[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98802724.0

[51] Int. Cl.
C07C 323/50 (2006.01)
C07C 323/17 (2006.01)
C07C 323/22 (2006.01)
A61K 31/10 (2006.01)
A61K 31/12 (2006.01)
A61K 31/195 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 6 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 100391940C

[22] 申请日 1998.2.26 [21] 申请号 98802724.0

[30] 优先权

[32] 1997. 3. 5 [33] JP [31] 65616/97
[32] 1997. 4.30 [33] JP [31] 124696/97
[32] 1997. 6.16 [33] JP [31] 172782/97
[32] 1997. 6.16 [33] JP [31] 172786/97
[32] 1997. 8. 8 [33] JP [31] 225533/97
[32] 1997. 8.25 [33] JP [31] 241680/97
[32] 1997.10. 1 [33] JP [31] 283204/97
[32] 1997.12.12 [33] JP [31] 362273/97
[32] 1997.12.16 [33] JP [31] 363281/97

[86] 国际申请 PCT/JP1998/000815 1998.2.26

[87] 国际公布 WO1998/039291 日 1998.9.11

[85] 进入国家阶段日期 1999.8.20

[73] 专利权人 宝生物工程株式会社

地址 日本滋贺县

[72] 发明人 小山信人 榎龙嗣 猪饲胜重
务华康 大野木宏 富永隆生
西山英治 萩屋道雄 佐川裕章
蝶野英人 加藤郁之进

[56] 参考文献

US4180672A 1979.12.25

审查员 王 荧

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 陈 昕

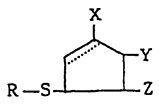
权利要求书 4 页 说明书 63 页 附图 48 页

[54] 发明名称

化合物

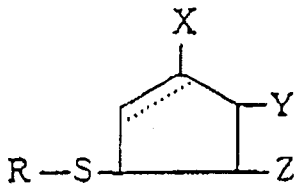
[57] 摘要

式 [I] 表示的化合物或光学活性物质或其盐，[I] 式中，五员环内虚线所示的键表示所说的五员环可以是具有双键的环戊烯，或者是其中所说的键是饱和的环戊烷，在环戊烯环的情况下，X 是 OH，Y 是 =O，而 Z 是 H，在环戊烷环的情况下，X 是 =O，Y 是 OH，而 Z 是 OH；R 是从含 SH 的化合物中除去 SH 之后的残基。



[I]

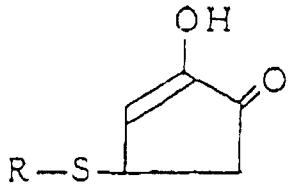
1. 下式[I]表示的化合物或光学活性物质或其盐



[I]

式中，五员环内虚线所示的键表示所说的五员环可以是具有双键的环戊烯，或者是其中所说的键是饱和的环戊烷，在环戊烯环的情况下，X是OH，Y是=O，而Z是H，在环戊烷环的情况下，X是=O，Y是OH，而Z是OH；R是从半胱氨酸或谷胱甘肽中除去SH之后的残基。

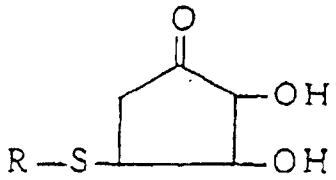
2. 下式[II]表示的化合物或光学活性物质或其盐



[II]

式中，R是从半胱氨酸或谷胱甘肽中除去SH之后的残基。

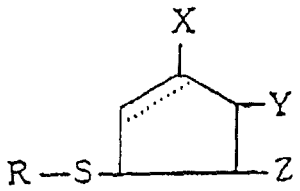
3. 下式[III]表示的化合物或光学活性物质或其盐



[III]

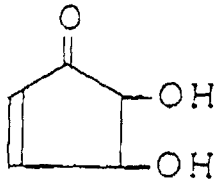
式中，R是从半胱氨酸或谷胱甘肽中除去SH之后的残基。

4. 生产式[I]表示的化合物或光学活性物质或其盐的方法，其特征在于，选自式[IV]表示的4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮的化合物或光学活性物质或其盐的化合物在酸性或中性条件下与半胱氨酸或谷胱甘肽反应



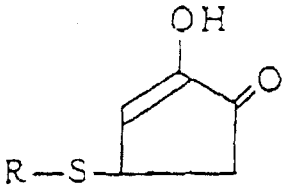
[I]

式中,五员环内虚线所示的键表示所说的五员环可以是具有双键的环戊烯,或者是其中所说的键是饱和的环戊烷,在环戊烯环的情况下,X是OH,Y是=O,而Z是H,在环戊烷环的情况下, X是=O,Y是OH,而Z是OH;R是从半胱氨酸或谷胱甘肽中除去SH之后的残基。



[IV]

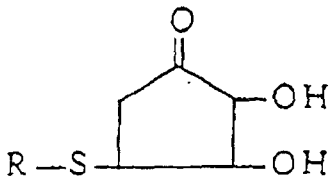
5. 根据权利要求4生产化合物或光学活性物质或其盐的方法,其中式[I]表示的化合物是式[II]表示的化合物,是使选自式[IV]表示的4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮、或光学活性物或其盐,在酸性条件下与半胱氨酸或谷胱甘肽反应而得到的,



[II]

式中,R是从半胱氨酸或谷胱甘肽中除去SH之后的残基。

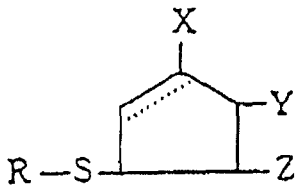
6. 根据权利要求4生产化合物或光学活性物质或其盐的方法,其中式[I]表示的化合物是式[III]表示的化合物,是使选自式[IV]表示的4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮、或光学活性物或其盐,在中性条件下与半胱氨酸或谷胱甘肽反应而得到的,



[III]

式中，R 是从半胱氨酸或谷胱甘肽中除去 SH 之后的残基。

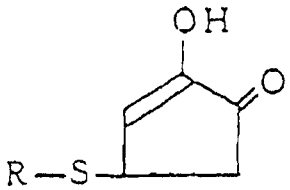
7. 一种药剂，其特征在于含有至少一种选自式[I]表示的化合物或光学活性物质或其盐的化合物作为有效成分，



[I]

式中，五员环内虚线所示的键表示所说的五员环可以是具有双键的环戊烯，或者是其中所说的键是饱和的环戊烷，在环戊烯环的情况下，X 是 OH，Y 是=O，而 Z 是 H，在环戊烷环的情况下， X 是=O，Y 是 OH，而 Z 是 OH；R 是从半胱氨酸或谷胱甘肽中除去 SH 之后的残基。

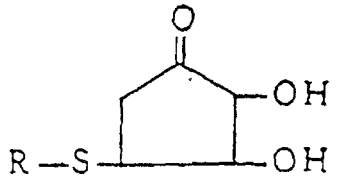
8. 根据权利要求 7 的药剂，其中所说的药剂含有至少一种选自式[II]表示的化合物或光学活性物质或其盐的化合物作为有效成分，



[II]

式中，R 是从半胱氨酸或谷胱甘肽中除去 SH 之后的残基。

9. 根据权利要求 7 的药剂，其中所说的药剂含有至少一种选自式[III]表示的化合物或光学活性物质或其盐的化合物作为有效成分，



[III]

式中，R 是从半胱氨酸或谷胱甘肽中除去 SH 之后的残基。

10. 根据权利要求 7－9 任意一项的药剂，其中的药剂选自如下组成的一组：生物防御剂，糖尿病治疗剂，糖尿病预防剂，抗癌剂，细胞凋亡诱导剂，抗致病性微生物剂，高血脂治疗剂，高血脂预防剂，肝功能增强剂，热激蛋白诱导剂。

11. 根据权利要求 10 的药剂，其中生物防御剂选自如下组成的一组：抗过敏剂，抗风湿剂，抗炎症剂，炎症预防剂，干扰素诱导剂，肿瘤坏死因子产生预防剂，白细胞介素－10 产生增强剂，一氧化氮产生抑制剂，Fas 抗原产生诱导剂，免疫调节剂，IgE 产生抑制剂，自身免疫性疾病治疗剂，迟发型过敏反应抑制剂。

12. 根据权利要求 10 的药剂，其中抗致病性微生物剂是抗菌剂或抗病毒剂。

13. 根据权利要求 12 的药剂，其中病毒是人获得性免疫缺损病毒或丙型肝炎病毒。

14. 根据权利要求 12 的药剂，其中抗病毒剂是用于人体，动物或植物的抗病毒剂。

化合物

技术领域

本发明涉及可用于药物领域的具有诸如抗癌作用的生理活性的化合物，并涉及生产这些化合物的方法。

现有技术

已经用于临床治疗的药物包括许多药剂，如抗癌剂，抗生素，免疫强化剂，免疫调制剂，等等（如烷基化剂，抗代谢物和植物生物碱），但很难说这类药物治疗已经完全被建立。

在这些药剂中，在从天然物质衍生的前列腺素的五员环中具有α，β-不饱和羰基的前列腺素 A 和 J 已经被报道具有被用作高度安全抗癌剂的能力，因为它们抑制 DNA 合成，它们的各种衍生物已经被合成（参见日本公开特许昭-62/96438）。

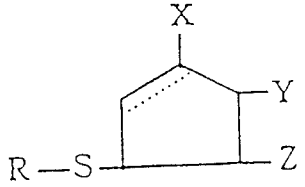
本发明所要解决的问题

本发明的一个目标是开发具有诸如抗癌作用等生理作用的化合物，并提供生产所述化合物的方法和含有所述化合物的药物。

解决问题的手段

为了实现上述目标，本发明人进行了深入研究，并已发现，式[I]表示的化合物（以后称为“本发明化合物”）通过式(IV)表示的 4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮（以后简称为“环戊烯酮”）与含有 SH 基团的化合物反应而生产，所述本发明化合物具有很强的各种生理活性，并被用于治疗和/或预防对所述化合物敏感的疾病，从而完成了本发明。

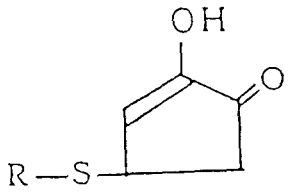
本发明将概述如下。本发明第一方面涉及下式[I]表示的化合物或光学活性物质或其盐。



【I】

(式中,五员环内虚线所示的键表示所说的五员环可以是具有双键的环戊烯,或者是其中所说的键是饱和的环戊烷,在环戊烯环的情况下,X是OH,Y是=O,而Z是H,在环戊烷环的情况下,X是=O,Y是OH,而Z是OH。R是从含SH的化合物中除去SH之后的残基。)

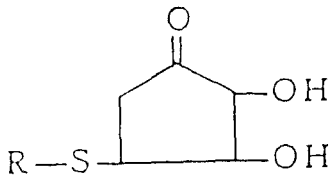
本发明第一方面的一个方案是下式[II]表示的化合物或光学活性物质或其盐。



【II】

(式中,R是从含SH的化合物中除去SH之后的残基。)

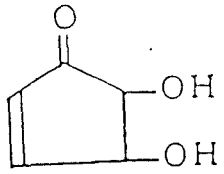
本发明第一方面的另一个方案是下式[III]表示的化合物或光学活性物质或其盐。



【III】

(式中,R是从含SH的化合物中除去SH之后的残基。)

本发明的第二方面是生产本发明第一方面中式[I]表示的化合物或光学活性物质或其盐的方法,其特征在于,选自式[IV]表示的4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮的化合物或光学活性物质或其盐与含有SH基团的化合物反应。



【IV】

在本发明第一和第二方面的优选方案中,含有SH基团的化合物是含有SH的氨基酸或其衍生物。

本发明的第三方面是药剂,其特征在于含有至少一种选自本发明第一方面的式[I]表示的化合物或光学活性物质或其盐作为有效成分。

在本发明第三方面的优选方案中,所说的药剂是生物防御剂(如免

疫调制剂，抗过敏剂或抗风湿剂），糖尿病药，抗癌剂，细胞凋亡诱导物或抗致病性微生物药剂(如抗病毒剂或抗菌剂)。

附图简要说明

附图 1 给出了 CM1 的质谱。

附图 2 给出了 CM1 的 ^{1}H-NMR 谱。

附图 3 给出了 CM1 的 UV 吸收光谱。

附图 4 给出了 CM2 的 ^{1}H-NMR 谱。

附图 5 给出了 CM1 的 ^{13}C-NMR 谱。

附图 6 给出了 CM 的 IR 吸收光谱。

附图 7 给出了停留时间和吸光度之间的关系。

附图 8 给出了 GM 的 ^{1}H-NMR 谱。

附图 9 给出了 CM 的 ^{13}C-NMR 谱。

附图 10 给出了 GM 的质谱。

附图 11 给出了 GM 的 UV 吸收光谱。

附图 12 给出了 GM 的 IR 吸收光谱。

附图 13 给出了环戊烷酮硫代衍生物例子的洗脱图案。

附图 14 给出了当使用 L-半胱氨酸时，反应时间和在 215nm 的吸光度之间的关系。

附图 15 给出了当使用谷胱甘肽时，反应时间和在 215nm 的吸光度之间的关系。

附图 16 给出了在本发明实施例中反应产物的色谱图。

附图 17 给出了在附图 4 中 2.99 分钟的峰的质谱。

附图 18 给出了溶解后立即测定的反应溶液的 UV 吸收光谱。

附图 19 给出了反应 50 分钟后，反应溶液的 UV 吸收光谱。

附图 20 给出了当使用谷胱甘肽时，溶解后立即测定的反应溶液的 UV 吸收光谱。

附图 21 给出了当使用谷胱甘肽时，反应 50 分钟后，反应溶液的 UV 吸收光谱。

附图 22 给出了反应产物的 ^{13}C-NMR 谱。

附图 23 给出了停留时间和吸光度之间的关系。

附图 24 给出了 GD 的 ^{1}H-NMR 谱。

附图 25 给出了 CD 的 ^{13}C-NMR 谱。

附图 26 给出了 GD 的质谱。

附图 27 给出了 GD 的 IR 吸收光谱。

附图 28 给出了 CM 对癌细胞生长的抑制活性。

附图 29 给出了 CM 对癌细胞生长的抑制活性。

附图 30 给出了 GM 的量与产生的肿瘤坏死因子的量之间的关系。

附图 31 给出了 GM 的量与足水肿增加率之间的关系。

附图 32 给出了 NO_2^- 浓度和在培养基中 GM 浓度之间的关系。

附图 33 给出了温育时间与存活细胞数之间的关系。

附图 34 给出了 GM 对 Jurkat 细胞生长的影响。

附图 35 给出了 GM 对 Molt-3 细胞生长的影响。

附图 36 给出了 Fas 抗原在 Molt-3 细胞中的表达。

附图 37 给出了 Fas 抗原在 Jurkat 细胞中的表达。

附图 38 给出了表达 Fas 抗原的细胞的变化率。

附图 39 给出了 GM 剂量与血糖浓度之间的关系。

附图 40 给出了 GM 剂量与血清中胰岛素浓度之间的关系。

附图 41 给出了 GM 剂量与血清中总胆固醇浓度之间的关系。

附图 42 给出了 GM 剂量与血清中三甘油酯浓度之间的关系。

附图 43 给出了 GM 剂量与血清中游离脂肪酸浓度之间的关系。

附图 44 给出了 GM 浓度与细胞存活率之间的关系。

附图 45 给出了 GM 浓度与产生的 p24 的量之间的关系。

附图 46 给出了 GM 对迟发型过敏反应的抑制活性。

附图 47 给出了(-)-环戊烯酮的 p-二甲基氨基苯甲酰基衍生物的 CD 和(-)-环戊烯酮立体结构。

附图 48 给出了(+)-环戊烯酮的 p-二甲基氨基苯甲酰基衍生物的 CD 和(+)-环戊烯酮立体结构。

本发明的方案

本发明现在将在下面具体说明。

用于本发明中的式[IV]表示的环戊烯酮包括其中4-和5-位的羟基构型是顺式和反式的两种异构体。在本发明中，顺式-环戊烯酮，反式-环戊烯酮以及顺式-环戊烯酮和反式-环戊烯酮的混合物的任何一种都可被使用。也可使用其光学活性物质。

顺式-环戊烯酮可以通过化学合成[Helvetica Chimica Acta, volume 55, p2838-2844(1972)]制备。反式-环戊烯酮既可通过化学合成[Carbohydrate Res., volume 247, p217-222(1993)]制备，或通过将糖醛酸如葡糖醛酸，糖醛酸衍生物如葡糖醛酸内酯或含有它们的物质(参见PCT/JP97/03052)加热而制备。在本发明中，也可以用这类加热的产物或部分纯化的产物或其纯化的产物。

例如，当D-葡糖醛酸被用作糖醛酸，和其1%溶液在121℃被加热4小时时，环戊烯酮作为热-处理的物质产生。用溶剂萃取在此热-处理的物质中的环戊烯酮，将萃取液浓缩。然后，通过硅胶柱色谱将此浓缩的萃取液分离，将洗脱的环戊烯酮部分浓缩，从浓缩物中用氯仿萃取环戊烯酮，浓缩物的萃取液进行正相柱色谱，从而分离在热-处理的物质中的环戊烯酮。

环戊烯酮的物理性质将在下面给出。顺便地说，环戊烯酮的质谱分析用质谱仪DX302（由Nippon Denshi生产）进行。NMR的测量用氘代氯仿作溶剂，用JNM-A 500（由Nippon Denshi生产）进行。比旋光用DIP-370旋光仪（由Nippon Bunko生产）测量；紫外吸收光谱用UV-2500光谱仪（由Shimadzu生产）测量；红外吸收光谱（IR）用FTIR-8000红外光谱仪（由Shimadzu生产）测量。

MS m/z 115 $[M+H]^+$

^1H-NMR ($CDCl_3$)

δ4.20 (1H, d, J=2.4Hz, 5-H)、4.83 (1H, m, 4-H)、6.30 (1H, dd, J=1.2, 6.1Hz, 2-H)、7.48 (1H, dd, J=2.1, 6.1Hz, 3-H)

顺便地说，^1H-NMR的化学位移值以氯仿的化学位移值为7.26ppm

的基础上给出。

旋光度: $[\alpha]_D^{20}$ 0° （c 1.3,水）

UV: λ_{max}215nm(水)

IR（KBr 法）：在 3400, 1715, 1630, 1115, 1060, 1025cm^{-1}吸收。

当分离出的环戊烯酮进行光学拆分时，得到(-)-4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮和(+)-4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮。不言而喻的是，通过合成法所得的环戊烯酮也可以进行光学拆分。

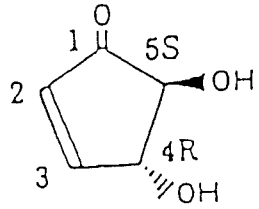
例如，将环戊烯酮溶于乙醇，往该乙醇溶液中进一步加入己烷/乙醇(94/6)，制备环戊烯酮溶液。当此样品溶液用，例如，Chiral Pack AS(由 Daicel Chemical Industries 生产)，在柱温为 40℃，流动相为己烷/乙醇(94/6)的条件下进行 HPLC 时，环戊烯酮可被光学拆分。

光学拆分的(-)-反式-4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮[以后称为(-)-环戊烯酮]的旋光度为$[\alpha]_D^{20}$ -105°(c 0.30,乙醇)，而光学拆分的(+)-反式-4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮[以后称为(+)-环戊烯酮]的旋光度为$[\alpha]_D^{20}$ +104°(c 0.53,乙醇)。顺便地说，旋光度用上述 DIP-370 型旋光仪（由 Nippon Bunko 生产）测量。

之后，(-)-环戊烯酮和(+)-环戊烯酮分别通过质谱分析和核磁共振（NMR）的手段，通过上述方法测量 UV 吸收光谱，并测量红外吸收光谱而进行结构分析。结果，在光学拆分之前，两种光学活性物质显示相同的结果。

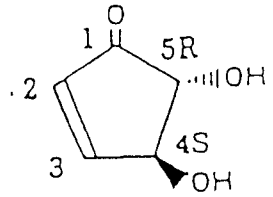
光学拆分的(-)-环戊烯酮和(+)-环戊烯酮分别被转化为 p-二甲基氨基苯甲酰基衍生物，圆二色性谱(CD)用 J-720 型圆二色性微粒计(由 Nippon Bunko 生产)测量，将结果用于二苯甲酸手性规则[J. Am. Chem. Soc., volume 91, p3989-3991(1969)]，测定构型。

(-)-环戊烯酮的 p-二甲基氨基苯甲酰基衍生物的 CD 和(-)-环戊烯酮的立体结构示于附图 47 中。在该附图中，纵坐标显示摩尔圆二色性，而横坐标显示波长(nm)。顺便地说，上述立体结构在下面以式[V]给出



【V】

(+)-环戊烯酮的 p-二甲基氨基苯甲酰基衍生物的 CD 和(+)-环戊烯酮的立体结构示于附图 48 中。在该附图中，纵坐标显示摩尔圆二色性，而横坐标显示波长(nm)。顺便地说，上述立体结构在下面以式[VI]给出



【VI】

如附图 47，附图 48 所示，式[V]和式[VI]中，(-)-环戊烯酮是(-)-(4R,5S)-反式-4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮，而(+)-环戊烯酮是(+)-环戊烯酮是(+)-(4S,5R)-反式-4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮。

上述环戊烯酮或其光学活性物质可以通过任何方法生产，即它们可以通过在本说明书中公开的方法生产，或者通过化学合成手段生产；反式-和顺式-环戊烯酮，其混合物或其光学活性物质也可用于本发明中。

环戊烯酮的盐或其光学活性物质的例子有药用盐，它们可以通过已知的转化方法制备。

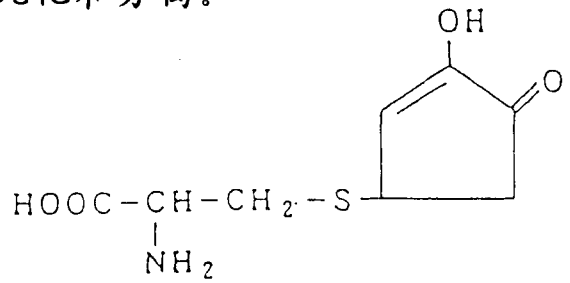
当使环戊烯酮，其光学活性物质和/或其盐与含有 SH 基团的化合物反应时，式[I]表示的本发明化合物在反应溶液中产生。

当使环戊烯酮，其光学活性物质和/或其盐与含有 SH 基团的化合物如含有 SH 基团的氨基酸或其衍生物在酸性条件下反应时，式[II]表示的本发明化合物（以后称为环戊烯酮硫代衍生物）在反应溶液中产生。

