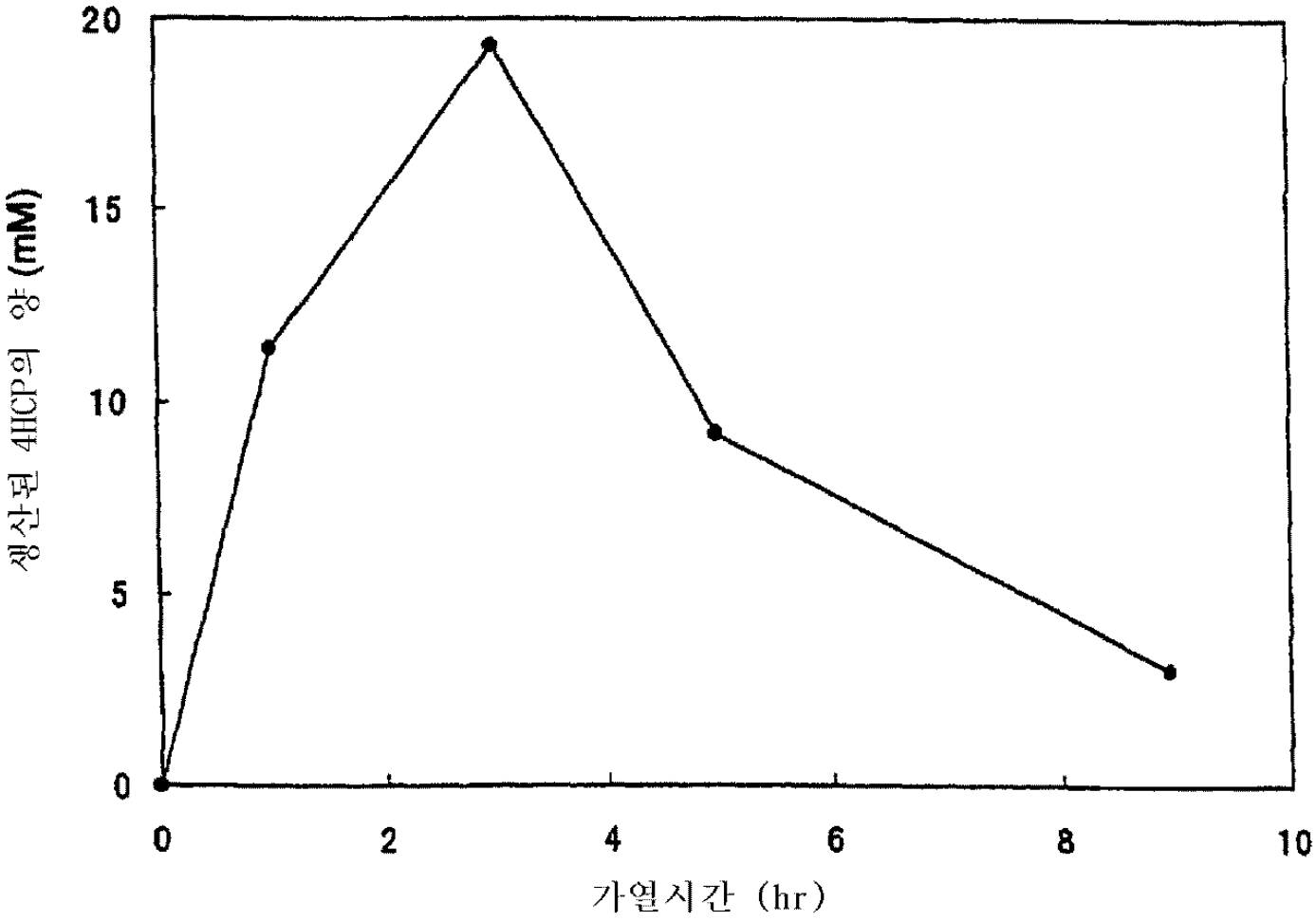
식(I)의 4,5-디하이드록시-2-시클로펜텐-1-온을 포함하는 물질, 4-하이드록시-2-시클로펜텐-1-온을 포함하는 물질, 4,5-디하이드록시-2-시클로펜텐-1-온 유도체를 포함하는 물질 및 4-하이드록시-2-시클로펜텐-1-온 유도체를 포함하는 물질로 구성된 그룹으로부터 선택되는 물질을 포함하고, 그 물질을 희석시켜 제조되고/거나 그 물질을 가하여 제조되는 성장 인자 생산 및/또는 인터루킨-12 생산 증강용 식품 또는 음료.

도면

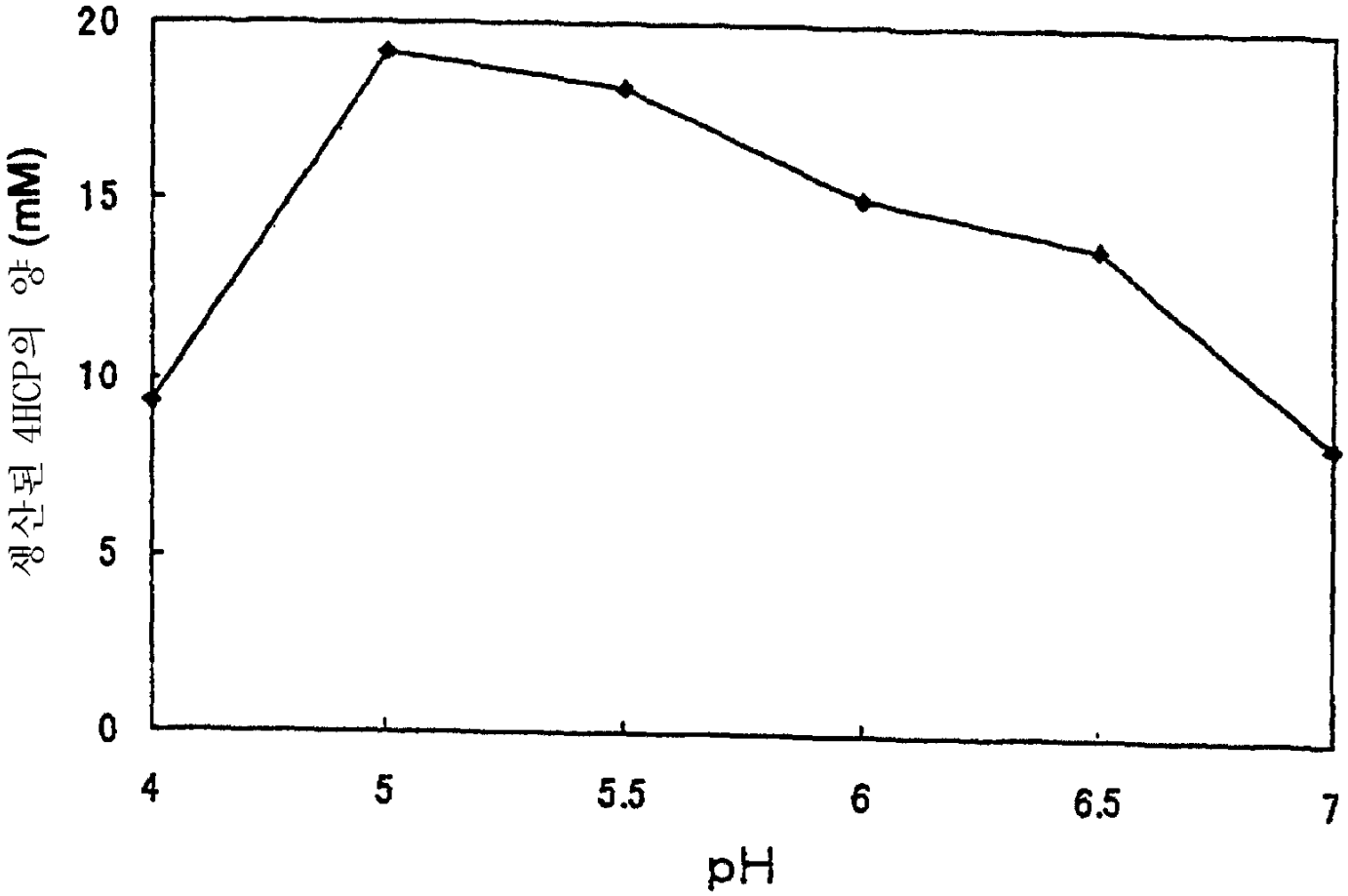
도면 1