含有 SH 基团的化合物没有任何限制，其例子有甲硫醇，丁硫醇，巯基乙醇，含有 SH 基团的氨基酸和含有 SH 基团的氨基酸衍生物。含有 SH 基团的氨基酸的例子有半胱氨酸和高半胱氨酸。

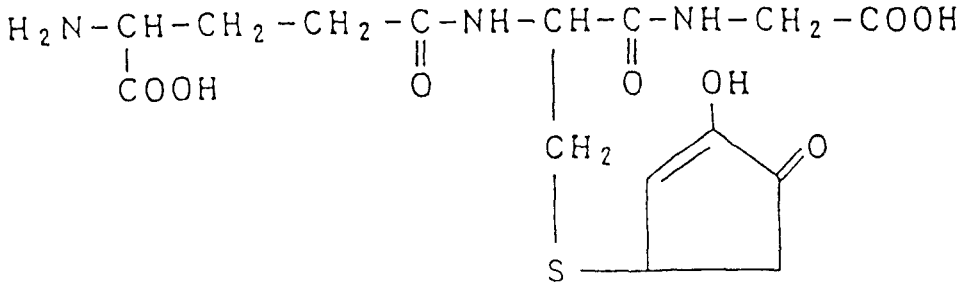
含有SH基团的氨基酸衍生物的例子有上述氨基酸的衍生物，如半胱氨酸衍生物，含有半胱氨酸的肽和含有半胱氨酸衍生物的肽。对于含有半胱氨酸的肽没有特别限制，只要半胱氨酸是肽的组成部分。根据本发明含有半胱氨酸的肽包括低分子物质如寡肽（例如谷胱甘肽）至高分子物质如蛋白质。含有半胱氨酸和高半胱氨酸的肽在诸如与还原处理结合的反应期间，给出肽半胱氨酸和高半胱氨酸的条件下，也可被用作本发明的含有半胱氨酸和高半胱氨酸的肽。顺便地说，含有半胱氨酸的肽包括含有糖，脂类，等等的物质。另外，它也可以是上述各种物质的盐，酸酐，酯，等等。概括起来，环戊烯酮与含有SH基团的化合物在酸性条件下反应形成环戊烯酮硫代衍生物。

通过环戊烯酮，其光学活性物质和/或其盐与含有SH基团的化合物，如含有SH基团的氨基酸，或其衍生物反应而制备的环戊烯酮硫代衍生物，或其光学活性物质的纯化和分离手段可以是已知的纯化手段，如化学方法和物理方法。因此，常规方法如凝胶过滤法，用分子量分级膜的分级分离，用溶剂萃取，分馏和用离子交换树脂的各种色谱法等等被结合起来，从而可以纯化和分离环戊烯酮硫代衍生物或其光学活性物质。例如，当使环戊烯酮和半胱氨酸在pH 4和60℃反应16小时时，式[VII]表示的环戊烯酮硫代衍生物在反应溶液中形成，作为含有所述衍生物的反应产物的正相柱色谱的结果，环戊烯酮硫代衍生物可被纯化和分离。



【Ⅶ】

而且，当使环戊烯酮和谷胱甘肽在酸性条件下反应时，例如，下式[VIII]表示的环戊烯酮硫代衍生物在反应溶液中形成，作为含有所述衍生物的反应产物的逆相柱色谱的结果，所说的环戊烯酮硫代衍生物可被纯化和分离。



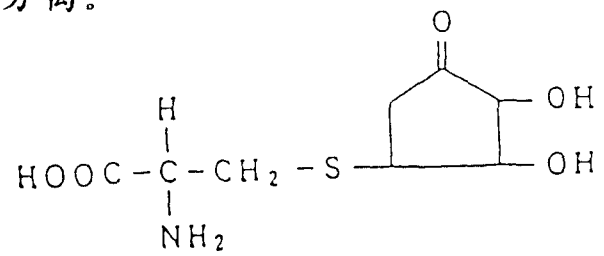
【Ⅷ】

当使环戊烯酮，其光学活性物质和/或其盐在中性条件下与含有SH基团的化合物，例如，含有SH基团的氨基酸或其衍生物反应时，例如，式[III]表示的化合物（以后称为环戊烯酮硫代衍生物）在溶液中形成。

上述含有SH基团的化合物没有特别限制，含有SH基团的上述化合物可以作为例子。环戊烯酮，其光学活性物质和/或其盐与含有SH基团的化合物的反应可以优选地在中性pH进行。

通过环戊烯酮，其光学活性物质和/或其盐与含有SH基团的化合物反应而制备的环戊烯酮硫代衍生物，或其光学活性物质或其盐的纯化和分离手段可以是已知的纯化手段，如化学方法和物理方法。因此，常规方法如凝胶过滤法，用分子量分级膜的分级分离，用溶剂萃取，分馏和用离子交换树脂的各种色谱法等等被结合起来，从而可以纯化和分离环戊烯酮硫代衍生物或其光学活性物质或其盐。

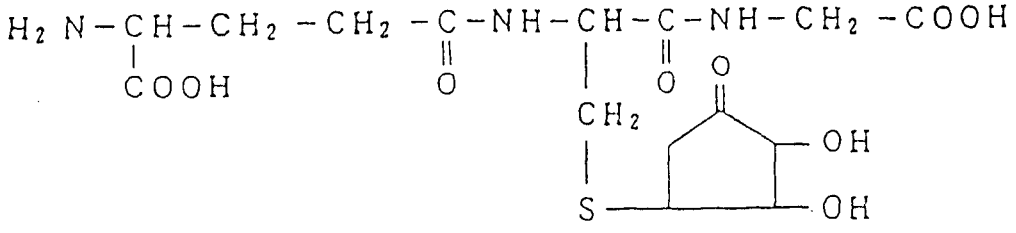
例如，当使环戊烯酮和半胱氨酸在pH 7和37℃反应30分钟时，式[IX]表示的环戊烯酮硫代衍生物在反应溶液中形成，作为含有所述衍生物的反应产物的正相柱色谱的结果，环戊烯酮硫代衍生物可被纯化和分离。



【Ⅸ】

进一步地，当使环戊烯酮和谷胱甘肽在中性条件下反应时，例如，下式[X]表示的环戊烯酮硫代衍生物在反应溶液中形成，作为含有所述

衍生物的反应产物的逆相柱色谱的结果，所说的环戊烯酮硫代衍生物可被纯化和分离。



【X】

本发明化合物的光学活性物质的分离可以通过使外消旋混合物进行机械拆分，选择性结晶，通过以非对映体盐或以包合物结晶的拆分，用酶或微生物的动态拆分，通过色谱手段的拆分等等而进行。

气相色谱，液相色谱，薄层色谱，等等可被用于通过色谱拆分的情况下，适合于各种情况的手性固定相可被使用。

用手性固定相的方法，用手性洗脱的方法，以非对映体分离等等可被用于通过液相色谱的光学拆分。

酰胺型固定相，脲型固定相，配位体交换型固定相，多糖-多糖衍生物固定相，蛋白质固定相，聚甲基丙烯酸固定相，聚甲基丙烯酰胺固定相等等可被用作手性固定相。

对于洗脱液，与上述固定相结合起来考虑，己烷型，醇型，和水（缓冲液）型等等可以适当地使用。

对于本发明化合物的盐或其光学活性物质，药学上可接受的盐被作为例子，它们可以通过已知方法转化而制备。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有生理活性，如抗癌活性，癌细胞生长抑制活性，细胞凋亡诱导活性，拓扑异构酶 II 抑制活性，癌细胞分化诱导活性，抗风湿活性，慢性关节风湿症抑制活性，诱导 Fas 抗原产生的活性，抗菌活性，抗病毒活性，改善肝功能的活性，诱导热激蛋白的活性，使血液成分正常化的活性，癌症免疫力增强活性，抗炎活性，肿瘤坏死因子表达抑制活性，免疫调制活性如迟发型过敏反应的抑制活性，淋巴细胞转移抑制活性，混合的淋巴细胞

反应抑制活性，IgE 生产抑制活性和角叉藻聚糖水肿抑制活性，由于这些活性，含有作为有效成分的至少一种选自本发明化合物的化合物，其光学活性物质和其盐的药剂可以作为作用于生物防御功能的药物，如作用于抗体生产功能的药物制剂，抗炎剂，抗过敏剂，抗风湿剂和干扰素诱导剂，作用于糖代谢的药物如糖尿病药，和作用于致病微生物的药物如抗菌剂抗病毒剂。因此，通过本发明获得的药剂作为用于对本发明化合物，其光学活性物质或其盐敏感的疾病的药物，即作为治疗或预防，例如，癌症，病毒引起的疾病，风湿症，糖尿病，过敏，自身免疫疾病，炎症等等的药物是十分有用的。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有细胞生长抑制作用，并对癌细胞如人前髓细胞的白血病细胞 HL-60，人急性成淋巴细胞的白血病细胞 MOLT-3，肺癌细胞 A-549，SV40-转移的肺癌细胞 WI-38VA13，肝细胞瘤细胞 Hep G2，结肠癌细胞 HCT 116，人结肠癌细胞 SW 480，人结肠癌细胞 WiDr,胃癌细胞 AGS 和骨髓瘤细胞具有抗癌作用。因此，本发明化合物，其光学活性物质或其盐可以用作抗癌剂的有效成分。而且，这些化合物对那些癌细胞也具有细胞凋亡诱导作用。本发明化合物，其光学活性物质或其盐抑制癌细胞生长的作用机制根本不限制本发明的范围，例如，拓扑异构酶 II 抑制作用和对癌细胞的细胞凋亡诱导作用被本发明的抗癌活性所包括。

当至少一种具有抗癌作用的选自本发明化合物的化合物，其光学活性物质或其盐被用作有效成分，并通过与已知的药用载体结合而制备药物制剂时，就可以制备抗癌剂。一般地，至少一种选自本发明化合物的化合物，其光学活性物质或其盐与药用液体或固体载体结合，如果需要，还可与溶剂，分散剂，乳化剂，缓冲剂，稳定剂，填料，粘合剂，崩解剂，润滑剂，等等被加入其中，给出固体形式的抗癌剂如片剂，丸剂，稀释的粉剂，粉剂，胶囊等等，或液体形式的如溶液，悬浮液，乳剂等等。而且，还可以是干燥品，它们在使用之前通过加入适当的载体而制成液体。

药用载体可以根据上述给药方式和制剂形式而选择。在口服制剂

的情况下，淀粉，乳糖，糖，甘露糖醇，羧甲基纤维素，玉米淀粉，无机盐等等可被使用。在生产口服制剂时，黏合剂，崩解剂，表面活性剂，润滑剂，流动性促进剂，调味剂，着色剂，香料等等可以进一步结合在其中。

另一方面，在肠胃外制剂的情况下，它们可以通过普通方法制备，其中至少一种作为有效成分的选择本发明化合物的化合物，其光学活性物质或其盐被溶解或悬浮在稀释剂如注射用蒸馏水，生理食盐水，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，等等中，如果需要，接着往其中加入杀菌剂，稳定剂，等渗剂，止痛剂等。

本发明的抗癌剂根据制剂的形式以合适的途径给药。对于给药的方法没有特别限制，可以通过口服，外用和注射的手段给药。注射剂被,例如,静脉内，肌内，皮下，皮内等给药，而外用制剂包括栓剂等。

作为抗癌剂的剂量由其剂型，给药方法，使用目的和被治疗患者的年龄，体重和症状决定，它不是恒定的，但是，一般情况下，在制剂中所含的选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐中的至少一种以上的化合物的量为每天 0.1μg 至 200mg/kg（对于成人）。当然，剂量可以随各种条件而变化，因此，少于上述的剂量在一些情况也可能是足够的，而在其他情况下，可能需要比上述大的剂量。本发明的药剂可以直接口服给药，另外，它们也可以加入任何食品和饮料中，使药剂可以常规摄取。

本发明的化合物，其光学活性物质或其盐具有抗癌作用，在低浓度下，它们显示诱导癌细胞分化的能力，因而可用作癌细胞的分化诱导剂（除癌剂）。含有至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物作为有效成分的癌细胞分化诱导剂可以根据上述制备抗癌剂的方法制成药剂，并可通过类似于抗癌剂的方法给药。

作为癌细胞的分化诱导剂的剂量由其剂型，给药方法，使用目的和被治疗患者的年龄，体重和症状决定，它不是恒定的，但是，一般情况下，在制剂中所含的本发明化合物，其光学活性物质或其盐的量

为每天 0.1μg 至 100mg/kg（对于成人）。当然，剂量可以随各种条件而变化，因此，少于上述的剂量在一些情况也可能是足够的，而在其他情况下，可能需要比上述大的剂量。本发明的药剂可以直接口服给药，另外，它们也可以加入任何食品和饮料中，使药剂可以常规摄取。

上述癌细胞的分化诱导剂可被用于诱导癌细胞分化的方法中。因此，当至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物被用作有效成分时，可以分化癌细胞，这类方法对于阐明癌细胞分化的诱导机制，分化诱导剂的筛选机制等等是有用的。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有抗菌作用，当至少一种选自这类化合物的化合物被用作有效成分，并通过与已知的药用载体结合制成药剂时，可以生产抗菌剂。所说的药剂可以通过与上述抗癌剂相同的方法生产，并可以通过与上述抗癌剂相同的方式给药。

作为抗菌剂的剂量由其剂型，给药方法，使用目的和被治疗患者的年龄，体重和症状决定，它不是恒定的，但是，一般情况下，在制剂中所含的本发明化合物，其光学活性物质或其盐的量为每天 10μg 至 20mg/kg（对于成人）。当然，剂量可以随各种条件而变化，因此，少于上述的剂量在一些情况也可能是足够的，而在其他情况下，可能需要比上述大的剂量。本发明的药剂可以直接口服给药，另外，它们也可以加入任何食品和饮料中，使药剂可以常规摄取。另外，本发明化合物，其光学活性物质或其盐可被用作抗菌食品和饮料的材料。而且，它们可以与乙醇，甘油，醋酸钠，抗坏血酸，甘油脂肪酸酯，盐，EDTA 和其他抗生素一起使用。

含有至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐作为有效成分的本发明的抗菌剂可被用作改善食品和饮料防腐性能的防腐剂。另外，选自这些化合物的化合物被加入食品和饮料中，可以用于食品和饮料的防腐方法中。被加入食品和饮料中的本发明化合物，其光学活性物质或其盐的量将随食品和饮料的类型而变化，可以加入与目标相适应的量。

使用本发明抗菌剂的一种方法是通过合适的方法将药剂加入食品

或饮料中。虽然常规方法是在食品和饮料的生产步骤期间加入它们/它，但其中食品被浸入含有本发明化合物，其光学活性物质或其盐的溶液中的方法也可使用。也可以一起实施将其加入食品中的方法和将食品浸入溶液中的方法。

当本发明的抗菌剂被用作防腐剂时，食品和饮料的防腐可被进一步改善。在冷冻食品和冷冻甜点的情况下，在冷冻之前的操作步骤中沾染的微生物的生长可被抑制，因而可以在卫生的角度获得很好的效果。本发明的抗菌剂对于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有效，并且对于引起食品中毒的细菌，例如，对于抗药性细菌如抗甲氧苯青霉素的金黄色葡萄球菌和沙门菌，产生肠毒素的金黄色葡萄球菌，催吐型蜡状芽孢杆菌,腹泻型蜡状芽孢杆菌和肠出血型大肠杆菌 O-157 非常有效。也对 hiochi 菌有效。而且，显示出对引起疾病的微生物的抗菌作用，该疾病由微生物如 Legionella pneumophila(引起 Legionnaire's 病的微生物),副溶血弧菌(引起食品中毒的微生物),Helicobacter pylori(引起溃疡的微生物),Campylobacter jejuni(引起肠胃炎的微生物),等等，包括 Legionella pneumophila(ATCC 33153), 副溶血弧菌 (ATCC 17802), Helicobacter pylori(NCTC 11637), Campylobacter jejuni(ATCC 29428)等等引起。也对诸如酵母和真菌的微生物有效。顺便地说，衣服，床单等的灭菌可以用本发明的抗菌剂进行，当本发明的抗菌剂被喷洒，或当用本发明的抗菌剂擦洗时，可以将要灭菌的东西灭菌（除去和杀死细菌）。例如，当其被加入办公建筑的空调水中时，可以预防 Legionnaire's 病。

本发明的抗菌剂对龋牙细菌和牙周疾病的细菌具有抗菌活性，可以提供含有本发明抗菌剂的口内制剂。口内制剂的形式可以是已知的如液体或糊剂。口内制剂的一个例子是洁牙剂。洁牙剂可以为已知形式如液体，糊剂或粉剂。在洁牙剂中，本发明化合物，其光学活性物质或其盐的量没有特别限制，如果其中含有对龋牙细菌和引起牙周疾病的细菌有效的浓度，就足够了。已知的添加剂如润湿剂，表面活性

剂，黏合剂，香料，甜味剂等等可被加入洁牙剂中。

用本发明的抗菌剂能够提供抗菌美容剂。本发明抗菌美容剂的例子有基本美容剂如膏剂，乳状洗液，洗液，洗面材料和包装；特质美容剂如唇膏和粉底；香皂；和含有有效量的至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物的肥皂。可用于头发，并可制成护发品包括诸如头发调色剂，发液，发型剂，吹发制剂，发乳和发膜；和头发化妆品如香波，漂洗和头发处理产品。在美容剂中，其量根据其抗菌活性决定。对于其他成分，可以使用那些能与美容剂正常结合的成分。该抗菌美容产品有效地作用于引起特应性皮炎的微生物，对于改善和预防特应性皮炎显示出明显的效果。

也可以用本发明抗菌剂提供沐浴剂。本发明的沐浴剂可被制成含有有效量的至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物的粉剂，丸剂，固体，液体等等。沐浴剂中所含化合物的量根据所需抗菌活性决定。对于沐浴剂的其他成分，那些已经能与沐浴剂正常结合的成分可被使用。本发明沐浴剂有效地作用于引起特应性皮炎的微生物，对于改善和预防特应性皮炎显示出明显的效果。从浴室中有效地杀灭引起疾病的微生物。

而且，含有至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物的食品和饮料对于改善和/或预防食品中毒，肠胃炎等非常有用。

本发明的细胞凋亡诱导剂含有至少一种选自本发明的细胞凋亡诱导化合物，其光学活性物质或其盐的化合物作为有效成分。可以通过与上述抗癌剂的情况相同的方式制成药物制剂，并以与抗癌剂相同的方式给药。

作为细胞凋亡诱导剂的剂量没有特别限制，但可以根据其剂型，给药方法，使用目的，和被施用诱导剂的患者的年龄，体重和症状决定。但是，一般情况下，在制剂中所含的至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物量对于成人为每天 0.1μg 至 100mg/kg。当然，剂量可以随各种因素而变化，因此，少于上述的剂

量在一些情况也可能是足够的，而在其他情况下，可能需要比上述大的剂量。本发明的药剂可以直接就这样口服给药，而且，药剂也可以加入普通食品和饮料后每天服用。

与细胞致病死亡的坏死不同，细胞凋亡被认为是在细胞本身的基因中初始编程的死亡。因此，编制细胞凋亡程序的基因由某些外部和内部起因活化，而编程的细胞死亡基因蛋白质基于所说的基因而产生，然后，细胞本身由产生的编程死亡蛋白破坏并死亡。

本发明的细胞凋亡诱导剂是十分有用的，因为它可以在所需的组织和细胞中诱导这类细胞凋亡，可以排除不需要的细胞或在自然状态下从活器官中排除致病性细胞。

本发明的细胞凋亡诱导剂可被用于诱导细胞凋亡的方法中。因此，当至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物被用作有效成分时，可以诱导细胞凋亡，所说的方法对于阐明细胞凋亡诱导机制，细胞凋亡诱导剂和细胞凋亡诱导抑制剂的筛选机制等等是有用的。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐基于抗风湿活性，当至少一种选自这类化合物的化合物被用作活性成分，并通过与已知的药用载体结合制成药剂时，可以生产抗风湿剂。所说的药物制剂可以通过与上述抗癌剂的情况相同的方式制成药物制剂，并以与抗癌剂相同的方式给药。

作为本发明抗风湿剂的剂量没有特别限制，但可以根据其剂型，给药方法，使用目的，和被施用诱导剂的患者的年龄，体重和症状决定。但是，一般情况下，在制剂中所含的至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物量对于成人为每天 0.1μg 至 200mg/kg。当然，剂量可以随各种因素而变化，因此，少于上述的剂量在一些情况也可能是足够的，而在其他情况下，可能需要比上述大的剂量。本发明的药剂可以直接就这样口服给药，而且，药剂也可以加入普通食品和饮料后每天服用。而且，本发明化合物，其光学活性物质或其盐可被用作制备本发明药剂的材料。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有各种生理活性，如对关节炎等的抗炎活性，角叉藻聚糖水肿抑制活性，肿瘤坏死因子生产抑制活性，增加白细胞介素-10 生产的活性，抑制一氧化氮生产的活性，诱导 Fas 抗原生产的活性，免疫调制活性如迟发型过敏反应的抑制活性，淋巴细胞转移抑制活性，混合的淋巴细胞反应抑制活性，IgE 生产抑制活性等等。作为含有至少一种选自本发明化合物的化合物，其光学活性物质和其盐的化合物的抗炎剂或炎症预防剂，肿瘤坏死因子生产抑制剂或肿瘤坏死因子生产预防剂，白细胞介素-10 生产增强剂，免疫调节剂，一氧化氮生产抑制剂，Fas 抗原生产诱导剂，IgE 生产抑制剂，迟发型过敏反应抑制剂和抗过敏剂可以通过与上述抗风湿剂情况下相同的方式被制成药物制剂，并可以与上相同的方式给药。

这些制剂的剂量没有特别限制，但可以根据其剂型，给药方法，使用目的，和被施用诱导剂的患者的年龄，体重和症状决定。但是，一般情况下，在制剂中所含的至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物量对于成人为每天 0.1μg 至 200mg/kg。当然，剂量可以随各种因素而变化，因此，少于上述的剂量在一些情况也可能是足够的，而在其他情况下，可能需要比上述大的剂量。例如，在抗炎剂和肿瘤坏死因子生产抑制剂的情况下，在制剂中所含的一种或多种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物量优选地对于成人为每天 10pg-50mg/kg。在一氧化氮产生抑制剂的情况下，在制剂中所含的一种或多种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物量优选对于成人为每天 0.1μg-20mg/kg。根据使用目的，在制剂中有效成分的量可被控制。

本发明的药剂可以直接口服给药，而且，药剂也可以加入普通食品和饮料后每天服用。

风湿是其中在骨膜细胞和软骨细胞中发生的自身免疫疾病，本发明的抗过敏剂可以用作自身免疫疾病的治疗剂。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐抑制肿瘤坏死因子的产

生，(该因子被认为在器官-特异性自身免疫疾病如慢性风湿性关节炎或炎症中直接引起炎症)，并促进作为 THI 抑制细胞因子的白细胞介素-10 的产生。因此，诸如器官-特异性自身免疫疾病的风湿炎症，尤其是慢性风湿性关节炎被改善；炎症制造者如 C-反应活性蛋白（CRP）值，风湿病因子（RF）值和红细胞沉降率（血沉）大大降低；诸如步行障碍的并发症被明显地改善。

肿瘤坏死因子以诱导肿瘤位点的出血性坏死的因子被发现，目前，它被认为是广泛参与炎症的生物防御和免疫功能的细胞因子。此肿瘤坏死因子的生产失调对主体引起各种不方便，肿瘤坏死因子产生的过量或失调与许多疾病有关，包括慢性风湿性关节炎，风湿性骨髓炎，骨关节炎，痛风性关节炎，脓毒症，脓毒性休克，内毒素休克，革兰氏阴性菌引起的脓毒症，毒性休克综合征，脑型疟，慢性肺炎，对主体移植的疾病，对同种移植的排斥反应，流感和其他发热和由传染性疾病引起的肌肉疼痛，传染或恶性肿瘤的第二恶病质，人获得性免疫缺损综合征（AIDS）的第二恶病质，AIDS，AIDS-相关的综合征，瘢痕瘤形成，溃疡性结肠炎，多发性硬化，自身免疫糖尿病和系统性红斑狼疮[Molecular Medicine, volume 33, p1010-1020 和 p1182-1189(1996)]。本发明的肿瘤坏死因子抑制剂可用于治疗由肿瘤坏死因子介导或恶化的疾病。本发明进一步提供控制肿瘤坏死因子生产的方法，其中至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物被用作有效成分。本发明进一步提供含有至少一种改善病症或预防由肿瘤坏死因子介导或恶化的疾病，选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物的食品或饮料。

一氧化氮（以后缩写为 NO）是内皮-依赖的松弛因子(EDRF)的主要因素[Nature, volume 327, p524-526(1987)]。本发明提供用于治疗或预防需要抑制 NO 生产的疾病，含有至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物被用作有效成分的药物。对于需要抑制 NO 生产的疾病没有特别限制，其例子有由毒性休克引起的，或由治疗某些细胞因子引起的系统性低血压，降低血压反应，自身免疫疾病，

炎症，关节炎，风湿性关节炎，糖尿病，肠炎症，血管功能不足，血管的病理性扩张，组织损伤，心血管局部缺血，对疼痛过敏，脑局部缺血，由血管生成引起的疾病，癌症等等。该疾病包括在日本公开特许平-09/504524;09/505288;08/501069;08/512318;和 06/508849 中提到的。

含有至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物被用作有效成分的 NO 生成抑制剂可用于研究 NO 产生的机制和 NO 生物活性的机制，另外，可以用于筛选参与 NO 生成机制中的物质。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐在 NO 生产细胞中具有 NO 生产抑制活性。例如，当内毒素（脂多糖或 LPS）被加入小噬细胞株时，可诱导的 NO 合成酶（NOS）被表达，NO 被分泌到培养基中，而当在本发明化合物，其光学活性物质或其盐共存下加入 LPS 时，NO 的生产被抑制。当 NO 生产通过用 LPS 处理而诱导时，由于 NO 的致细胞病活性，细胞的存活率降低，但是，当在用 LPS 处理期间加入本发明化合物，其光学活性物质或其盐时，NO 的生产降低，干扰细胞抑制。

血管生成对于固体肿瘤生长是必需的，而血管内皮生长因子/血管通透性亢进因子（VEGF）在此步骤中扮演重要角色。在各种癌细胞中，VEGF 是由 NO 诱导的。当本发明化合物，其光学活性物质或其盐抑制 NO 生成时，癌细胞的 VEGF 生成也被抑制，结果，癌组织周围的血管生成被抑制。当本发明化合物，其光学活性物质或其盐对通过皮下移植癌细胞而形成固体癌的小鼠给药时，癌组织周围的血管形成变少，癌症被分开。

亚硝基胺是通过亚硝基与仲胺加成而合成的一系列化合物，几百种亚硝基胺是已知的。它们中的许多伤害 DNA，对动物有致癌作用。已经报道，亚硝基胺与人体癌症的产生有很大关系，它们通常在胃内通过亚硝酸盐与胺反应而生成。即使在中性 pH 的生理条件下，NO 也与胺反应给出亚硝基胺。另外，在被定向肝吸虫感染和患有与癌症在免疫学上密切相关的肝硬变的患者体内，NO 的生产增加。因此，当 NO 生产增加通过施用本发明化合物，其光学活性物质或其盐抑制时，能

够预防癌症，尤其是高危群的发生。因此，本发明化合物，其光学活性物质或其盐在抑制肿瘤生成和抑制癌组织中血管生成的两个步骤中显示抗癌作用。

而且，NO 诱导其特征在于炎性损伤，即血管渗透性的水肿[Maeda,et al.,Japanese Journal of Cancer Research,volume 85,p331-334(1994)]，也诱导作为炎症介体的前列腺素的生物合成[Salvemini,et al.,Proceedings of National Academy of Science,U.S.A.,volume 90,p7240-7244(1993)]。另一方面，据信NO迅速地与超氧化物自由基反应，产生的过氧化亚硝酸盐引起细胞炎症和组织伤害。

当活化的免疫细胞侵袭器官，从中释放细胞因子时，NO生产被诱导。胰岛素-依赖性糖尿病是由朗格尔汉斯β细胞的特异性破坏引起的，而破坏是由NO造成的。另外，患有慢性关节风湿症，骨关节风湿症,痛风性关节炎和伴随Behcet病的关节炎患者的损伤的关节液与这类患者的正常关节的关节液或健康人的关节中的关节液相比，含有更高浓度的NO。当本发明化合物，其光学活性物质或其盐对这类患者给药时，在损伤处的NO的生产被抑制，症状得到改善。

在脑局部缺血和再灌注之后，NO的生产降低，结果，脑组织被伤害。当本发明化合物，其光学活性物质或其盐在脑局部缺血期间对患者给药时，脑组织损伤被还原，预后被改善。

被称为Fas抗原的细胞表面抗原（APO-1抗原或CD95）已经被注意到作为诱导细胞凋亡的分子[Cell,volume 66,p233-243(1991);J.Exp.Med.,volume 169,p1747-1756(1989);J.Biol.Chem.,volume 267,p10709-10715(1992);和 J.Immunology,volume 184,p1274-1279(1992)]。

Fas抗原在免疫细胞如胸腺细胞，T细胞，细胞毒性T细胞，B细胞和NK细胞中表达。为了抵抗外来非-自身抗原的侵害，免疫系统诱导免疫反应，非-自身抗原被排除。然而，它不显示免疫反应，但建立自身耐受能力。这是因为具有自身反应活性的淋巴茎细胞被除去负选

择的克隆，从而通过细胞凋亡而排除。但是，当这些细胞由于在活体内的一些异常，如 Fas 抗原的基因缺损而不进行细胞凋亡时，例如自身反应活性 T 细胞在末梢区累积。在正常活体中，即使是负责免疫的 B 细胞也可获得自身耐受能力，而自身反应活性 B 细胞一般由于细胞凋亡而死亡，但是，当这些细胞由于在活体内的一些异常，如 Fas 抗原的基因缺损而不进行细胞凋亡时，自身反应活性 T 细胞在末梢区累积。另外，在关节风湿症的情况下，上述自身反应活性淋巴细胞的异常和在滑液细胞的转动异常是一些疾病的起因。

其中至少一种本发明化合物，其光学活性物质或其盐作为有效成分的 Fas 抗原生产诱导剂可用于诱导对于构成活体不必要细胞的细胞凋亡，该细胞由于转动和自身反应活性淋巴细胞异常而不能从活体排出，并可用于诱导 Fas 抗原生产。含有至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物作为有效成分的药剂也可用作预防或治疗伴随有 Fas 抗原生产的疾病的方法中。在本发明中，随有 Fas 抗原生产的疾病没有特别限制，其例子有关节风湿症和由自身反应活性 T 细胞和自身反应活性 B 细胞等等引起的自身免疫疾病，包括在 WO97/0965 说明书中提到的疾病。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有免疫调制活性如增加白细胞介素-10 生产的活性，迟发型过敏反应的抑制活性，淋巴细胞转移抑制活性，混合的淋巴细胞反应抑制活性，IgE 生产抑制活性，和角叉藻聚糖水肿抑制活性，含有至少一种选自本发明化合物的化合物，其光学活性物质和其盐的化合物作为有效成分的免疫调制剂可用作治疗或预防由免疫系统和免疫因子异常引起的疾病的药剂

作为白细胞介素-10 生产减少的结果，Th1 被活化，Th1-显性自身免疫的炎症被诱导。此炎症参与器官-特异性自身免疫疾病如肾炎和肝炎以及移植排斥和过敏性接触皮炎。本发明的免疫调制剂促进白细胞介素-10 生产并抑制 Th1 活性，因而可用于治疗和预防这些疾病。

淋巴细胞转移是其中分裂素与淋巴细胞表面受体结合而活化淋巴细胞，促进其分裂和生长的反应。混合的淋巴细胞反应是其中从同种

但不同系的动物获得的淋巴细胞进行混合培养，由于主要组织-能适应的抗原不一致而诱导淋巴细胞活化，促进淋巴细胞的分裂和生长的反应。上述免疫调制剂抑制这些反应，并且对于治疗或预防由淋巴细胞的异常增进引起的慢性自身免疫疾病如慢性肾炎，慢性结肠炎，Ⅰ型糖尿病和慢性关节风湿症特别有用，并可用于抑制移植排斥作用。

角叉藻聚糖水肿模型是其中其中作为炎症诱导剂的角叉藻聚糖被皮下注射到爪内诱导发炎细胞如巨噬细胞和中性白细胞，通过从这些细胞产生的炎症因子增加血管渗透性，从而诱导水肿的反应。上述免疫调制剂对水肿的抑制作用可用于治疗或预防需要控制血管渗透性增加的疾病如慢性关节风湿症。

在以哮喘和特应性皮炎为代表的过敏性疾病中，从乳房细胞中释放的化学介体在过敏性反应中扮演重要的角色。当 IgE 被结合到细胞膜上形成交联时，此反应被诱导，本发明的免疫调制剂对于改善症状和/或预防由于IgE生产而介导或恶化的疾病如由IgE引起的过敏性疾病，包括支气管哮喘，过敏性鼻炎，特应性皮炎，过敏性结膜炎，寻麻疹，过敏性休克等等十分有用。另外，本发明的免疫调制剂抑制迟发型过敏反应，并可用于治疗和预防伴随迟发型过敏反应的疾病，如接触型过敏反应，过敏性接触皮炎，细菌性过敏，真菌性过敏，病毒性过敏，药物过敏，甲状腺炎和脑炎。

作为近几年糖尿病病理研究的结果，报道了正常脂肪细胞的正常系统性胰岛素作用中扮演重要角色，对于糖代谢平稳的过程，正常脂肪细胞是必需的[实验医学,volume 14,p61-68(1996)]。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有诱导脂肪细胞前体如纤维细胞前体分化，和诱导所说的细胞向脂肪细胞的分化能力。因此，当本发明化合物，其光学活性物质或其盐被给药时，正常脂肪细胞增加，从而改善糖尿病症状。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有低血糖活性，现在能够制备用于治疗或预防糖尿病，含有至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物作为有效成分的药剂。

因此，当至少一种选自这类化合物的化合物被用作有效成分，并通过与已知的药用载体结合而被制成药剂时，就能够制备用于治疗或预防糖尿病的药剂。所说的药剂可以通过与上述抗癌剂相同的方式生产，并可以通过与上述药物相同的方式给药。

作为治疗或预防糖尿病的药剂的剂量没有特别限制，但可以根据剂型，给药方法，使用目的，和患者的年龄，体重和症状决定。但是，一般情况下，在制剂中所含的至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物量对于成人为每天 10pg 至 200mg/kg。当然，剂量可以随各种因素而变化，因此，少于上述的剂量在一些情况也可能是足够的，而在其他情况下，可能需要比上述大的剂量。本发明的药剂可以就这样口服给药，而且，该药剂可以在加入普通食品和/或饮料之后每天服用。

而且，本发明化合物，其光学活性物质或其盐可被用作改善或预防糖尿病的食品或饮料的材料。当含有本发明化合物，其光学活性物质或其盐的产品被服用时，糖尿病得到改善，在尿中糖的量明显降低。另外，诸如性腺机能减退的并发症被明显改善。而且，高血脂也得到改善。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有改善高血脂的活性或降低血清中总胆固醇的活性，降低血清中甘油三酯的活性和降低血清中游离脂肪酸的活性，当至少一种具有这类活性的选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物被用作有效成分，并通过与已知的药用载体结合而被制成药剂时，就能够生产用于治疗或预防高血脂的药剂。这类药剂可以通过与上述用于糖尿病的治疗或预防药剂相同的方式生产，这类药剂可以通过用于糖尿病的治疗或预防药剂相同的方式给药。另外，本发明化合物，其光学活性物质或其盐被用作改善或预防高血脂的食品或饮料的材料。当含有本发明化合物，其光学活性物质或其盐的产品被服用时，高血脂得到改善，血液中的脂浓度明显降低。

另外，当具有诱导所说的细胞向脂肪细胞的分化能力的本发明化

合物，其光学活性物质或其盐被用作有效成分，并通过与已知的药用载体结合而被制成药剂时，就能够生产用于诱导前体脂肪细胞向脂肪细胞的分化能力的药剂。所述药剂的生产可以通过与上述糖尿病治疗或预防剂相同的方式生产，该药剂可以通过与糖尿病治疗或预防剂情况下相同的方式给药。

而且，本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有抑制肿瘤坏死因子产生的活性，并可用于治疗或预防由肿瘤坏死因子引起的的非胰岛素依赖性糖尿病[Nature, volume 389, p610-614(1997)]。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有抗病毒活性，当至少一种具有这类活性的选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物被用作有效成分，并通过与已知的药用载体结合而被制成药剂时，就能够生产抗病毒剂。抗病毒剂可以通过与上述抗癌剂相同的方式生产，并可以通过与上述药剂相同的方式给药。

抗病毒剂的剂量没有特别限制，但可以根据剂型，给药方法，使用目的，和患者的年龄，体重和症状决定。但是，一般情况下，在制剂中所含的至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物量对于成人为每天 0.1μg 至 20mg/kg。当然，剂量可以随各种因素而变化，因此，少于上述的剂量在一些情况也可能是足够的，而在其他情况下，可能需要比上述大的剂量。本发明的药剂可以就这样口服给药，而且，该药剂可以在加入普通食品和/或饮料之后每天服用。而且，本发明化合物，其光学活性物质或其盐被用作抗病毒的食品或饮料的材料。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐对 DNA 病毒，RNA 病毒，逆转录病毒和类病毒具有抗病毒活性。

因此，它可以用作人类的抗病毒剂，非人类动物的抗病毒剂，如对病毒性疾病有效（例如家畜，家禽和饲养动物如鱼和虾），植物抗病毒剂如抗对农业和园艺产品（例如花和蔬菜）的病毒性疾病，并可用作动物用品的抗病毒剂。

感染动物的 DNA 病毒的例子有痘病毒，疱疹病毒，腺病毒，乙型

肝炎病毒，乳头瘤病毒，多瘤病毒，Epstein-Barr 病毒和杆状病毒，而感染植物的DNA病毒的一个例子是花椰菜花叶病毒。感染动物的RNA病毒的例子有轮状病毒，风疹病毒，日本脑炎病毒，登革病毒，新城疫病毒，麻疹病毒，腮腺炎，温热病毒，流感病毒，水泡性口炎病毒，人脊髓灰质炎病毒，甲型肝炎病毒和丙型肝炎病毒，而感染植物的RNA病毒的例子有烟草花叶病毒，小麦矮化病毒，水稻条叶枯病毒和烟草环斑病毒。逆转录病毒的例子有成年T细胞白血病病毒和人获得性免疫缺损综合征病毒，类病毒的一个例子是马铃薯纺锤块茎类病毒。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐对于治疗和预防非人哺乳动物和禽类如鸡和火鸡，和冷血动物如鱼的病毒性疾病是有效的，这类化合物对于下列非人类病毒具有抗病毒活性。它们是1型sciruid疱疹病毒，1型cavlid疱疹病毒，1型lagomorph疱疹病毒，1型phasianid疱疹病毒，2型phasianid疱疹病毒，1型土耳其疱疹病毒，1型anatid疱疹病毒，1型catfish疱疹病毒，3型equid疱疹病毒，1型bovid疱疹病毒，3型bovid疱疹病毒，4型bovid疱疹病毒，1型porcine疱疹病毒，1型murid疱疹病毒，1型cebid疱疹病毒，2型cebid疱疹病毒，1型tupalid疱疹病毒，1型canine疱疹病毒，1型feline疱疹病毒，1型equid疱疹病毒和2型equid疱疹病毒。

鸟类病毒性疾病如Marek病可以通过在本发明中所用的化合物用兽医或畜牧业已知的方法预防和/或治愈，本发明的抗病毒剂被注射到鸟体内，或加入食品或饮用水中。而且，当用于本发明中的化合物直接加入畜牧区的水池，水罐，储罐，或水，海水，等等中，或与食品混合时，下列疾病可以类似地预防和/或治愈。它们是生活在被疱疹病毒如petite catfish病毒，herpesvirus solomons和nerka病毒感染的狭窄区域如水池，水罐，储罐或畜牧区中鱼的病毒性疾病，其例子有造血器官的传染性坏死病，疱疹病毒的传染病或鲑鳟科鱼胰腺的传染性坏死病，虹鳟鱼的病毒性出血败血症，鲤鱼春季病毒血症，各种鱼的淋巴细胞病，海鱼和回游鱼的红细胞病毒性坏死病，比目鱼等的杆状病毒性疾病，torafugu（一种手套鱼）的口鼻部溃疡。顺便指

出，在施用用于本发明的化合物和本发明的抗病毒剂时，精确的调控自然取决于各种被治疗动物的需要，治疗的类型和饲养员的判断。

施用本发明抗病毒剂的动物能够保持其健康，因而存活率，生长率，产子率等明显改善。

用于本发明中的本发明化合物，其光学活性物质或其盐抑制这些病毒蛋白的合成，并抑制病毒基因组的合成，因此，它显示很强的抗病毒作用。另外，还选择性地杀死被病毒感染的细胞。

例如，即使在患有人免疫缺损病毒（以后缩写为 HIV）感染的患者体内，不是所有的 CD4-阳性细胞都被 HIV 感染，只有一部分被其感染。本发明抗病毒剂抑制在这些细胞中 HIV 的生产，同时，选择性地杀死被感染的细胞，并诱导未感染细胞对病毒的抵抗能力，因而能够从细胞中除去 HIV。

本发明中的本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有改善肝功能的能力和诱导热激蛋白的活性。含有至少一种选自本发明中的本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物的改善肝功能的药剂和诱导热激蛋白的药剂可以通过与上述抗病毒剂情况下相同的方式制成药物制剂，并可通过与上述抗病毒剂情况下相同的方式给药。

改善肝功能的药剂和诱导热激蛋白的药剂剂量没有特别限制，但可以根据剂型，给药方法，使用目的，和患者的年龄，体重和症状决定。但是，一般情况下，在制剂中所含的至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物量对于成人为每天 0.1μg 至 20mg/kg。当然，剂量可以随各种因素而变化，因此，少于上述的剂量在一些情况也可能是足够的，而在其他情况下，可能需要比上述大的剂量。本发明的药剂可以就这样口服给药，而且，该药剂可以在加入普通食品和/或饮料之后每天服用。而且，至少一种本发明化合物，其光学活性物质或其盐被用作改善肝功能或诱导热激蛋白的食品或饮料的材料。

当本发明化合物，其光学活性物质或其盐被服用时，肝功能方面的疾病得到改善，GOT 和 GPT 值变为正常。

而且，本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有诱导热激蛋白70kDa（HSP70）等等的活性，并对RNA病毒和DNA病毒如肝炎病毒，AIDS病毒，流感病毒，水泡型口炎病毒和疱疹病毒具有抗病毒活性。热激蛋白参与癌免疫，这些化合物对于癌免疫有效。而且，本发明化合物具有诸如抗炎活性生物防御活性。当本发明化合物，其光学活性物质或其盐被服用时，诸如流感等病毒性疾病可被预防和治愈。

顺便地说，热激蛋白是当细胞或个体被置于突然的温度变化下，其合成被诱导的蛋白的通名，该温度变化高于正常温度5-10℃，热激蛋白广泛地存在于原核细胞和高真核生物中。已知热激蛋白的例子有HSP90，HSP70，泛素和HSP26。其中，HSP70是一种伴侣蛋白，并且连接在未完成折叠或不完全进行帮助立体结构的形成的蛋白质上。热激蛋白的氨基酸序列在进化过程中被完好保存，HSP70与大肠杆菌的Dnak蛋白完全相同。在人体内，有约10种HSP70基因，它们中的一些被构成表达，而其他通过各种刺激诱导。除热激之外，热激蛋白的合成被各种化学物质诱导和细胞干扰如氧化诱导。

C.Amici报道了[Journal of Virology,volume 68, p6890-6899(1994)]，当被仙台病毒感染的动物细胞在具有α，β-不饱和羰基的前列腺素A_1存在下温育时，HSP70和HSP90的合成被诱导，在HSP70的合成被诱导期间，病毒蛋白的合成被抑制。而且，A.Rossi,et al.报道了[The Journal of Biological Chemistry, volume 271,p32192-32196(1996)],与前列腺素A_1的情况类似，2-环戊烯-1-酮诱导HSP70的合成并抑制水泡型口炎病毒蛋白的合成。

本发明化合物诱导HSP70的能力在10μM被记录到，在20-30μM变为最大，这与2-环戊烯-1-酮诱导HSP70需要几百μM相比，可以说是很高的诱导能力。

因为本发明化合物，其光学活性物质或其盐对热激蛋白具有这么高的诱导能力，所以它们对DNA病毒，RNA病毒，逆转录病毒和类病毒具有抗病毒活性。这类病毒和类病毒的例子是在上面提到的那些。