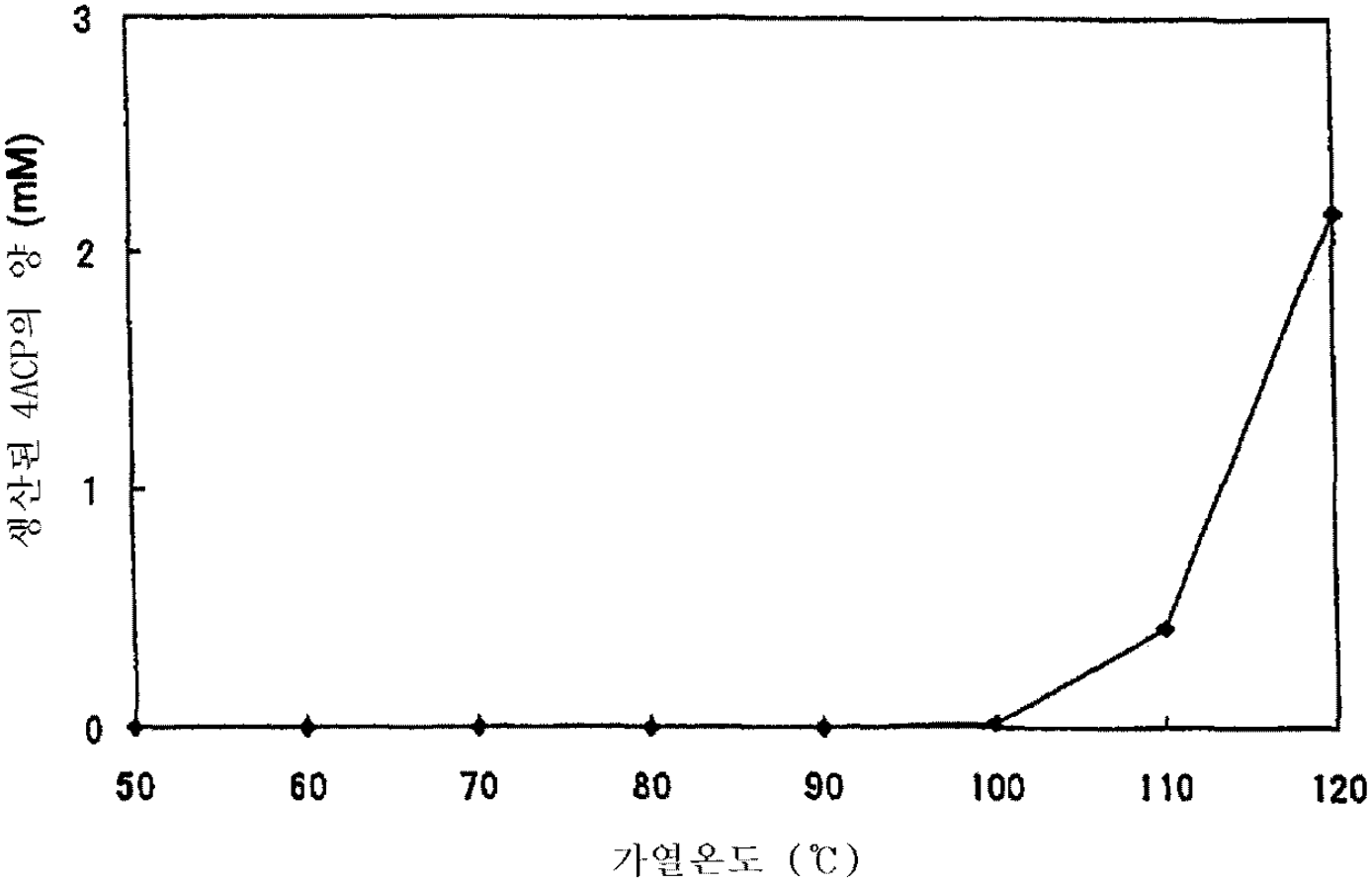
도면 2



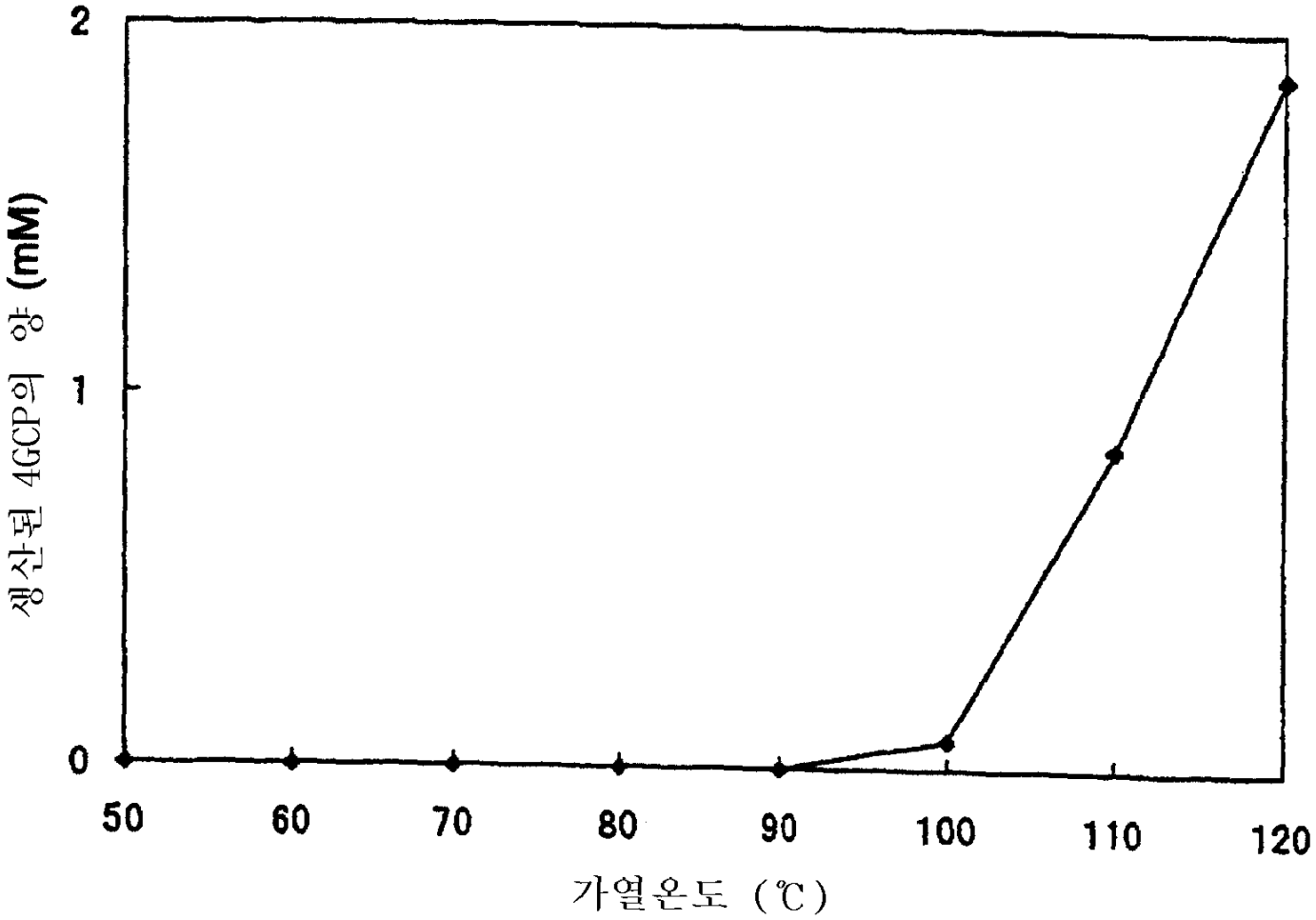