另外，本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有抑制被癌症基

因转化的癌细胞生长的活性，并具有预防由于癌症基因引起的肿瘤生成活性。

例如，乳头瘤病毒是属于乳多空病毒科和乳头瘤病毒属的 DNA 病毒，对于人乳头瘤病毒（HPV），作为宫颈癌病因的 16 型 HPV 是已知的。本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有抑制由 HPV16 型癌症基因 E7 产生癌变的细胞生长活性。因此，由病毒产生癌变的癌细胞生长的抑制剂可以通过用至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物作为有效成分而提供，从而预防由癌症基因产生的癌变。

顺便地说，本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有在作为引发剂和促进剂两个阶段抑制肿瘤生成的活性，因而能够提供含有至少一种选自上述化合物的化合物作为有效成分，对化学癌变的抑制剂。

因此，能够提供含有至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐，用于预防肿瘤生成的食品或饮料。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有抑制 IgE 生产和迟发型过敏反应的活性，当至少一种选自上述化合物的化合物被用作有效成分，并与已知的药用载体结合制成药物制剂时，可以生产抗过敏剂。所述制剂的生产可以通过与上述抗癌剂相同的方式进行。顺便地说，本发明的抗过敏剂可以通过依赖于剂型的适当途径给药。给药途径没有特别限制，并可通过口服或外用手段或注射进行。例如，片剂，丸剂，粒剂，稀释的粉剂，液体，悬浮液，糖浆和胶囊可被口服给药。注射可以，例如，静脉内，肌内，皮下或皮内给药。栓剂可以直肠给药。也可以制备含水或不含水的滴眼药，对眼睛给药的滴眼药的例子有眼膏，涂液，喷剂和附着剂。对于吸入剂，在普通药用载体中的有效成分的溶液或悬浮液被使用，例如，被用作气雾剂。也可以使干燥和粉末状的有效成分用吸入器，或使成分可以直接与肺接触的类似装置给药。

作为抗过敏剂的剂量没有特别限制，但可以根据剂型，给药方法，使用目的，和患者的年龄，体重和症状决定。但是，一般情况下，在

制剂中所含的至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物量对于成人为每天 10pg 至 50mg/kg。当然，剂量可以随各种因素而变化，因此，少于上述的剂量在一些情况也可能是足够的，而在其他情况下，可能需要比上述大的剂量。本发明的药剂可以就这样口服给药，而且，该药剂可以在加入普通食品和/或饮料之后每天服用。

含有至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质或其盐的化合物被用作有效成分，用于抑制 IgE 生产和迟发型过敏反应的药剂可以通过与上述抗过敏剂情况相同的方式制成药物制剂，并可通过与上述抗过敏剂情况相同的方式给药。

而且，本发明化合物，其光学活性物质或其盐可以用作抗过敏食品或饮料的材料。当本发明化合物，其光学活性物质或其盐被服用时，由 IgE 生产和迟发型过敏反应引起的病症可被明显改善，另外，所述化合物对所述疾病具有显著的预防活性。

本发明抗过敏剂抑制 IgE 生产，并且对于改善和/或治疗由 IgE 生产介导或恶化引起的疾病如由 IgE 引起的过敏性疾病，包括支气管哮喘，过敏性鼻炎，特应性皮炎，过敏性结膜炎，寻麻疹和过敏性休克非常有用。它们也抑制迟发型过敏反应，并可用于治疗和预防伴随迟发型过敏反应的疾病，如接触型过敏反应，过敏性接触皮炎，细菌性过敏，真菌性过敏，病毒性过敏，药物过敏，甲状腺炎和过敏性脑炎。

本发明化合物，其光学活性物质或其盐具有生理活性，如抗癌活性，抑制癌细胞生长的活性，细胞凋亡诱导活性，拓扑异构酶 II 抑制活性，癌细胞分化诱导活性，抗风湿活性，慢性关节风湿症抑制活性，诱导 Fas 抗原产生的活性，抗菌活性，抗病毒活性，改善肝功能的活性，诱导热激蛋白的活性，使血液成分正常化的活性，癌症免疫力增强活性，抗炎活性，肿瘤坏死因子生产抑制活性，一氧化氮生产抑制活性，免疫调制活性如迟发型过敏反应的抑制活性，淋巴细胞转移抑制活性，混合的淋巴细胞反应抑制活性，IgE 生产抑制活性和角叉藻聚糖水肿抑制活性，由于这些活性，含有作为有效成分的至少一种选

自本发明化合物，其光学活性物质和其盐的化合物的食品和饮料可以作为具有上述各种生理活性的功能食品或功能饮料。

顺便地说，在生产本发明的食品或饮料时，可以使用含有环戊烯酮的热处理的产品，或从所说的热处理产品得到的部分纯化的环戊烯酮或纯化的环戊烯酮，和含有 SH 基团的化合物，在生产阶段所生产的本发明化合物可被使用。

因此，至少一种选自本发明化合物（选自含有环戊烯酮的热处理产品和从热处理的产品部分纯化的环戊烯酮和纯化的环戊烯酮的原料与含有 SH 基团的化合物的反应产物），其光学活性物质或其盐含于其中，稀释于其中和/或加入其中的食品或饮料被本发明的食品或饮料包括。

生产本发明食品或饮料的方法没有特别限制，但是，生产食品或饮料的烹调，加工或常用生产方法可被用于提供含有有效量的至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质和其盐的化合物的食品和饮料。

在生产食品或饮料时，热处理可以在任何阶段进行，使环戊烯酮含于热处理产物中，接着与具有 SH 基团的化合物反应，或者，含有本发明化合物的热处理物质可被加入其中。也可以将食品，饮料或其原料加入含有本发明化合物的热处理物质中，使本发明化合物在所说的热处理的产品中被稀释。加入可以一次或分为多次进行。因此，具有新生理活性的食品或饮料可以容易和方便地生产。

本发明食品或饮料的形态没有特别限制，只要至少一种选自本发明化合物，其光学活性物质和其盐，具有诸如抗癌活性，抗菌活性，细胞凋亡诱导活性，抗病毒活性和改善肝功能活性的化合物被含于其中，加入和/或稀释于其中。因此，其形态包括可以口服的形态，如片，粒，胶囊，凝胶和溶胶。

本发明食品或饮料含有具有生理活性的本发明化合物，其光学活性物质和其盐，由于所述化合物的各种生理活性，如抗癌活性，抗菌活性，细胞凋亡诱导活性，抗病毒活性和改善肝功能活性，因此它们

是具有肿瘤生成-预防和癌症抑制作用，也有症状改善作用，对于对本发明化合物，其光学活性物质和其盐敏感的疾病如病毒性疾病，糖尿病，风湿病，过敏和自身免疫疾病的预防作用，或肝功能改善作用的健康食品或饮料，而且，它们是可用于保持活体强壮，或特别用于保持胃和器皿健康。另外，用于其抗菌活性，它们是具有非常好的防腐性的食品或饮料。

即使当足以达到那些生理活性的剂量被给药时，本发明化合物，其光学活性物质和其盐也没有被观察到毒性。例如在口服给药的情况下，一次口服给药 1000mg/kg 式[VII]，[VIII]，[IX]和[X]表示的任何化合物以及光学活性物质和其盐，也没有观察到大鼠死亡的情况。

因此，因为其各种生理功能，本发明化合物，其光学活性物质和其盐在药物，食品，饮料等广泛的领域是非常有用的化合物。这类本发明化合物甚至可以在食品或饮料中作为环戊烯酮与具有 SH 基团的化合物如含有 SH 的氨基酸和其衍生物，包括含半胱氨酸的氨基酸衍生物的反应产物被生产，这些人工生产的化合物的应用也被本发明包括。

实施例

本发明将由下列实施例进一步举例说明，但本发明根本不限于这些实施例。顺便地说，用于实施例中的“%”代表“重量%”。

参考实施例 1

将 D-葡糖醛酸（G 5269; Sigma 生产）（10g）溶于 1 升水中，在 121℃加热四小时并真空浓缩至约 10ml。将其与 40ml 3: 2: 2 的乙酸丁酯，乙酸和水混合物的上层混合，离心，将产生的上层清液真空浓缩至约 10ml。

将上述萃取液置于硅胶（BW-300SP; 2×28cm; Fuji Silicia 生产）上进行柱色谱，用 3: 2: 2 的乙酸丁酯，乙酸和水混合物的上层作洗脱剂分离，流速为约 5ml/分钟，用压缩机提供 0.2kg/cm^2 的压力。

将流出液分为一级分 10ml 体积，各级分的一部分通过薄层色谱进行分析，高纯度的环戊烯酮包含在 61 号至 80 号级分内。将这些级分收集，真空浓缩，用 40ml 氯仿萃取，将萃取液真空浓缩给出 100mg 环戊烯酮。

将级分通过正相 HPLC 用 Palpack 型 S 柱（Takara Shuzo 生产）分离，当用在 215nm 的紫外吸收检测时，发现纯度为 98%。

将上述环戊烯酮（113.9mg）溶于 2.85ml 乙醇，将该乙醇溶液加入己烷/乙醇(94/6)中制备环戊烯酮溶液(17mg/ml)。将其通过 0.5μm 滤纸过滤制备进行光学拆分 HPLC 的样品溶液。

将此样品溶液进行光学拆分 HPLC，将在前峰中的(-)-环戊烯酮和在后峰中的(+)-环戊烯酮的各级分收集并真空蒸发至干，给出 43.2mg (-)-环戊烯酮和 43.0mg (+)-环戊烯酮。

光学拆分 HPLC 的条件。

柱: Chiral Pack AS（由 Daicel 生产）2.0cm×25.0cm

柱温: 40℃

流动相: 己烷/乙醇（94/6）

流速: 14.0ml/分钟

检测: UV 210nm

上样量: 150μl(2.55mg)

这里所得的各个(-)-环戊烯酮和(+)-环戊烯酮含有约 1%的对映体，因此，它们在上述条件下再进行光学拆分。结果，从 30.0mg 前峰中的(-)-环戊烯酮得到 19.7mg 不含对映体的(-)-环戊烯酮，并从 37.4mg 在后峰中的(+)-环戊烯酮得到 27.7mg 不含对映体的(+)-环戊烯酮。顺便地说，在(-)-环戊烯酮和(+)-环戊烯酮的光学拆分 HPLC 中的洗脱时间分别为 33 分钟和 40 分钟。

实施例 1

（1）将环戊烯酮水溶液（1M）（100μl）和用氢氧化钠调节至 pH 4 的 100μl 1M L-半胱氨酸盐酸盐（Nacalai Tesque 生产; 103-13）

混合，并在60℃反应16小时。将反应混合物通过0.5μm Cosmo Nice Filter（Nacalai Tesque生产；440-84），将滤液用Capsule Pack Column C_{18} SG120（6mm×250mm；Shiseido生产）进行HPLC，用0.1%三氟乙酸（Nacalai Tesque生产；349-01）水溶液作流动相，流速为0.5ml/分钟，在210nm进行吸光度检测，在19.1分钟和19.5分钟记录到主峰。将其分级并浓缩至干，分离非对映体，即CM1（19.1分钟）和CM2（19.5分钟）。

（2）环戊烯酮与L-半胱氨酸反应产物的结构

在实施例1-(1)中分离出的CM1和CM2的质谱分析用质谱仪DX302(Nippon Denshi生产)进行。将它们溶于DCl在重水中的0.1N溶液，其结构通过核磁共振(NMR)分析。所用的核磁共振仪是JNM-A500（Nippon Denshi生产）。紫外(UV)吸收光谱用UV-2500光谱仪（Shimadzu生产）测量。结果在下面给出。

CM1

FAB-MS m/z 218$[M+H]^+$

甘油被用作基质。

^{1}H-NMR

δ2.32（1H，dd，J=20.0，1.5Hz，5-H）、2.89（1H，dd，J=20.0，6.0Hz，5-H）、3.01（1H，dd，J=15.0，7.0Hz，1'-H）、3.09（1H，dd，J=15.0，4.5Hz，1'-H）、4.01（1H，m，4-H）、4.16（1H，dd，J=7.0，4.5Hz，2'-H）、6.49（1H，d，J=3.0Hz，3-H）

UV：λ_{max} nm 250nm（水）

CM2

FAB-MS m/z 218$[M+H]^+$

甘油被用作基质。

^{1}H-NMR

δ2.31(1H, dd, J=20.0, 1.5Hz, 5-H)、2.87(1H, dd, J=20.0, 6.0Hz, 5-H)、3.01(1H, dd, J=15.0, 6.5Hz, 1'-H)、3.11(1H, dd, J=15.0, 4.5Hz, 1'-H)、4.00(1H, m, 4-H)、4.20(1H, dd, J=6.5, 4.5Hz, 2'-H)、6.46(1H, d, J=3.0Hz, 3-H)

在上面,^{1}H-NMR的化学位移值以HOD的值被定义为4.65ppm为基础表达。

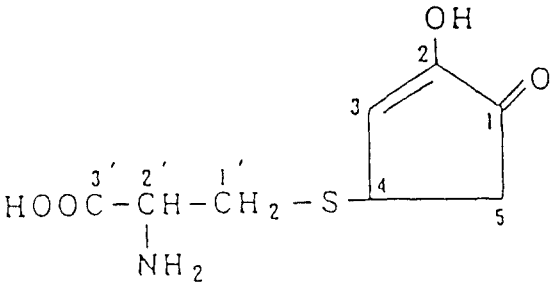
而且,CM1被溶于DC1在重水中的0.1N溶液中,^{13}C-NMR用JNM-A500测量。

^{13}C-NMR

δ30.3(1'-C), 39.4(4-C), 42.0(5-C), 53.4(2'-C), 132.8(3-C), 154.6(2-C), 171.1(3'-C), 205.5(1-C)

在上面,^{13}C-NMR的化学位移值以二噁烷的值被定义为67.4ppm为基础表达。

顺便地说,^{1}H-NMR和^{13}C-NMR峰的归属序号在式[VII]中显示。



【VII】

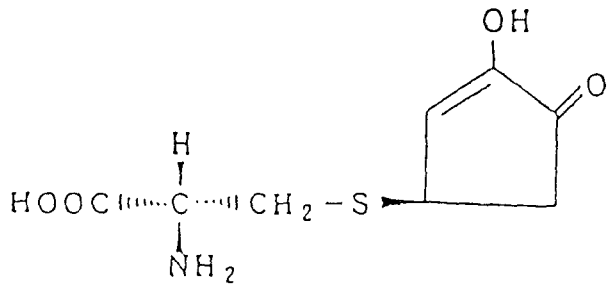
然后,等量CM1和CM2混合物(以后称为CM)的红外(IR)吸收光谱用红外光谱仪(FTIR-8000PC;由Shimadzu生产)。结果如下。

IR

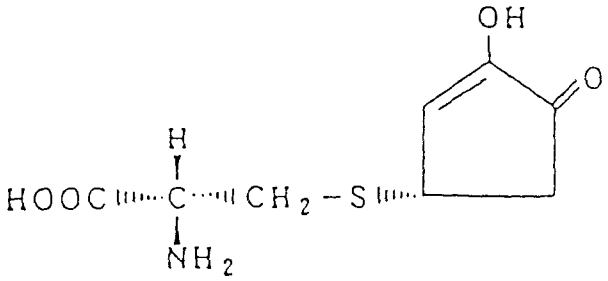
ν^{Kbr}_{max} cm^{-1} 3000, 1075, 1625, 1201.

应用漫射反射法。

从这些数据可以清楚地看出，CM1 和 CM2 之一具有结构[VIII]，而另一个具有结构[IX]。



【Ⅷ】



【Ⅸ】

附图 1 给出了 CM1 的质谱；附图 2 给出了 CM1 的 ^{1}H-NMR 谱；附图 3 给出了 CM1 的 UV 吸收光谱；附图 4 给出了 CM1 的 ^{13}C-NMR 谱；而附图 6 给出了 CM1 的 IR 吸收光谱。在附图 1 中，横坐标表示 m/z 值，而纵坐标表示相对强度（%）。在附图 2，4 和 5 中，横坐标表示化学位移值（ppm），而纵坐标表示信号强度。在附图 3 中，横坐标表示波长（nm），而纵坐标表示吸光度。在附图 6 中，横坐标表示波数（cm^{-1}），而纵坐标表示透光率。

实施例 2

（1）将环戊烯酮水溶液（1M）（100μl）和 500μl 200mM 谷胱甘肽（还原型；由 Nacalai Tesque 生产；170-10）（pH 3.0）混合，并在 60℃反应 5 小时。将反应溶液通过 0.5μm Cosmo Nice Filter 过滤，将滤液在下列条件下用 HPLC 分离。

柱：TSK gel ODS-80Ts（5μm），20mm × 25cm；

流动相：A 0.1%TFA

B 0.1%TFA/50%乙腈水溶液

流速: 7.5ml/分钟

梯度: 流动相A进行10分钟→在55分钟期间从流动相A至A: B=1: 1→在15分钟期间从A: B=1: 1至流动相B

检测: 在220nm的吸光度

将上述反应溶液(200μl)进行HPLC, 收集停留时间为35.7分钟和36.1分钟的峰, 真空将它们分别浓缩至干分离出两种非对映体, 即GM1和GM2。GM1的产量为2.5mg,而GM2的产量为3.0mg。

附图7给出了其色谱。附图7显示了停留时间和吸收之间的关系, 其中横坐标表示停留时间(分钟), 而纵坐标表示在220nm的吸光度。

(2)对在实施例2-(1)中制备的等量GM1和GM2混合物(以后称为GM)的结构进行分析。核磁共振(NMR)用JNM-A500(由Nippon Denshi生产)测量; 质谱(MS)用DX302质谱仪(由Nippon Denshi生产)测量。紫外(UV)吸收光谱用UV-2500光谱仪(由Shimadzu生产)测量。红外(IR)吸收光谱用FTIR-8000PC红外分光光度计(由Shimadzu生产)测量。结果在下面给出。

^{1}H-NMR

δ2.09(2H, m, 5'-H), 2.28(1H, dd, J=13.0, 20.0Hz, 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, 6.0Hz, 5-H), 2.92或2.95(1H, dd, J=1.0, 5.5Hz, 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=3.0Hz, 3-H)

将样品溶于DCl在重水中的0.1N溶液中, 化学位移值以HOD的值被定义为4.65ppm为基础表达。

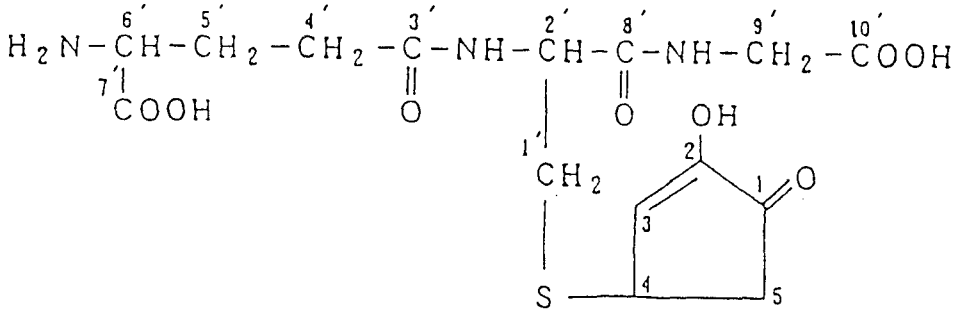
^{13}C-NMR

δ26.3(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)

将样品溶于DC1在重水中的0.1N溶液中，化学位移值以二噁烷的值被定义为67.4ppm为基础表达。

顺便地说，^{1}H-NMR和^{13}C-NMR峰的归属序号在式[X]中显示。



【X】

FAB-MS m/z 404$[M+H]^{+}$，426$[M+Na]^{+}$

甘油被用作基质。

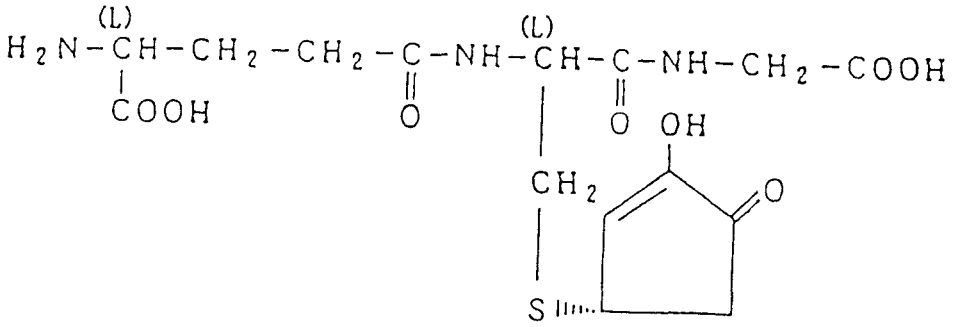
UV λ_{max} 251nm(水)

IR ν^{KBr}_{max} cm^{-1} 2949，1710，1660，1539，1404，1203

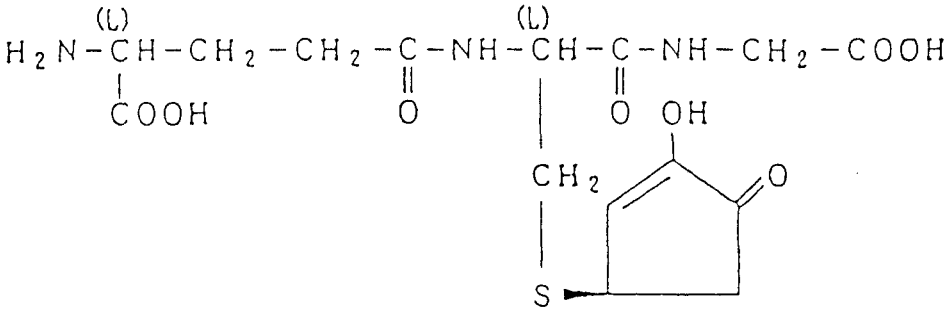
使用漫射反射法。

结果示于附图8-12中。附图8给出了GM的1的^{1}H-NMR谱，其中横坐标表示化学位移值(ppm)，而纵坐标表示信号强度；附图9给出了GM的^{13}C-NMR，其中横坐标表示化学位移值(ppm)，而纵坐标表示信号强度；附图10给出了GM的质谱，其中横坐标表示m/z值，而纵坐标表示相对强度(%)；附图11给出了GM的UV吸收光谱其中横坐标表示波长(nm)，而纵坐标表示吸收；附图12给出了GM的IR吸收光谱，其中横坐标表示波数(cm^{-1})，而纵坐标表示透光率(%)。

从上述结果可以清楚地看出，GM1和GM2是2-羟基-4-谷胱甘肽-S-基-2-环戊烯-1-酮的非对映体，其中之一具有[XI]所示的结构，而另一个具有[XII]所示的结构。



【XI】



【XII】

实施例 3

（1）将环戊烯酮和 L-半胱氨酸盐酸盐（Nacalai Tesque 生产；103-13）溶于磷酸缓冲盐水溶液（pH 7.2），使其浓度各自为 10mM，接着在 37℃反应 30 分钟。将反应混合物通过 0.5μm Cosmo Nice Filter（Nacalai Tesque 生产；440-84）过滤，将滤液进行 HPLC，用 0.1%三氟乙酸（Nacalai Tesque 生产；349-01）水溶液作流动相，流速为 1ml/分钟，用 TSK gel ODS-80Ts(4.6mm × 250mm；由 Tosoh 生产)，在 210nm 进行吸光度检测，环戊烯酮和 L-半胱氨酸的峰减弱，主峰在 4.0 分钟，4.3 分钟新出现。

结果示于附图 13 中，附图 13 给出了洗脱时间和在 210nm 吸收之间的关系，其中横坐标表示洗脱时间（分钟），而纵坐标表示在 210nm 的吸光度。

顺便地说，在附图 13 中，3.1 分钟是 L-半胱氨酸的洗脱位置，而 4.9 分钟是环戊烯酮的洗脱位置。

（2）将环戊烯酮和 L-半胱氨酸盐酸盐溶于磷酸缓冲剂盐水溶液

（pH 7.2），使其浓度各自为 100μM，在 215nm 吸光度的变化在 37℃，以间隔的时间，用 UV-2200 分光光度计（Shimadzu 生产）测量。结果，在间隔的反应时间内吸收减弱，500 秒后，接近恒定。结果示于附图 14 中。附图 14 给出了用 L-半胱氨酸时，反应时间和 215nm 吸光度之间的关系，其中横坐标表示反应时间（秒），而纵坐标表示 215nm 吸光度。

当用谷胱甘肽（还原型；Nacalai Tesque 生产；170-10）代替 L-半胱氨酸盐酸盐进行相同的操作时，在间隔的反应时间内 215nm 吸光度减弱，2000 秒后，接近恒定。结果示于附图 15 中。附图 15 给出了用谷胱甘肽时，反应时间和 215nm 吸光度之间的关系，其中横坐标表示反应时间（秒），而纵坐标表示 215nm 吸光度。

(3) 将环戊烯酮和 L-半胱氨酸盐酸盐溶于磷酸缓冲剂盐水溶液（pH 7.2），使其浓度各自为 10mM，接着在 37℃反应 30 分钟。将反应混合物通过 0.5μm Cosmo Nice Filter 过滤，将滤液用 TSK gel ODS-80Ts(4.6mm × 250mm;Tosoh 生产)和 API300（PE SCIEX 生产）进行高效液相色谱分析，用 0.1%乙酸水溶液作流动相，流速为 1ml/分钟。质谱分析以正例子型进行。结果，观察到 m/z=236.1$[M+H]^+$的信号，由反应新生产的物质的分子量为 235。

结果示于附图 16 和附图 17 中，附图 16 给出了本发明实施例之一的反应产物的色谱，其中横坐标表示停留时间（分钟），而纵坐标表示总离子强度（相对值）。附图 17 给出了在附图 16 中 2.99 分钟洗脱级分的质谱，其中横坐标表示 m/z，而纵坐标表示离子强度（相对值）。顺便地说，在附图 16 中 3.15 分钟和 3.24 分钟洗脱的级分的质谱中，也观察到 m/z=236.1$[M+H]^+$的信号。

（4）将环戊烯酮和 L-半胱氨酸盐酸盐溶于磷酸缓冲剂盐水溶液（pH 7.2），使其浓度各自为 100μM，在 37℃反应 50 分钟。反应之前和之后的紫外吸收光谱用 UV-2200 分光光度计（Shimadzu 生产）测量。

结果示于附图 18 和 19 中。附图 18 给出了溶解后，立即测量的反

应溶液的紫外吸收光谱，而附图 19 给出了反应 50 分钟后反应溶液的紫外吸收光谱。在附图 18 和 19 中，横坐标表示波长（nm），而纵坐标表示吸光度。

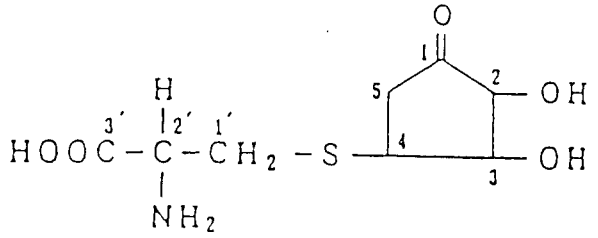
用谷胱甘肽代替 L-半胱氨酸盐酸盐进行相同的操作。结果示于附图 20 和 21 中，附图 20 给出了用谷胱甘肽溶解后时，立即测量的反应溶液的紫外吸收光谱，而附图 21 给出了用谷胱甘肽反应 50 分钟后反应溶液的紫外吸收光谱。在附图 20 和 21 中，横坐标表示波长（nm），而纵坐标表示吸光度。

（5）将 1.4M 环戊烯酮在重水中的溶液（60μl），80μl 1M L-半胱氨酸在重水和用 160μl 重水制备的磷酸缓冲剂盐水溶液（pH 7.2）中的 1M 溶液混合，在 37℃反应 3 小时。用 JNM-A500（Nippon Denshi 生产）测量反应溶液的 ^{13}C-核磁共振（NMR）谱。结果如下:

$^{13}C-NMR$

δ 33附近（1'－C），43附近（4－C和5－C），55附近（2'－C），75附近和78附近（3－C），80附近和81附近（2－C），173附近（3'－C），215附近和217附近（1－C）

顺便地说，^{13}C-NMR 峰的归属序号在式[XIII]中显示。



【XIII】

此反应产物的 ^{13}C-NMR 示于附图 22，在附图 22 中，横坐标表示化学位移值（ppm），而纵坐标表示信号强度。

因为在此反应中的产物是四种非对映体的混合物，对于每个碳原子最多有四个信号，在此反应溶液中产生的反应产物的化学结构是上式[IX]举例说明的环戊烯酮硫代衍生物。

结果，显而易见的是，通过环戊烯酮与半胱氨酸反应产生的，具有附图 13 的 4.0-4.3 分钟洗脱时间峰的反应产物的化学结构是上式[IX]表示的环戊烯酮硫代衍生物。所说的具有 4.0-4.3 分钟洗脱时间

峰的反应产物被分级给出上式[IX]表示的环戊烯酮硫代衍生物（以后称为 CD）。

实施例 4

（1）将环戊烯酮水溶液（1.4M）（60μl）和 600μl 200mM 谷胱甘肽（还原型; Nacalai Tesque 生产; 170-10）（用氢氧化钠调节至 pH 7.0）和 1340μl 磷酸缓冲剂盐水溶液（pH 7.2）混合，并在 37℃反应 1 小时。将反应溶液（700μl）通过 0.5μm Cosmo Nice Filter 过滤，环戊烯酮与谷胱甘肽的反应产物（以后称为 GD1）在下列条件下用 HPLC 分离。

柱: TSK gel ODS-80Ts（5μm）,20mm × 25cm（Tosoh 生产）;

流动相: A -0.1%三氟乙酸(TFA;Merck 生产; 8262);B-0.1%TFA/50%乙腈水溶液（Nacalai Tesque 生产; 004-30）

流速: 9ml/分钟

梯度: 流动相 A 进行 40 分钟→在 40 分钟期间从流动相 A 至 B→然后流动相 B

检测: 在 220nm 吸光度

将上述反应溶液（500μl）进行 HPLC，将停留时间为 27.7 分钟的峰分级，冻干分离出 5mg GD。

附图 23 给出了其色谱。附图 23 显示了停留时间和吸光度之间的关系，其中横坐标表示停留时间（分钟），而纵坐标表示在 220nm 的吸光度。

（2）对在实施例 4-（1）中制备的 GD1 的结构进行分析。核磁共振（NMR）用 JNM-A500（Nippon Denshi 生产）测量; 质谱（MS）用 DX302 质谱仪(Nippon Denshi 生产)测量。紫外(UV)吸收光谱用 UV-2500 光谱仪（Shimadzu 生产）测量。红外（IR）吸收光谱用 FTIR-8000PC 红外分光光度计（Shimadzu 生产）测量。结果在下面给出。

^{1}H－NMR

δ2.07（2H, m, 5'－H）, 2.17（1H, d－t, J＝20.0,

11.0Hz，5-H)，2.45(2H，m，4'-H)，2.88(1H，m，1'-H)，2.95(1H，m，5-H)，3.08(1H，m，1'-H)，3.19(1H，m，4-H)，3.76(1H，m，3-H)，3.86(3H，m，6'-H，9'-H)，4.09(1H，d，J=10.5Hz，2-H)，4.49(1H，m，2'-H)

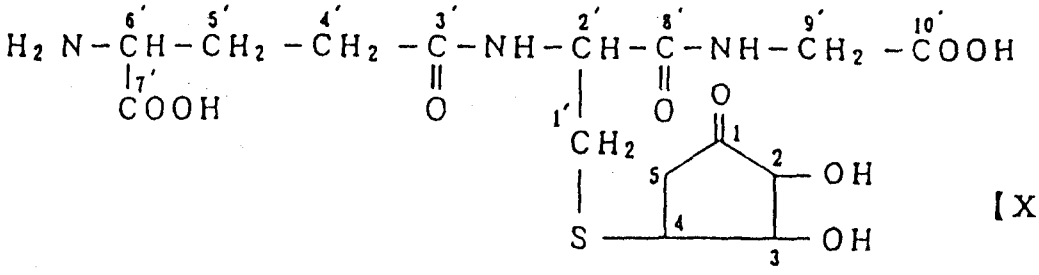
将样品溶于重水中，化学位移值以HOD的值被定义为4.65ppm为基础表达。

^{13}C-NMR

δ26.4(5'-C)，31.7(4'-C)，33.3(1'-C)，41.9(9'-C)，42.4或42.6(4-C)，42.8(5-C)，53.4(6'-C)，54.1(2'-C)，79.4或79.6(3-C)，81.1(2-C)，173附近(3'-C，7'-C，8'-C，10'-C)，214.9(1-C)

将样品溶于重水中，化学位移值以二噁烷的值被定义为67.4ppm为基础表达。

顺便地说，^{1}H-NMR和^{13}C-NMR峰的归属序号在式[XIV]中显示。



【XIV】

FAB-MS m/z 422$[M+H]^+$

甘油被用作基质。

UV: **末端吸收**

IR

ν^{KBr}_{max} cm^{-1} 3275，1749，1654，1541，1203，1145

使用漫射反射法。

结果示于附图 24-27 中。附图 24 给出了 GD 的 ^{1}H-NMR 谱，其中横坐标表示化学位移值（ppm），而纵坐标表示信号强度；附图 25 给出了 GD 的 ^{13}C-NMR，其中横坐标表示化学位移值（ppm），而纵坐标表示信号强度；附图 26 给出了 GD 的质谱，其中横坐标表示 m/z 值，而纵坐标表示相对强度（%）；附图 27 给出了 GD 的 IR 吸收光谱，其中横坐标表示波数（cm^{-1}），而纵坐标表示透光率（%）。

从上述结果可以清楚地看出，GD 是如上[X]所示的 2，3-二羟基-4-谷胱甘肽-S-基-环戊烯酮。顺便地说，GD 是四种非对映体的混合物，从 GD 分离出各个非对映体。

实施例 5

（1）将 0.5ml 0.2mM CM，0.8mM CM 或 1.6mM CM 各 0.5ml 加入 4.5ml 含有 10%胎牛血清和 2.5×10^{5} HL-60 细胞（前髓细胞白血病细胞）(ATCC CCL-240)的 PRMI 培养基中，在 5%二氧化碳气体存在下并在 37℃温育 24 小时，或温育 48 小时，测量存活细胞的数量。

结果，CM 具有很强的癌细胞生长抑制活性。另外，在各个细胞-生长抑制浓度下，检测在细胞中的细胞凋亡体。

结果示于附图 28 中，附图 28 给出了所加样品的浓度（即培养基中 CM 的浓度）与存活细胞数之间的关系，其中横坐标表示 CM 的浓度，而纵坐标表示在 5ml 培养液中存活细胞数（$\times10^{5}$/5ml）。在附图 28 中，正方形（□）表示其中 CM 被加入接着培养 24 小时的情况；黑正方形（■）表示其中 CM 被加入接着培养 48 小时的情况；三角形（Δ）表示其中没有样品被加入，接着培养 24 小时的情况；黑三角形（▲）表示其中没有样品被加入，接着培养 48 小时的情况。

(2)往 96-孔培养板的各个孔中加入 8，40，200 或 1000μM GM 的水溶液或 10μl 水作对照。将 HL-60(ATCC CCL-240)悬浮于含有 10%胎牛血清的 PRMI 培养基中，使其浓度为 5×10^{4} 细胞/ml，将其各 90μl 放入上述培养板的各个孔中，并在 5%二氧化碳气体存在下在 37℃温育 48

小时。加入 10μl 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物(MTT;由 Sigma 生产)在磷酸缓冲的盐水溶液中的溶液(5mg/ml)超过四小时后,在显微镜下观察细胞的生长情况。再加入 100μl 含有 0.04N 盐酸的 2-丙醇,接着搅拌,测量在 590nm 的吸光度。

结果,在其中 40μM GM 被加入(最终浓度:4.0μM)的情况下没有检测到细胞生长。因此,可以清楚地看出,在 4.0μM 的浓度下,GM 完全抑制 HL-60 细胞的生长。同时,在各个细胞-生长-抑制浓度,细胞凋亡体在细胞中形成。

(3)往 96-孔培养板的各个孔中加入 100,200 或 400μM GM 或 CM 的水溶液或 10μl 水作对照,并通过与在实施例 5-(2)中所述相同的方法测量 HL-60 的生长抑制活性。但是,细胞生长程度以加入样品部分与加入水部分(对照)在 590nm 的吸光度比例(%)表达。结果在表 1 中给出。

表 1

	GM	CM
40μM	3.2	2.8
20μM	1.8	16.1
10μM	14.8	48.9

(4)将在 37℃在含有 10%胎牛血清(Gibco 生产)的 PRMI1640 培养基(Nissui 生产)中温育的,在 56℃处理 30 分钟的 HL-60(ATCC CCL-240)悬浮于上述培养基中,使其浓度为 2.5×10^5 细胞/4.5ml。往此悬浮液中加入 0.5ml 100μM 的 GM 水溶液(最终浓度:10μM),接着在 5%二氧化碳气体存在下在 37℃温育 24 小时,48 小时和 72 小时。

将温育过的细胞用锥虫蓝染色,将存活细胞和死亡细胞计数,加入 10μM 的 GM 部分与加入水的对照相比,存活细胞数和细胞存活率明显降低。当培养过的细胞在光学显微镜下观察时,检测到核聚集作用,细胞大小减小和细胞凋亡体的产生。而且,从细胞中提取 DNA 并进行琼脂糖

凝胶电泳,观察到 DNA 裂解为染色质单位。顺便地说,在加入水的对照中没有观察到这类现象。

结果示于附图 29 中,附图 29 给出了当 10μM GM 被加入 HL-60 的培养液中时,温育时间与培养液中存活细胞数之间的关系,其中横坐标表示温育时间(小时),而纵坐标表示在培养液中存活细胞数($\times 10^5$/5ml)。在附图 29 中,正方形(□)表示其中 10μl GM 被加入的情况;圆圈(○)表示加入水的对照。

(5)往 96-孔培养板的各个孔中加入 4.12,12.3,37.0,111,333 或 1000μM GD 的水溶液或 10μl 水作对照。将 HL-60(ATCC CCL-240)悬浮于含有 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,使其浓度为 5×10^4 细胞/ml,将其各 90μl 放入上述培养板的各个孔中,并在 5%二氧化碳气体存在下在 37℃温育 48 小时。加入 10μl 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物(MTT;由 Sigma 生产)在磷酸缓冲的盐水溶液中的溶液(5mg/ml)超过四小时后,在显微镜下观察细胞的生长情况。同时,再加入 100μl 含有 0.04N 盐酸的 2-丙醇,接着搅拌,测量在 590nm 的吸光度。

结果,在其中 37.0μM GD 被加入(最终浓度:3.70μM)的情况下没有检测到细胞生长。因此,可以清楚地看出,在 3.70μM 的浓度下,GD 完全抑制 HL-60 细胞的生长。同时,在各个细胞-生长-抑制浓度,细胞凋亡体在细胞中形成。

(6)将环戊烯酮和 L-半胱氨酸盐酸盐溶于磷酸缓冲剂盐水溶液(pH 7.2),使其浓度分别为 55mM 和 80mM,在 37℃,pH 7.2 反应 15 分钟。将一部分反应溶液通过逆相 HPLC 用 TSK gel ODS-80Ts (5μm),20mm×25cm(由 Tosoh 生产)柱;流速 1ml/分钟用 0.1%三氟乙酸水溶液作流动相进行分析,没有检测到环戊烯酮。

癌细胞生长抑制活性用 100,200 或 400μMGD 或 CD 水溶液,以与实施例 5-(4)相同的方法测量。但是,细胞生长程度以加入样品部分与加入水部分(对照)在 590nm 的吸收比例(%)表达。结果在表 2 中给出。

表 2

	GD	CD
40μM	2.1	5.3
20μM	5.8	56.2
10μM	47.2	89.0

如表 2 所示,GD 和 CD 具有癌细胞生长抑制活性。细胞凋亡体在各个浓度在细胞中产生,使得细胞生长被抑制。

因此,如实施例 5 所示,各个化合物都显示癌细胞生长抑制活性和细胞凋亡诱导活性。各个非对映体也显示相同的作用。

实施例 6

将 GM 用生理盐水溶液稀释至预定浓度并进行如下试验。

(1) 将 Meth A 细胞(2×10^6细胞/小鼠)皮下注射到八周的雌性 BALB/c 小鼠(体重:约 20g)的腹部。然后,将 GM(5mg/kg/天)连续五天皮下注射到相同位点。另一方面,以相同方式将生理盐水溶液皮下注射到对照组。两周后,在小鼠腹部产生的癌组织被剥离,测量其重量。与对照组相比,施用 GM 的组显示出对癌症生长明显的抑制作用。CM,CD 和 GD 也给出相似的结果。

(2) 将小鼠白血病 P-388(1.1×10^6细胞/小鼠)腹膜内注射到七周的雌性 DBA/2 小鼠(体重:约 20g)。然后,将 GM,CM,GD 或 CD(10mg/kg/天)连续五天腹膜内注射。同时,以相同方式将生理盐水溶液腹膜内注射到对照组。在各自由八只小鼠组成的两组中,计算平均存活天数和小鼠的长寿率。与对照组相比,各个施用样品的组的平均存活天数被延长,证明有明显的长寿作用。用肉瘤-180/ICR 小鼠,IMC/CDF1 小鼠和 EAC/DDY 小鼠也给出相同的延长寿命作用。

因此,如上述实施例 6 所示,GM,CM,GD 或 CD 显示出抗癌作用。各个非对映体也显示出相同结果。

实施例 7

将 Bacillus Subtilis IFO 3021 在敏感的肉汤培养基(由 Nissui 生产)中温育(通过种子培养物)过夜。测量在 600nm 的吸光度,并从预制的显示存活细胞数与 600nm 吸光度关系的标准曲线计算存活细胞数。将种子-培养物液体用新鲜的敏感肉汤培养基稀释,使其浓度为 $1X10^6$ 细胞/ml,其各 180μl 被放入 96-孔培养板的各个孔内。将各 20μlGM 水溶液(4mg/ml 或 2mg/ml)或水加入各孔中,接着在 37℃静置培养一夜(主培养)。同时,一部分种子培养液用无菌水稀释,铺在敏感肉汤琼脂板培养基上,在 37℃温育一夜,将菌落计数测量精确的存活细胞数。

将各孔中的培养液用无菌水稀释,铺在敏感肉汤琼脂板培养基上,在 37℃温育一夜,将菌落计数测量精确的存活细胞数。

结果,加入 4mg/ml (最终浓度 400μg/ml) GM 部分的存活细胞数为 4.4×10^7 细胞/ml,比加入水(其中数量为 1.3×10^8 细胞/ml)的部分低。因此,在 400μg/ml 浓度下,GM 对上述微生物的生长具有抑制活性。CM,GD,CD 或其各个非对映体和 GM 的非对映体显示相同结果。而且,这些化合物对其他微生物也具有相似的抗菌活性。

实施例 8

(1)给 8 周龄的雌性 CDF1 小鼠(7 周龄,体重为 20g 时购自 Nippon SLC,接着为了我们的目的初步喂养 1 周)腹膜内注射 LPS(Sigma 生产的脂多糖)(10μg/小鼠),制备内毒素-休克模型。施用 LPS 之前 30 分钟以 100 和 1000mg/kg 的剂量口服施用 GM,施用 LPS 之后 1 小时,收集小鼠的血,分离血清,通过可商购的 ELISA 试剂盒(Endogen 生产)测定血清中肿瘤坏死因子α的量,结果示于表 3。因此,与施用蒸馏水的对照组相比,施用 1000mg/kg GM 的组中肿瘤坏死因子的产生被显著抑制。

表 3

组	剂量 (mg/kg)	小鼠数目	血清中的 TNF(ng/ml) (平均值±SE)
对照		4	2.32 ± 0.15
施用 GM 的组	1000	5	1.16 ± 0.26
	100	5	2.22 ± 0.26

(2)给 8 周龄的雌性 CDF1 小鼠腹膜内施用石蜡油(Cosmo Bio)(2ml)以诱导腹腔巨噬细胞(MΦ)。施用石蜡油 1 周后，腹膜内灌注 4ml RPMI-1640 培养基(Gibco)，充分按摩并回收所述培养基以得到腹腔细胞。

用 RPMI-1640 培养基将腹腔细胞洗涤两次，并悬浮于含 10%胎牛血清(FCS;High-Clone)的 RPMI-1640 培养基中以调节细胞浓度为 1×10^6 个细胞/ml。将如此制备的细胞溶液(1ml)植入 24 孔培养板中，于 37℃，CO_2 培养箱中温育 2 小时。除去温育后上清液中所含的未粘附细胞，将粘附细胞用作腹腔 MΦ。

在培养板的每个孔中加入 800μl 含有 10% FCS 的 RPMI-1640 培养基，然后在其中加入 100μl 各含有 1，10，100 和 1000μM GM 的生理盐水溶液(Otsuka Pharmaceutical 生产)，于 37℃，CO_2 培养箱中温育 1 小时。

温育后，加入 100μl 100ng/ml LPS(Sigma 生产)，再温育 24 小时。温育完成后，从中回收上清液，使用可商购的 ELISA 试剂盒(Endogen 生产)测定其中产生的 TNFα的量。