도면 3



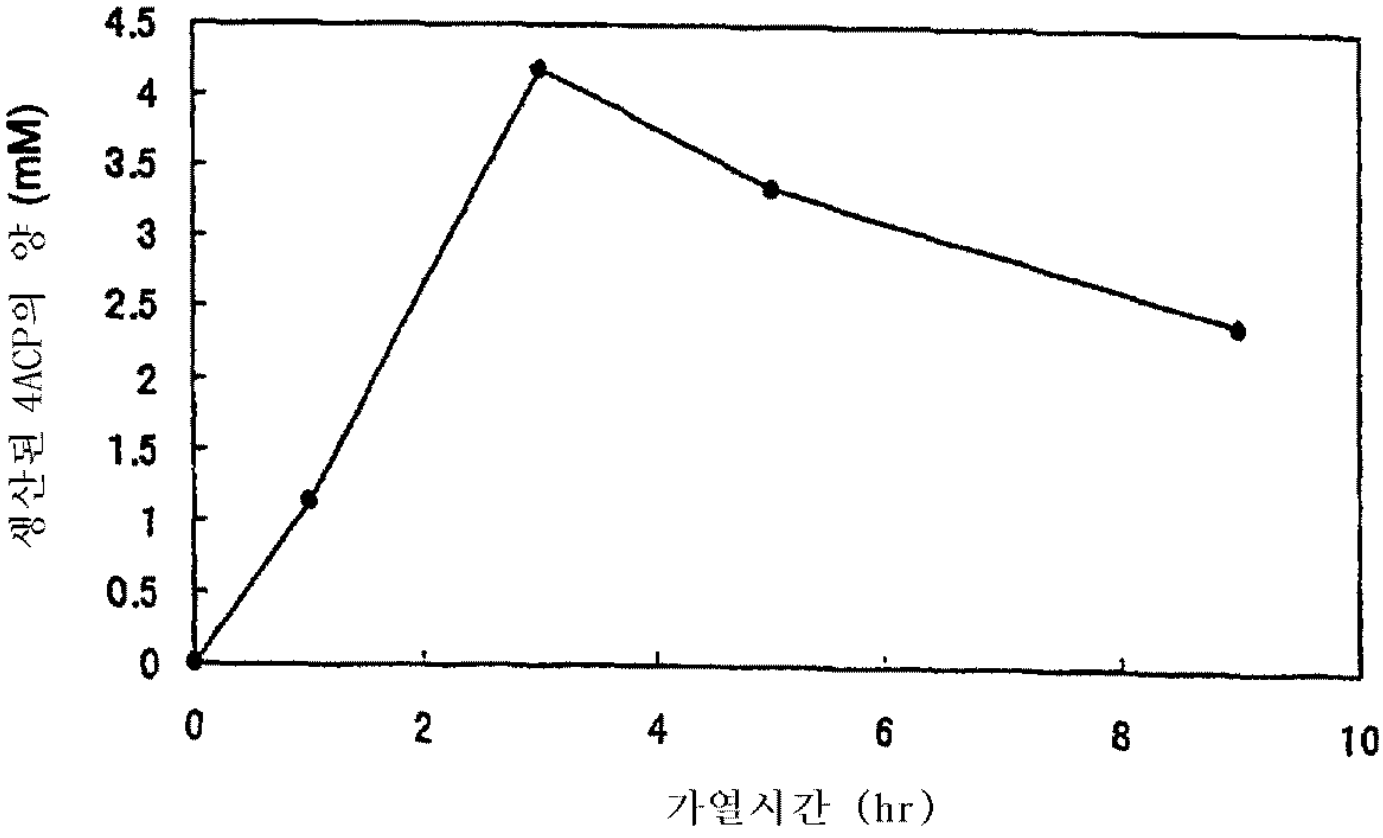
도면 4