结果示于图 30，因此，图 30 显示出 GM 的量与所产生的肿瘤坏死因子的量之间的关系，其中纵坐标表示所产生的肿瘤坏死因子的量(pg/ml)，而横坐标表示 GM 浓度(μM)。顺便地说，线条图表示未加入 GM 的对照情况。

浓度不低于 10μM 的 GM 显著抑制被 LPS 诱导的小鼠的腹腔巨噬细

胞产生肿瘤坏死因子。

如上述实施例 8 所示，GM 具有抑制肿瘤坏死因子产生的活性。CM，GD，CD 或其各个非对映体和 GM 的各个非对映体也显示出类似的结果。

实施例 9

按下述使用雄性 Lewis 大鼠[5 周龄时购自 Seac-Yoshitomi(体重约为 130g)，接着为了我们的目的初步喂养 1 周]制备角叉藻聚糖诱导的足水肿模型，所述模型是慢性关节风湿症的动物模型，接着评价所测药物。

给实验开始前 18 小时已禁食的大鼠口服施用 10ml/kg GM，所述 GM 用蒸馏水(Otsuka Pharmaceutical 生产)制备成 10 和 100mg/ml。

施用受试药物 0.5 小时之后，给每只大鼠右足注射 100μl 溶于生理盐水溶液(Otsuka Pharmaceutical 生产)中的 1%角叉藻聚糖(Wako 生产)悬浮液以诱导足水肿。注射角叉藻聚糖 3 小时后，用足体积测量装置(UGO BASILE 生产)测定大鼠右足的体积。顺便地说，通过计算与施用角叉藻聚糖之前测定的每只大鼠右足体积相比的增加率来表示测定值。

结果示于图 31，因此，图 31 显示出 GM 的量与足水肿增加率之间的关系，其中纵坐标表示增加率(%)，而横坐标表示 GM 的剂量(mg/kg)。

剂量为 100mg/kg 和更高的 GM 具有显著的抑制活性。

CM，GD，CD 或其各个非对映体和 GM 的各个非对映体也显示出类似的结果。

实施例 10

按下述使用小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 细胞(ATCC TIB 71)和 LPS 测定 GM 对 NO 产生和细胞损害的抑制活性。

于 37℃，5%二氧化碳气体存在下，在 6 孔组织培养板中将含有 2mM

L-谷氨酰胺(Life Technologies Oriental 生产; 25030-149), 不含酚红, 含有 5ml 10%胎牛血清(Gibco 生产), 含有 1.5×10^6 个 RAW 264.7 细胞的 Dulbecco-修饰的 Eagle 培养基(Life Technologies Oriental 生产; 11054-020)温育 12 小时, 加入 50μl 50μg/ml LPS(Sigma 生产; L-2012), 然后在每个孔中各加入 50μl 250μM GM 或 100μM GM, 再温育 12 小时, 然后测定通过培养基中 NO 的氧化产生的 NO_2^- 和活细胞数量。顺便地说, 将未加入 LPS 和未加入 GM 的组制备为对照。

为了测定 NO_2^-, 从每个孔中分离 100μl 经温育的上清液, 加入 10μl 50μg/ml 2,3-二氨基萘(Dojindo Laboratories 生产; 341-07021)溶液(溶于 0.62N 盐酸中的溶液), 将混合物放置 15 分钟, 然后加入 5μl 2.8N 氢氧化钠水溶液, 在激发波长为 355nm, 测量波长为 460nm 时, 使用 Titertec Fluoroscan II(购自 Dainippon Pharmaceutical)测定所得萘三唑的荧光。以两个系列进行所有实验, 从平均值中减去未加入 LPS 的组的对照值, 将各个组的相对值与加入 LPS 的组值进行比较。

结果是 GM 抑制 RAW 264.7 细胞中由 LPS 诱导的 NO 产生, GM 还抑制 RAW 264.7 细胞中由 LPS 导致的细胞损害。

结果示于图 32 和图 33。图 32 表明培养液中 GM 浓度和 NO_2^- 浓度之间的关系, 其中纵坐标表示 NO_2^- 浓度的相对值(%)。图 33 表明在 GM 存在下温育时间和活细胞数目之间的关系, 其中横坐标表示温育时间(小时), 而纵坐标表示 5ml 培养液中所含的活细胞数目($\times10^5$/5ml)。在图 33 中, 正方形(□)表示未加入 LPS 的情况; 菱形(◇)表示加入 LPS 的情况; 圆形(O)表示加入 2.5μM GM 的情况; 三角形(Δ)表示加入 2.5μM GM 和 LPS 的情况; 黑正方形(■)表示加入 1μM GM 和 LPS 的情况。

因此, GM 显示出对 NO 产生的抑制作用, CM, GD, CD 或其各个非对映体和 GM 的各个非对映体也显示出类似的结果。

实施例 11

于 37℃，5%二氧化碳气体存在下，在含有 10%胎牛血清(FBS, Gibco 生产，26140-079)的 Iscob-修饰的 Dulbecco 培养基(IMDM, Gibco 生产，12440-053)中温育 DSEK 细胞(保藏于 Saitama 医学院，综合医学中心，内服药二部的细胞株)直至铺满，所述细胞是由慢性关节风湿症患者滑膜建立的成纤维细胞株，然后通过用胰蛋白酶-EDTA(Gibco 生产，25300-054)脱离收集细胞。将细胞悬浮于上述培养基中直至达到 25,000 个细胞/ml，将各为 100μl 的细胞置于 96 孔培养板的每个孔中。温育 5 天当基本达到铺满状态时，弃去培养基，加入含 2.5，5，10，20 或 30μM GM 的上述培养基。温育 24，48 或 72 小时之后，加入 10μl 预混合的 WST-1(Takara Shuzo 生产，MK400)，接着在 37℃下反应 4 小时。从 450nm 下的吸光度(A_{450})中减去 650nm 下的吸光度(A_{650})得到的值被确定为细胞生长水平。

结果示于表 4。

表 4

浓度 (μM)	24 小时后的 $A_{450}-A_{650}$	48 小时后的 $A_{450}-A_{650}$
0	0.846	1.270
2.5	0.768	1.133
5	0.621	0.942
10	0.420	0.486
20	0.238	0.185
30	0.241	0.196

在温育 24 小时和 48 小时这两种情况下，相对于加入水的对照而言，加入 5μM 或更多 GM 的组中，细胞生长受到抑制，在加入 10μM GM 的组中注意到细胞凋亡体的产生，在加入 20μM 或更多 GM 的组中，几乎找不到活细胞。

因此，GM显示出对滑膜细胞的细胞凋亡诱导作用和生长抑制作用。CM，GD，CD或其各个非对映体和GM的各个非对映体也显示出类似的结果。

实施例12

(1)于37℃，5%二氧化碳气体存在下，在含有10%胎牛血清(FCS，Bio Whittaker生产)的RPMI-1640培养基(Gibco BRL生产)中温育人T细胞白血病细胞株Jurkat细胞(ATCC TIB-152)和Molt-3细胞(ATCC CRL-1552)，然后将细胞悬浮于含有0，5，10或20μM GM的上述培养基中使细胞数目为5×10^5个细胞/ml，接着温育24小时。通过MTT法[Mosmann等：免疫学方法杂志，第65卷，p55-63(1983)]测定细胞生长，其中通过560nm下的吸光度测定细胞生长水平。

结果是在两个细胞株中，分别相对于加入水的对照而言，加入10μM和20μM GM的组中细胞生长的抑制水平约为50%和不低于75%。在加入5μM或更少GM的情况下，对细胞生长没有显著影响。

因此，GM以依赖于浓度的方式抑制T细胞白血病细胞株Jurkat细胞和Molt-3细胞的生长。

结果示于图34和图35。图34显示出GM对Jurkat细胞生长的影响，而图35显示出GM对Molt-3细胞生长的影响。在图34和图35中，横坐标表示GM浓度(μM)而纵坐标表示560nm下的吸光度。

(2)按下述测定GM对Jurkat细胞和Molt-3细胞中Fas抗原表达的影响。于37℃，5%二氧化碳气体存在下，在含有10%FCS，0，1，5，10或20μM环戊烯酮或GM的RPMI-1640培养基中温育5×10^5个细胞/ml的Jurkat细胞或Molt-3细胞，接着按照Munker法[Munker，R.：Ann. Hematol，第70卷，p15-17(1995)]使用抗Fas抗体(Boehringer-Ingelheim生产)对上述细胞进行两步免疫染色。

通过流式细胞仪(Orthocytron；Ortho Diagnostic Systems生产)测定经染色的1×10^4个细胞的荧光强度，计算出显示出预定或更高荧光强度的细胞的比例，所述细胞即为表达Fas抗原的细胞。

结果是在两个细胞株中，当加入 1-10μM GM 时，表达 Fas 抗原的细胞比例以依赖于浓度的方式增加，当加入 20μM GM 时，结果几乎与加入 10μM GM 的情况相同。

结果示于图 36 和图 37，因此，图 36 显示出 Fas 抗原在 Molt-3 细胞中的表达，而图 37 显示出在 Jurkat 细胞中的表达。在图 36 和 37 中，横坐标表示 GM 浓度(μM)，而纵坐标表示表达 Fas 抗原的细胞的比例，籍此观察到 GM 诱导 Fas 抗原产生的作用。

(3)按与实施例 12-(2)相同的方式，加入 10μM GM 后将 Molt-3 细胞温育 1，3，6，12 或 24 小时，然后按与实施例 12-(2)相同的方法测定表达 Fas 抗原的细胞的比例。

结果是当加入 10μM GM 时，温育 12 小时后，表达 Fas 抗原的细胞的比例增加，温育 24 小时后所述比例进一步增加。

结果示于图 38，因此，图 38 显示出当在 Molt-3 细胞中加入 10μM GM 后进行温育时，表达 Fas 抗原的细胞的比例的变化，其中横坐标表示温育时间(小时)，而纵坐标表示表达 Fas 抗原的细胞的比例(%)。

因此，如上文实施例 12 中所提及，确定了 GM 诱导 Fas 抗原表达的作用。CM，GD，CD 或其各个非对映体和 GM 的各个非对映体也显示出类似的结果。

实施例 13

从 Clea Japan 购得 KK-A^y 小鼠(雄性；4 周龄)，按我们的目的喂养至 10 周龄，口服施用 GM 达 21 天，研究 GM 对血液中糖，胰岛素和脂质的影响。GM 的剂量为 30，100 和 300 mg/kg。在施用 GM 的每一组血糖都有所降低(图 39)，在施用 GM 的每一组，血清中的胰岛素也有所降低(图 40)，至于血清中的脂质，在 GM 施用组血清中的总胆固醇降低(图 41)，在 GM 施用组血清中的甘油三酯降低(图 42)，在 GM 施用组血清中的游离脂肪酸降低(图 43)。

因此，图 39 显示出 GM 剂量与血糖之间的关系，其中纵坐标表示血清中的葡萄糖值(mg/dl)，而横坐标表示 GM 剂量(mg/kg)。图 40 显

示出 GM 剂量与血清中胰岛素之间的关系，其中纵坐标表示血清中的胰岛素值(μU/ml)，而横坐标表示 GM 剂量(mg/kg)。图 41 显示出 GM 剂量与血清中总胆固醇值之间的关系，其中纵坐标表示血清中的总胆固醇值(mg/dl)，而横坐标表示 GM 剂量(mg/kg)。图 42 显示出 GM 剂量与血清中甘油三酯值之间的关系，其中纵坐标表示血清中的甘油三酯值(mg/dl)，而横坐标表示 GM 剂量(mg/kg)。图 43 显示出 GM 剂量与血清中游离脂肪酸值之间的关系，其中纵坐标表示血清中的游离脂肪酸值(μEq/l)，而横坐标表示 GM 剂量(mg/kg)。在图中，*和**表示在针对未施用 GM 的组的 Turkey 多重比较试验中，显著性差异分别为 $p<0.05$ 和 $p<0.01$。

顺便地说，动物被分成 4 组(每组由 10 只动物组成)，这 4 组分别施用生理盐水(5ml/kg)或 30，100 或 300mg/5ml/kg GM。每天口服施用各个受试物质 1 次，共施用 21 天，在施用的最后 1 天，在施用受试物质 4 小时后用乙醚麻醉动物，从下腹动脉取血。通过酶-免疫测定法(可商购试剂盒：Glazym 胰岛素-EIATEST，Wako Pure Chemicals 生产)测定血清中的胰岛素。分别通过 hexonase-G6PDH 法，GPO·DAOS 法和 ACS·ACOD 法，使用自动分析仪(7070 型，Hitachi 生产)测定血清中的糖，甘油三酯和游离脂肪酸。通过胆固醇-氧化酶·DAOS 法，使用自动分析仪(7070 型，Hitachi 生产)测定血清中的胆固醇。

从上述结果看，发现 GM 具有降低血糖，胰岛素和脂质的作用。CM，GD，CD 或其各个非对映体和 GM 的各个非对映体也显示出类似的结果。

实施例 14

(1)于 37℃，5%二氧化碳气体存在下，将含有 10%胎牛血清，2×10^5 个细胞/ml HL-60 (ATCC-CCL-240)的 RPMI-1640 培养基(5ml)置于 6 孔培养板的每个孔中温育 24 小时，然后在其中加入 GM 以使其终浓度为 0，0.5，1.0，3.0，5.0，10.0 或 20.0μM，继续温育 8 小时。

温育结束后，计数细胞数目，离心收集细胞，用 PBS 洗涤细胞以

制备经 GM 处理的细胞。同时也制备于 45℃加热 10 分钟接着进行相同温育的细胞。

通过“分子克隆”[冷泉港实验室出版社，1989]中提到的方法对如此处理的细胞进行 SDS-PAGE。将经处理的细胞悬浮于 SDS-PAGE 样品缓冲液中以使其浓度为 2.5×10^6 个细胞/ml，于 100℃将所得细胞悬浮液处理 10 分钟，将各 5μl 该悬浮液上样于两块 SDS-PAGE 凝胶(5%堆积胶；10%分离胶)上以进行电泳。用考马斯亮蓝 R250 染色其中一块凝胶，而将另一块凝胶印迹至聚偏氟乙烯转移膜(Immobilon™，Millipore 生产，目录号为 IPVH000-10)上。于 4℃用 Block Ace(Dainippon Pharmaceutical 生产；目录号为 UK-B25)将膜封闭一夜。

将封闭的膜与单克隆抗体 HSP 72/73(Ab-1)(Oncogene Research Products，目录号为 HSP01)进行反应，所述抗体与热诱导的 70kDa 热激蛋白特异性反应，然后用含有 0.05%吐温 20 的 TBS 洗涤，接着再用 TBS 洗涤。然后，与过氧化物酶-化合的第二抗体 HRP-兔抗小鼠 IgG(H+L)(Zymed Laboratories 生产，目录号为 61-6520)反应，按与上述操作相同的方式进行洗涤。将按上述用第一和第二抗体处理过的膜与 Renaissance™(Dupont NEN 生产的化学发光试剂，目录号为 NEL-100)反应，用 X-射线胶片光敏化以检测 70kDa 热激蛋白的诱导。

结果是通过加入 GM，可观察到对 70kDa 热激蛋白的诱导。诱导的强度示于表 5，表 5 中，“+”表示诱导强度的水平，“+”的数目越多，诱导强度越大。顺便地说，“-”表示未观察到诱导，“±”表示有微弱的诱导。

表 5

经处理的细胞	热激蛋白的诱导
于 45℃加热 10 分钟	+ + +
0μM GM	−
0.5μM GM	±
1.0μM GM	±
3.0μM GM	+
5.0μM GM	+
10μM GM	+ +
20μM GM	+ +

由表 5 可清楚地看出 GM 具有 HSP70 诱导能力。

(2)在经温育的细胞中加入 CM 以使其终浓度为 0, 10, 20, 30, 40 或 50μM, 通过实施例 14-(1)中提及的方法测定 HSP70 的表达。

结果确定了 CM 可诱导 70kDa 的热激蛋白。诱导的强度示于表 6, 表 6 中, “+”表示诱导强度的水平, “+”的数目越多, 诱导强度越大。顺便地说, “-”表示未观察到诱导, “±”表示有微弱的诱导。

表 6

经处理的细胞	热激蛋白的诱导
于 45℃加热 10 分钟	+ + +
0μM CM	−
5μM CM	−
10μM CM	+
20μM CM	+ +
30μM CM	+ +
40μM CM	+
50μM CM	+

因此，如实施例 14 所示，GM 和 CM 显示出诱导热激蛋白的作用，GD，CD 或其各个非对映体和 GM 和 CM 的各个非对映体也显示出类似的结果。

实施例 15

(1) 在 2×10^5 个细胞/ml CEM-SS 细胞 (ATCC CCL-119) 和被 HIV-$1_{III\ B}$ 感染的 CEM-SS 细胞(其中不少于 90%的 CEM-SS 细胞被 HIV-$1_{III\ B}$ 感染；下文称之为 CEM-3B) 中加入 GM(0，4，8 或 16μM)，温育 1 天，计数活细胞数目和死细胞数目，计算存活细胞率。结果是当加入 GM 使其浓度为 0，4 或 8μM 时，CEM-SS 细胞存活率不降低，而在 CEM-3B 细胞中，存活率依赖于加入 GM 的浓度而显著降低。另外，在加入 16μM 的情况下，CEM-SS 细胞存活率也降低，而在 CEM-3B 细胞中，存活率降低得更显著。这意味着 GM 显示出抗 HIV 作用。

结果示于图 44，因此，图 44 显示出加入 GM 的浓度与细胞存活率之间的关系，其中横坐标表示 GM 浓度(μM)，而纵坐标表示温育 1 天后的存活率(%)。正方形表示使用 CEM-SS 细胞的情况，而黑圆圈表示使用 CEM-3B 细胞的情况。

(2) 测定实施例 15-(1) 提到的将 CEM-3B 细胞温育 1 天后培养物上清液中所含的 p24 抗原浓度，结果是 p24 浓度依赖于加入 GM 的浓度而降低，因而观察到抗 HIV 作用。结果示于图 45，因此，图 45 显示出加入 GM 的浓度与培养物上清液中所产生 p24 量之间的关系，其中横坐标表示加入 GM 的量(μM)，而纵坐标表示产生的 p24 的量(ng/ml)。

因此，如上文实施例 15 所示，GM 显示出对 HIV 感染细胞的选择性杀细胞作用，表现出对 HIV 的抗病毒作用。CM，GD，CD 或其各个非对映体和 GM 的各个非对映体也显示出类似的结果。

实施例 16

(1) 通过表达 G418-抗性基因的对照质粒 pCD2-Y[分子细胞生物学，第 7 卷，p2745-2752 (1987)]和能表达 HPV16 型 E7 和 G418 抗性

基因的质粒 pCD2-16E7[日本癌症研究杂志，第 82 卷，p1340-1343(1991)]对大肠杆菌 HB101 进行转化，然后在 L-肉汤培养基中进行温育，从收集的细胞中提取质粒，通过氯化铯密度梯度超速离心纯化质粒得到导入基因所用的载体质粒。

于37℃,5%二氧化碳气体存在下,在含有10%胎牛血清的Dulbecco修饰的 Eagle 培养基中温育 NIH 3T3 细胞。

使用阳离子脂质体(TransIT LT-1, Takara Shuzo 生产)将纯化的质粒(10μg)导入 NIH 3T3 细胞，于 37℃，5%二氧化碳气体存在下，在含有 10%胎牛血清，0.4mg/ml G418(Gibco)的 Dulbecco 修饰的 Eagle 培养基中将 NIH 3T3 细胞选择 2 周，克隆所得集落以各建立 9 株导入对照载体的 NIH 3T3 细胞和用 HPV 16 型 E7 癌化的 NIH 3T3 细胞。

其中导入对照载体的细胞株被称为 NIH 3T3/Y-1, NIH 3T3/Y-2, NIH 3T3/Y-3, NIH 3T3/Y-4, NIH 3T3/Y-5, NIH 3T3/Y-6, NIH 3T3/Y-7, NIH 3T3/Y-8 和 NIH 3T3/Y-9。

其中导入 E7 的细胞株被称为 NIH 3T3/E7-1, NIH 3T3/E7-2, NIH 3T3/E7-3, NIH 3T3/E7-4, NIH 3T3/E7-5, NIH 3T3/E7-6, NIH 3T3/E7-7, NIH 3T3/E7-8 和 NIH 3T3/E7-9。

(2)使用 100mm-组织培养板，在含有 10%胎牛血清的 Dulbecco 修饰的 Eagle 培养基中使其中导入对照载体和导入 E7 的 NIH 3T3 细胞株生长至 50-70%铺满的程度，用 PBS 洗涤，用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 溶液脱离细胞,将细胞悬浮于 5ml 含有 10%胎牛血清的 Dulbecco 修饰的 Eagle 培养基中。

取出部分悬浮液，通过 Neubauer 血细胞计计数细胞密度。根据所得数据,用含有 10%胎牛血清的 Dulbecco 修饰的 Eagle 培养基稀释细胞，并植入直径为 60mm 的组织培养板中以使每板有 200 个细胞，在 3ml 培养基中开始温育。温育开始后 24 小时，加入 GM 以使其浓度为 5μM，再过 24 小时后，用新鲜培养基置换老培养基，加入 GM 以使其浓度为 5μM。

然后，每2至3天换一次新鲜培养基，接着加入GM以使其浓度为5μM。将未加入GM的培养板制备成对照实验组，并通过相同的方法温育，每次温育进行3个系列，温育9天后，使用甲醇固定培养基，用吉姆萨溶液(Gibco)染色集落。

顺便地说，使用NIH 3T3，NIH 3T3/Y-1和NIH 3T3/E7-2进行评价。

计数染色集落的结果示于表7，相对于对照细胞而言，其中导入了E7的细胞对GM显示出高的敏感性。因此，GM选择性地作用于被癌基因转化的细胞。CM，GD，CD或其各个非对映体和GM的各个非对映体也显示出类似的结果。

表7

细胞	集落数目(平均值±SD)	
	对照	经GM-处理的细胞
NIH 3T3	91.7±11.9	79.0±2.6
NIH 3T3/Y-1	83.3±8.4	72.0±9.5
NIH 3T3/E7-2	67.3±3.2	13.3±3.2

实施例17

(1)在2μl拓扑异构酶II(TopoGEN生产，2个单位/μl)，2μl 10倍稀释浓度的缓冲液[0.5M Tris-HCl(pH8.0)，1.2M Kcl，0.1M $MgCl_2$，5mM腺苷三磷酸和5mM二硫苏糖醇]，2μl 0.1%牛血清白蛋白(Takara Shuzo生产)，11μl蒸馏水和2μl蒸馏水(对照)或样品(50，100，200，500，1000或2500μM GM)的混合物中加入1μl 0.25μg/μl pBR322 DNA(Takara Shuzo生产)，于37℃反应。反应30分钟后，加入2μl 1%十二烷基硫酸钠，50%甘油和0.02%溴酚蓝水溶液，使反应停止。

将上述反应溶液(20μl)上样于1%琼脂糖凝胶，所述凝胶制备自琼脂糖L03(Takara Shuzo生产)和TAE缓冲液[40mM Tris，5mM醋酸钠和1mM乙二胺四乙酸钠(EDTA)；用醋酸调pH为7.8]，在TAE缓冲液

中进行电泳。电泳后，将凝胶浸在 1μg/ml 溴化乙锭水溶液中，用紫外光照射以观察 DNA 的电泳模式。在只是水溶液的对照中，DNA 由超螺旋型完全转变为松弛型，但当拓扑异构酶 II 活性受到抑制时，只有一部分超螺旋型转变为松弛型或完全被抑制。

结果示于表 8。

表 8

反应溶液浓度(μM)	抑制活性
0	-
5	-
10	+
20	+ +
50	+ +
100	+ + +
250	+ + +

在加入水的对照中，DNA 由超螺旋型完全转变为松弛型，但当 GM 的浓度为 10μM 或更高时，只有一部分 DNA 由超螺旋型转变为松弛型或完全被抑制，籍此确定了 GM 抑制拓扑异构酶 II 的活性。在表 8 中，-表示由超螺旋型完全转变为松弛型；+ 表示中等程度的变化；+ + 表示大多数超螺旋型得以保留；+ + + 表示超螺旋型一点也未减少。

(2)按与实施例 17-(1)相同的方法测定 GM 抑制拓扑异构酶 I 的活性，不同的是用拓扑异构酶 I[TopoGEN 生产，0.01 个单位/μl]替代拓扑异构酶 II；用 100mM Tris-HCl(pH7.9)，10mM EDTA，1mM 亚精胺和 50%甘油用作 10 倍稀释浓度的缓冲液。顺便地说，加入作为样品的 GM 以使其终浓度为 1mM。

结果是拓扑异构酶 I 被 1mM GM 抑制。

因此，GM 显示出对拓扑异构酶 II 的抑制活性，该酶在正常细胞的有丝分裂期仅瞬时表达，但通过癌化可在整个细胞周期高度表达，

GM也显示出对拓扑异构酶I的抑制活性，通过癌化可增加该酶的表达量和活性。CM，GD，CD或其各个非对映体和GM的各个非对映体也显示出类似的结果。

实施例18

从Nippon SLC购得C57BL/6小鼠(雌性；5周龄，体重约为20g)，按我们的目的初步喂养1周后用于实验。用生理盐水溶液(Otsuka Pharmaceutical生产)将ovine红细胞(Shimizu Jikken Zairyo生产)洗涤3次以使其浓度为1×10^9个细胞/ml，所述红细胞是引发延迟型致敏反应的抗原，将200μl所述细胞腹膜内注射给小鼠以对抗原致敏。

致敏5天后，将40μl通过相同方法制备的抗原注射至右足以诱导抗原，籍此引发了足水肿。从抗原致敏的那天起，每天以30mg/kg或300mg/kg的剂量给小鼠(每组5只小鼠)腹膜内施用GM 1次，共施用3天。

抗原诱导2天后，通过足水肿测量装置(Ugo Basile生产)测定小鼠右足体积，并用作延迟型致敏反应的指数。通过计算与抗原诱导之前测定的小鼠右足体积相比的增加率来表示测定值。

结果示于图46，因此，图46显示出GM对延迟型致敏反应的抑制作用，其中纵坐标是增加率(%)，而横坐标是GM的剂量(mg/kg)。

通过施用30和300mg/kg，GM显示出对延迟型致敏反应的显著抑制作用。CM，GD，CD或其各个非对映体和GM的各个非对映体也显示出类似的结果。

实施例19

通过腹膜内注射100μl溶于生理盐水溶液中的0.01%蛋白白蛋白(Sigma)溶液和100μl Alum(商品名：Imject Alum；Pierce)使5周龄的Wistar雄性大鼠系(每组5只大鼠)(Nippon SLC)致敏，14天后，从腹动脉取血。

将收集的血离心(2000rpm, 5分钟), 分离血浆, 通过48小时大鼠被动皮肤过敏反应(PCA)测定抗原特异性的IgE量。

也就是说, 以连续加倍的方式用生理盐水溶液将血清稀释至1/4至1/64, 将各0.1ml稀释后的血清皮下注射给7周龄的Wistar雄性大鼠的毛被剃光的后背。皮下注射后48小时, 由尾静脉注射1ml 0.05%蛋白白蛋白和0.5% Evans Blue(Nacalai Tesque生产)的混合物。由尾静脉注射30分钟后, 对大鼠施行断头术使其无痛苦死亡, 观察到在其后背出现蓝点, 直径为5mm或更大的点被判断为阳性, 最高稀释度被当作IgE效价。

在施用GM的组中, 从抗原致敏的那天起, 每天腹膜内施用3mg/kg或30mg/kg GM 1次, 共施用3天, 而在对照组中, 通过相同的方法腹膜内施用蒸馏水。结果示于表9。

表9

	IgE效价
对照组	64
GM(3mg/kg/天)	32
GM(30mg/kg/天)	8

GM的施用以依赖于剂量的方式抑制通过用蛋白白蛋白致敏导致的抗原特异性IgE量的增加。CM, GD, CD或其各个非对映体和GM的各个非对映体也显示出类似的对IgE产生的抑制活性。

实施例20. 注射剂

(1)将CM以1%的浓度加入生理盐水溶液(如日本药典中列出的)制备注射剂。

(2) 将GM和甘草酸分别以0.5%和0.1%的浓度加入生理盐水溶液(同上)制备注射剂。

实施例 21. 片剂

(1) 制备含有 100mg CD 和适量微晶纤维素的片剂，并用糖包衣生产片剂。

(2) 制备含有 0.1mg GD，10mg 甘草酸二钾和适量微晶纤维素的片剂，并用糖包衣生产片剂。

实施例 22. 软膏

GM	1g
吸收软膏(如日本药典中列出的)	9g

首先，将 GM 与少量吸收软膏充分捏合，然后将剩余的吸收软膏逐渐加入其中，并捏合均匀制备软膏制剂。

将软膏用于感染部位，每天四至五次。

本发明的优点

本发明提供了显示各种生理活性如抗癌活性，癌细胞生长抑制活性，癌细胞分化诱导活性，细胞凋亡诱导活性，抗菌活性，抗病毒活性，改善肝功能的活性，肿瘤坏死因子生产抑制活性，NO 生产抑制活性和抗风湿作用。也提供含有作为有效成分的至少一种选自本发明化合物的化合物，其光学活性物质和其盐的药剂。所说的药剂可以作为治疗或预防对这些化合物敏感的疾病的制剂，特别是作为生物防御功能的药物，如抗过敏剂，抗风湿剂，糖尿病药，和抗癌剂，抗致病微生物的药物如抗病毒剂和抗菌剂，和免疫调制剂。

而且，根据本发明，可以在食品和饮料中含有适量的具有生理活性的本发明化合物，其光学活性物质和其盐。由于这些化合物的各种生理活性，如抗癌作用，分化诱导作用，异常细胞生长抑制作用，细胞凋亡诱导作用，抗病毒作用，抗菌作用，和改善肝功能作用和免疫调制作用，因此，本发明提供的食品或饮料是具有保持活体强壮如预防肿瘤生成，抗菌作用和细胞凋亡诱导作用功能的健康食品或饮料，本发明提供含有用于保持胃和肠道健康的功能物质的食品或饮料。

图 1

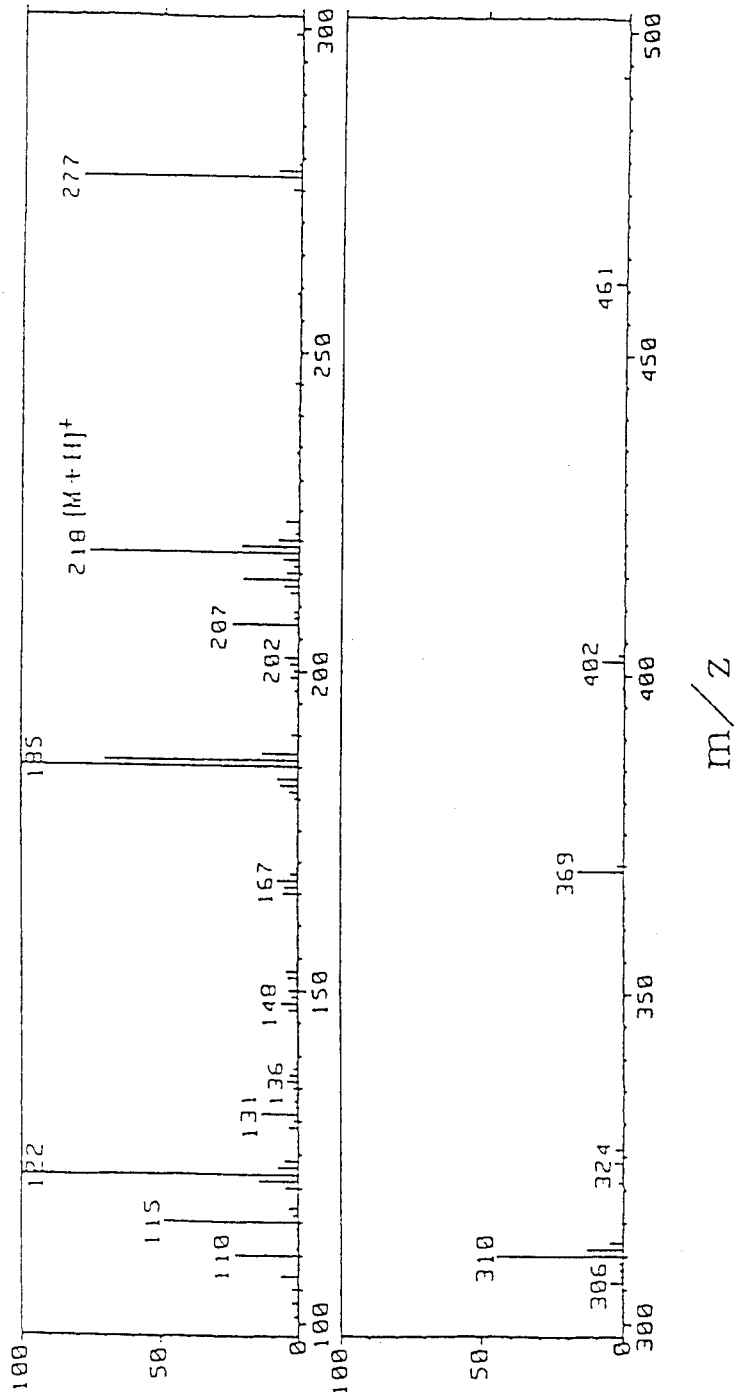

100
50
0
100
50
0
100
150
200
250
300
350
400
450
500
185
122
115
110
131
136
148
167
207
202
218 [M+H]+
277
369
310
306
324
402
461
m/z
相对强度（%）

图 2

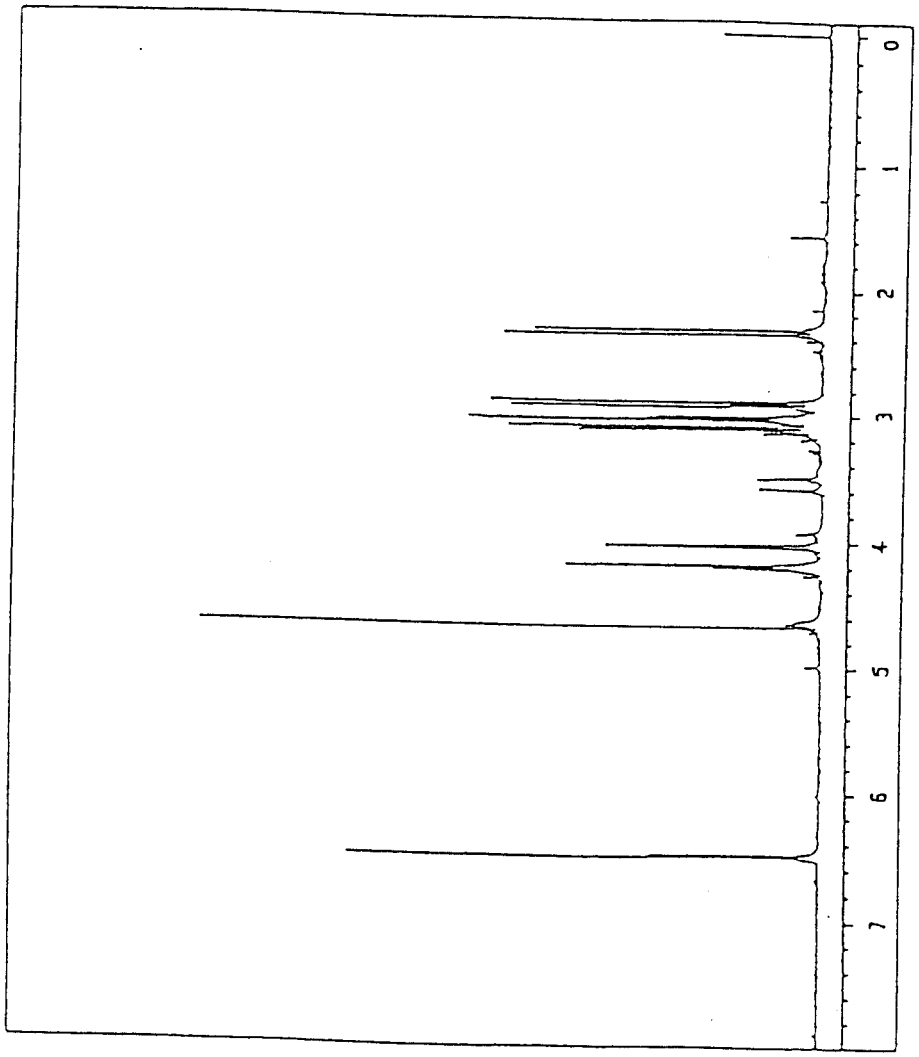


图 3

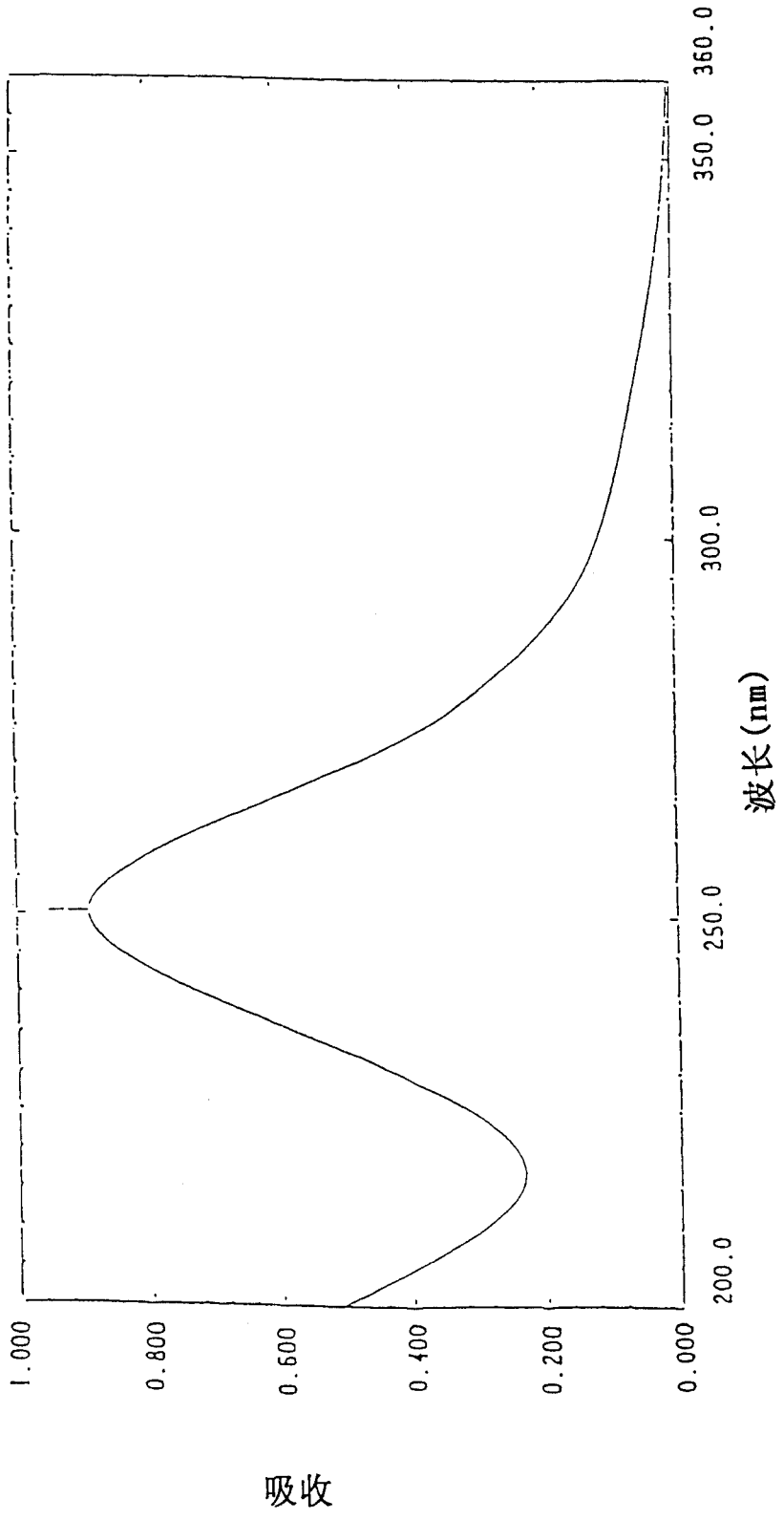

1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
吸收
200.0
250.0
300.0
350.0
360.0
波长(nm)