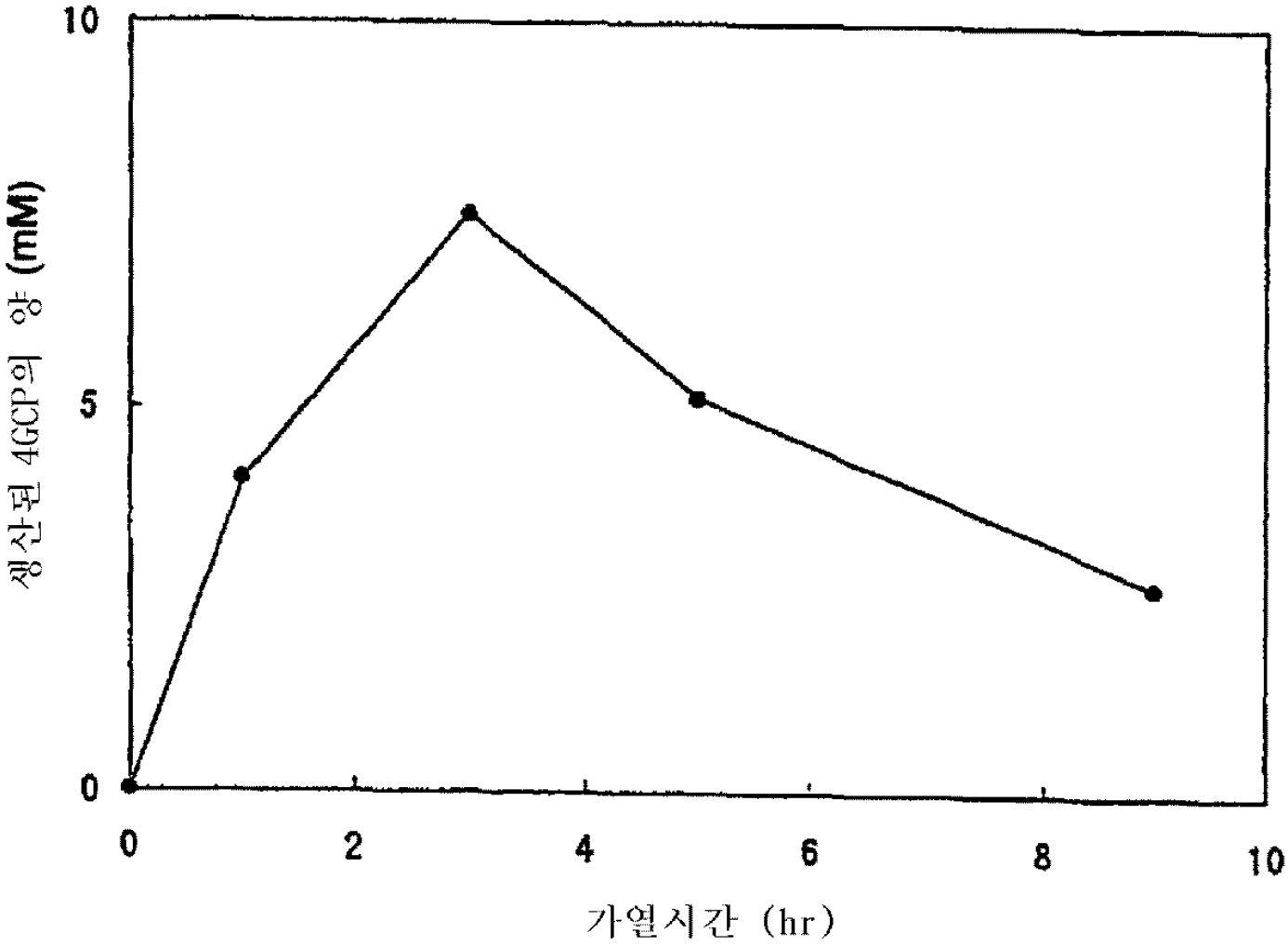
도면 5



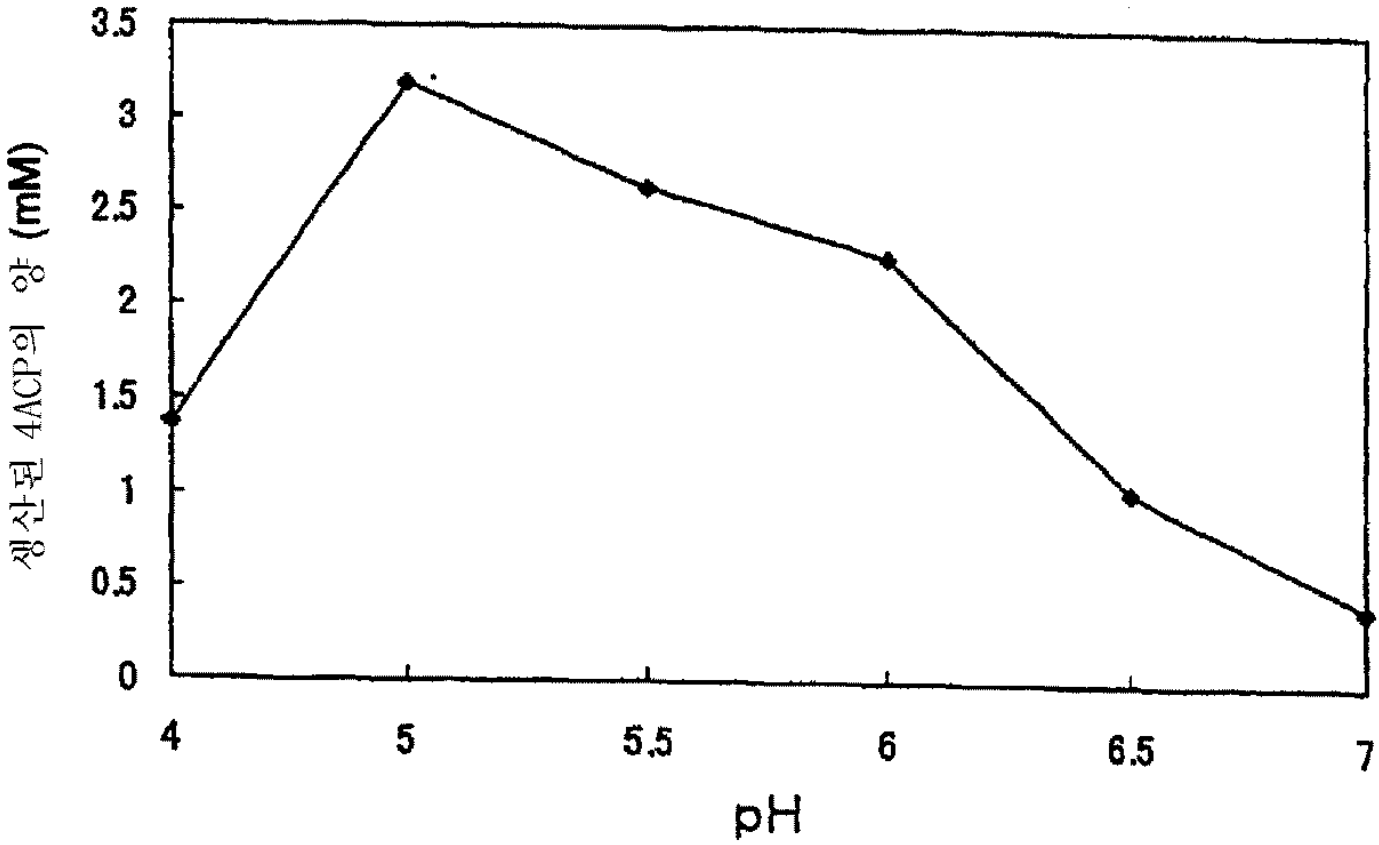
도면 6



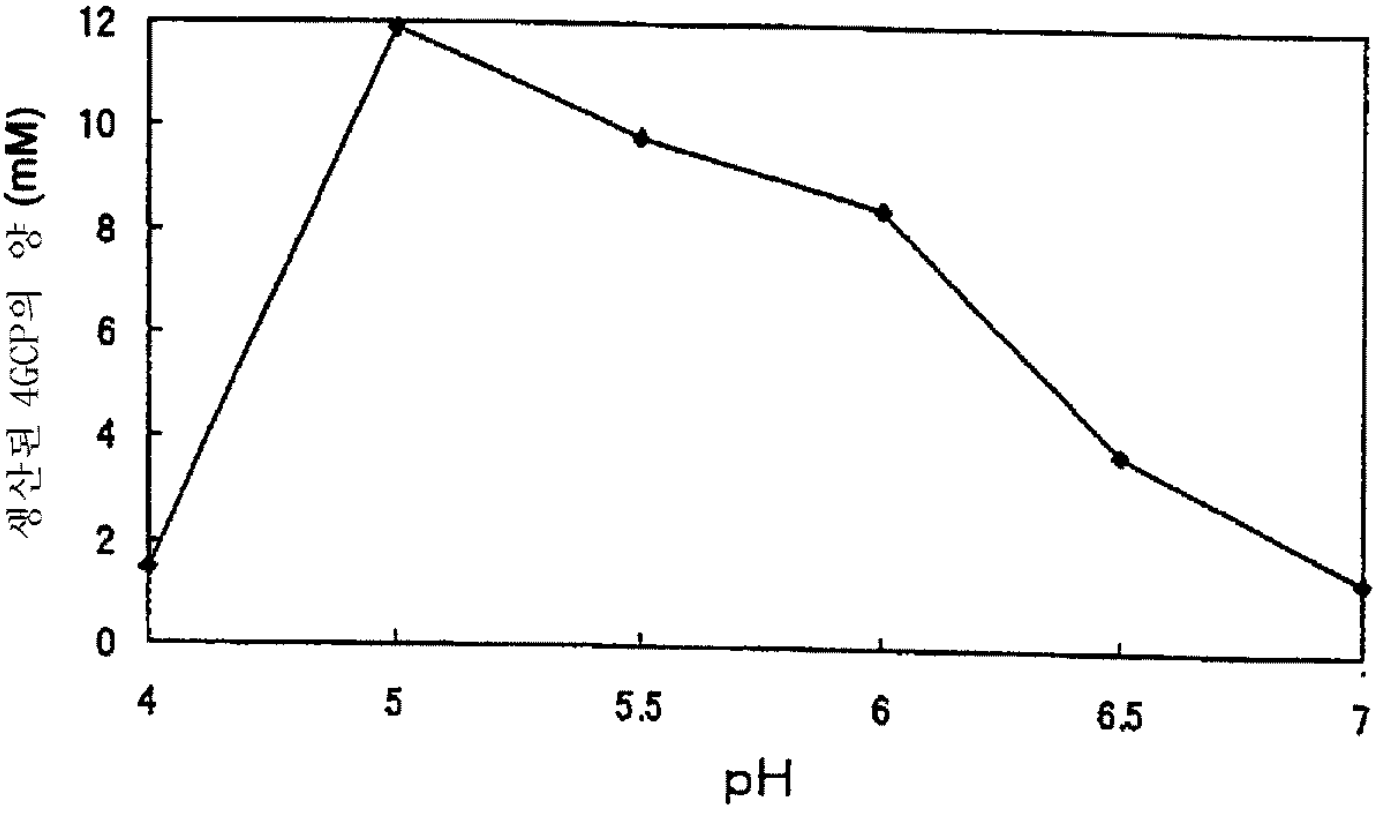
도면 7



도면 8


생산된 4ACP의 양 (mM)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
4
5
5.5
6
6.5
7
pH

도면 9


생산된 4GCP의 양 (mM)
12
10
8
6
4
2
0
4
5
5.5
6
6.5
7
pH

도면 10