图 4

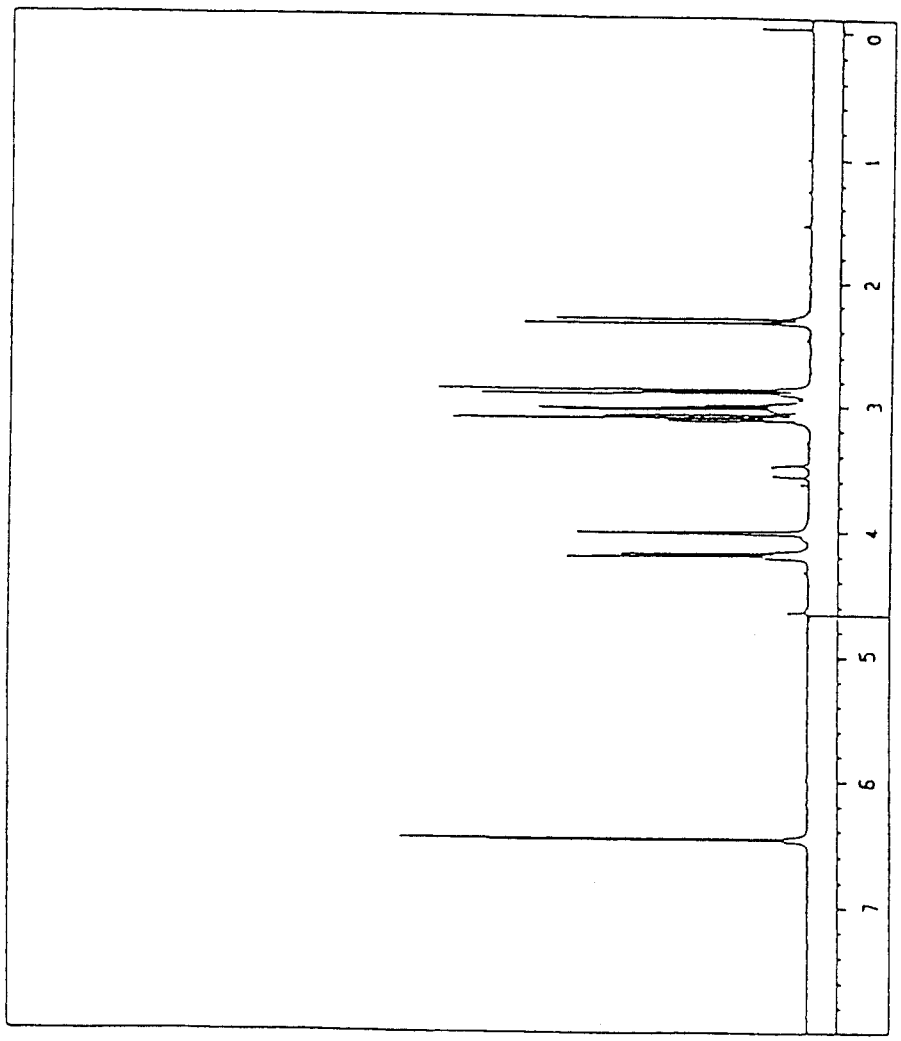


图 5

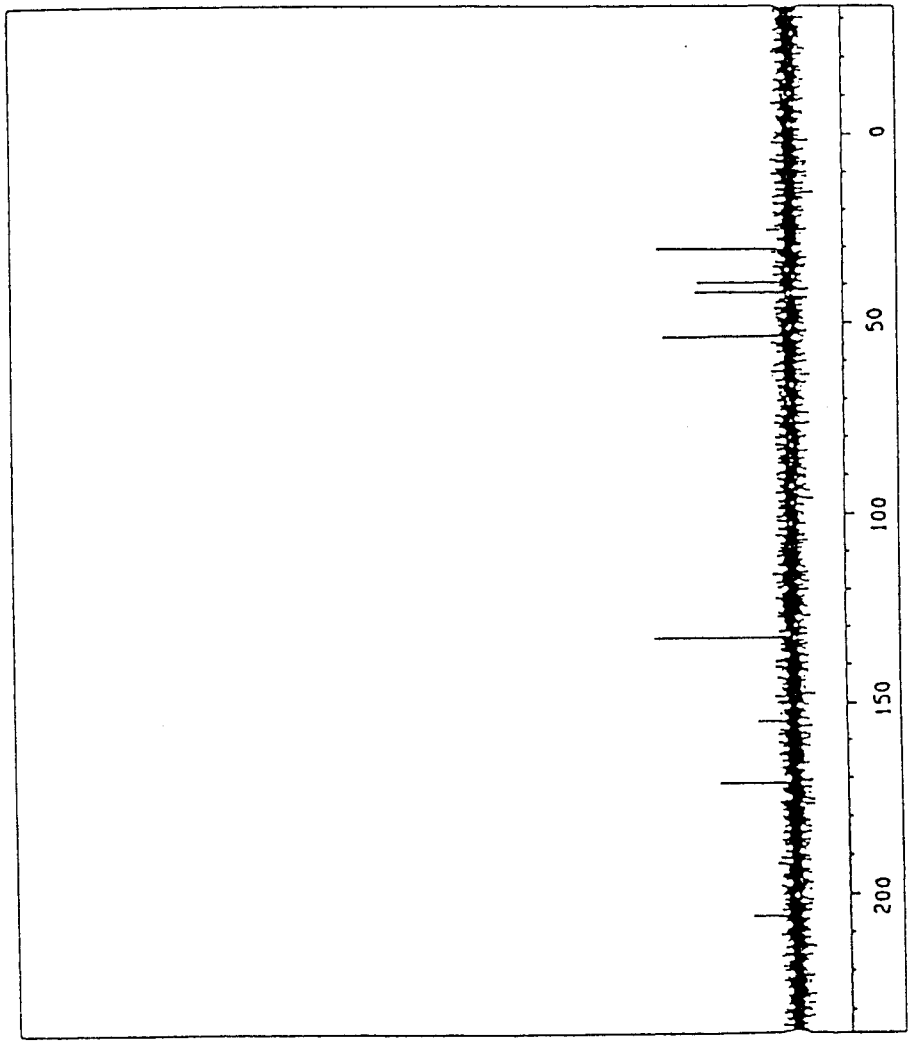


图 6

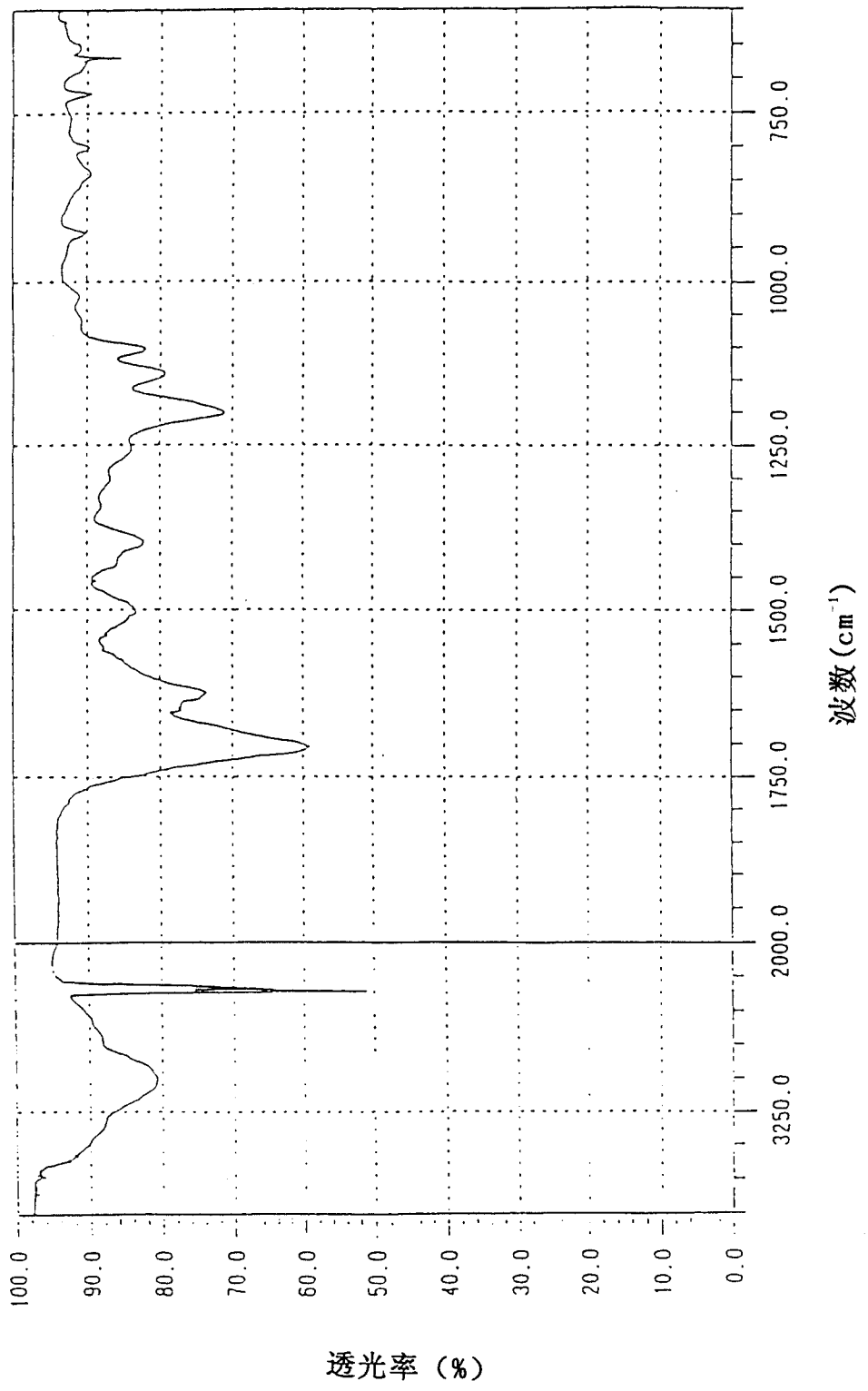

100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
透光率（%）
3250.0
2000.0
1750.0
1500.0
1250.0
1000.0
750.0
波数(cm⁻¹)

图 7

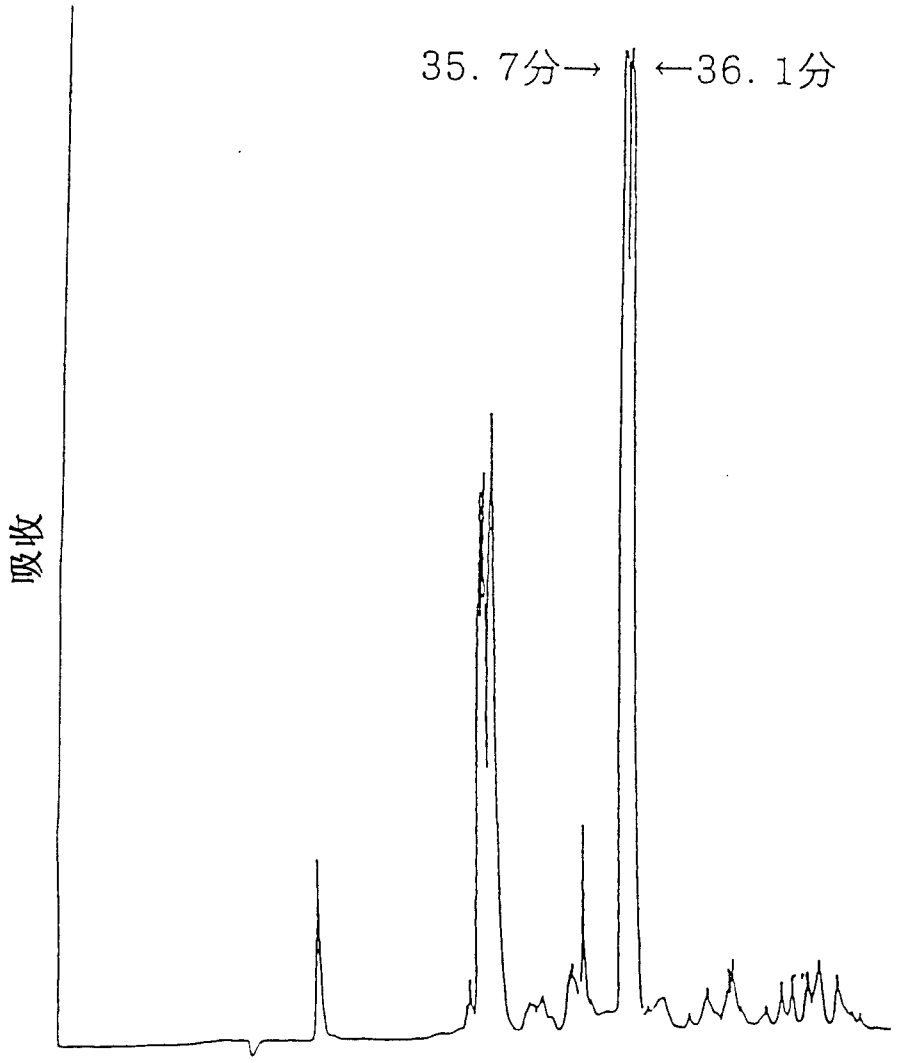


图 8

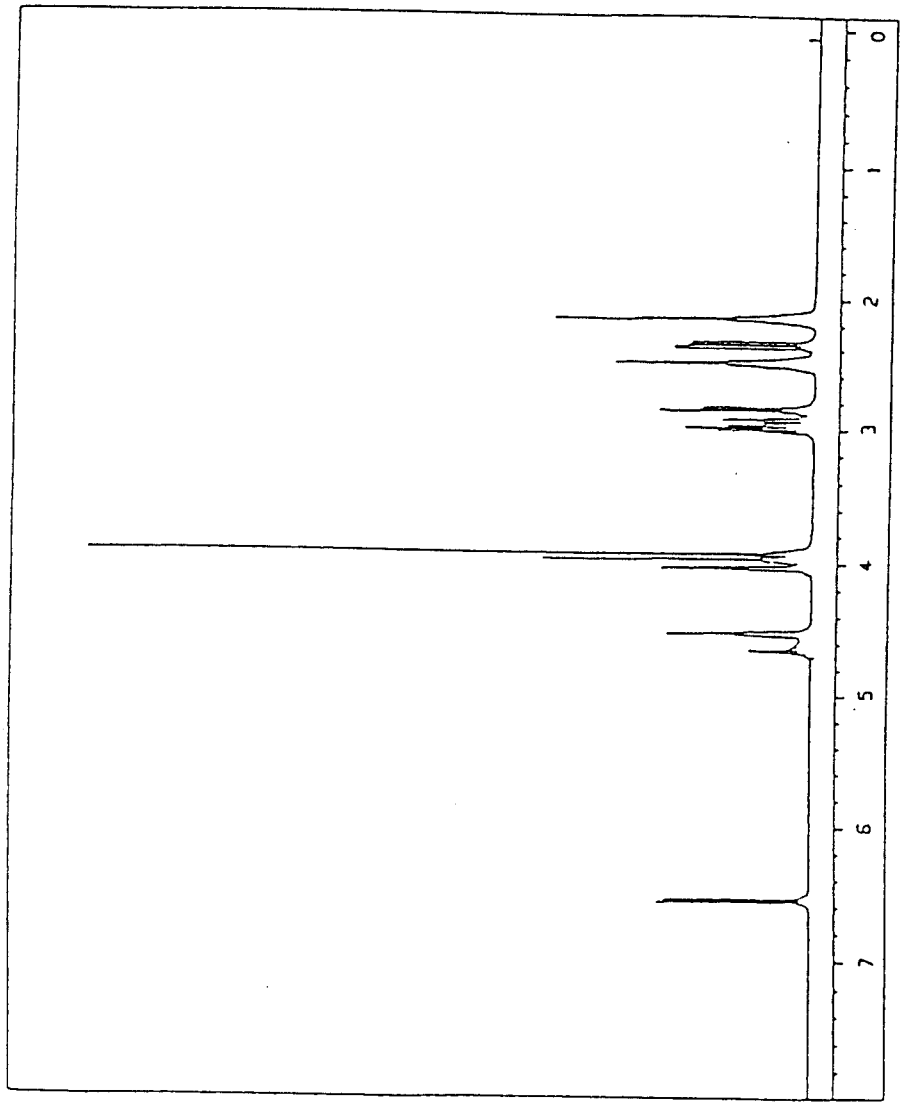


图 9

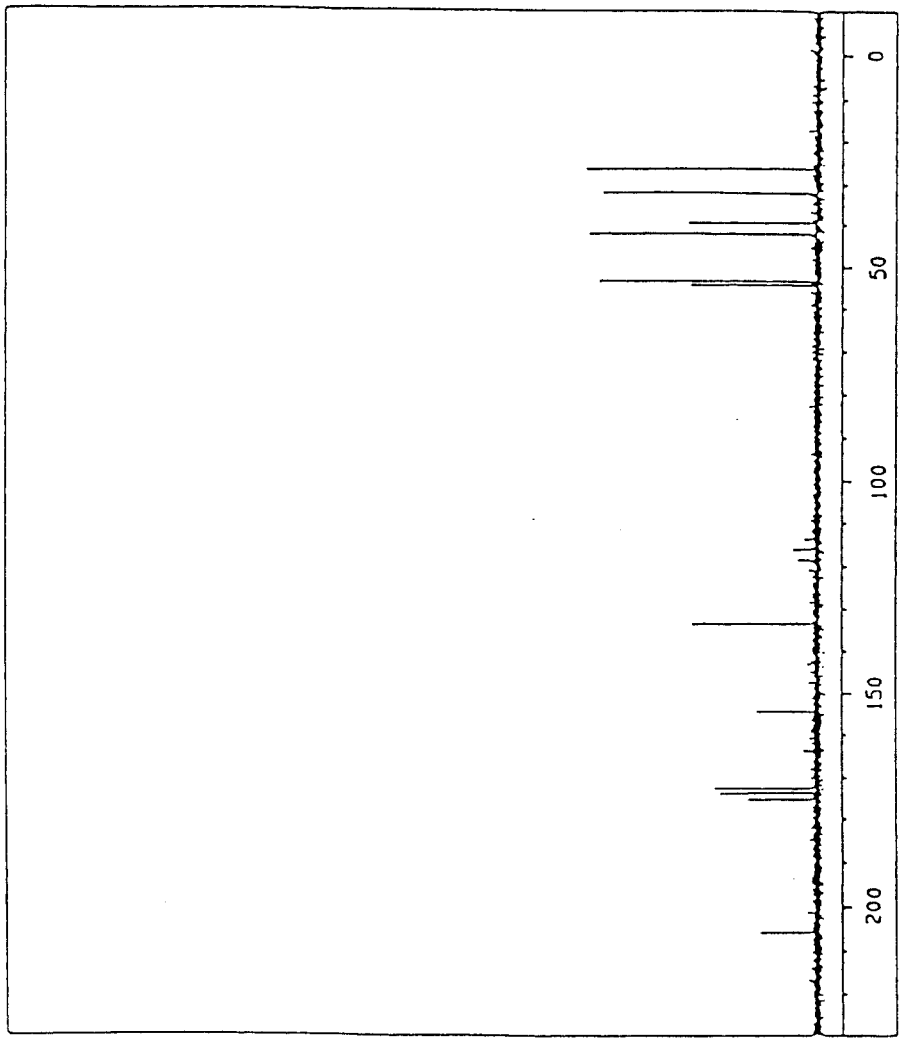
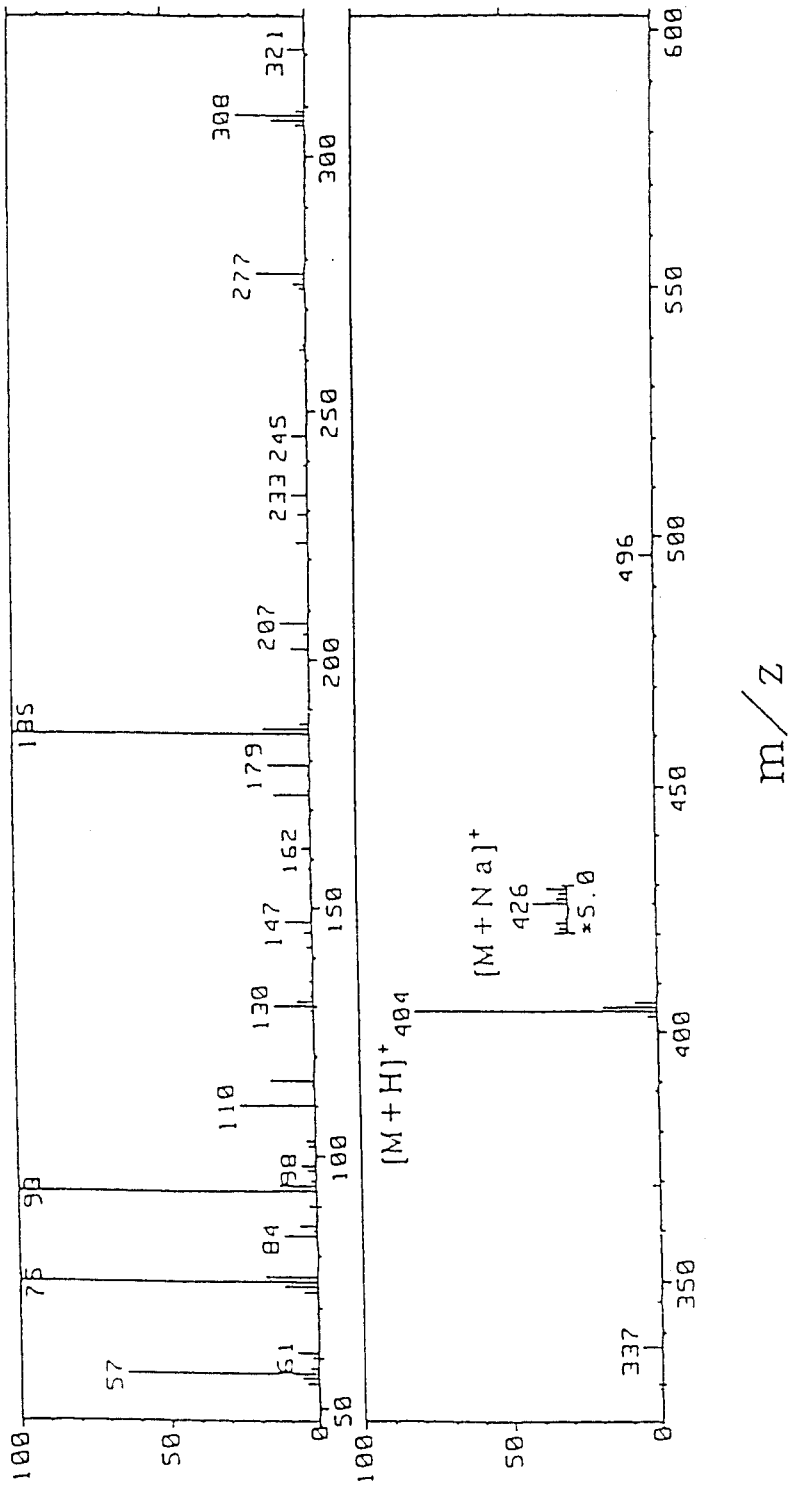


图 10


100
50
0
57
61
75
84
90
98
100
110
130
147
150
162
179
185
200
207
233
245
250
277
300
308
321
100
50
0
337
350
400
404
[M+Ha]+
426
*5.0
450
496
500
550
600
m/z

相对强度（%）

图 11

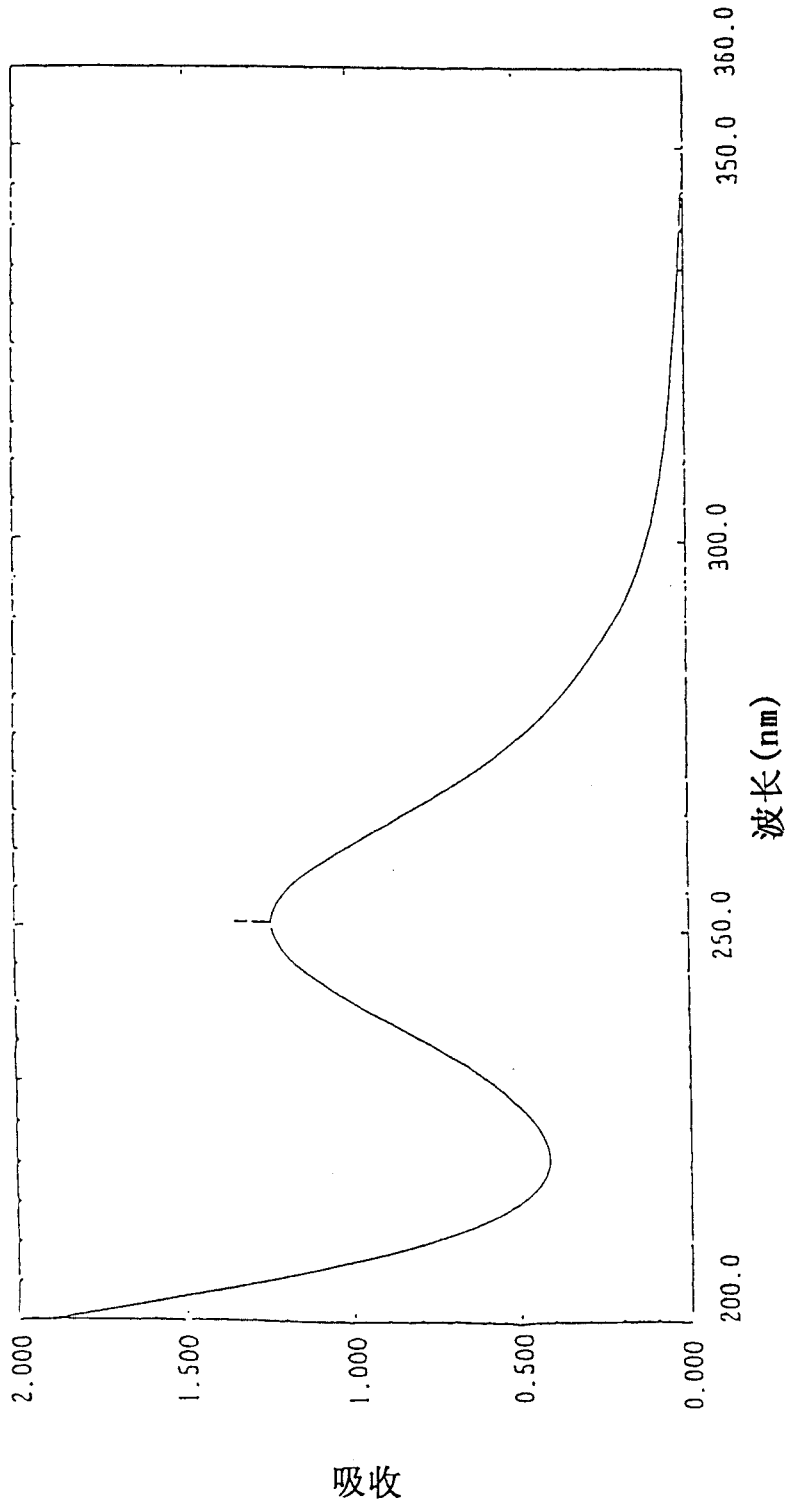


图 12

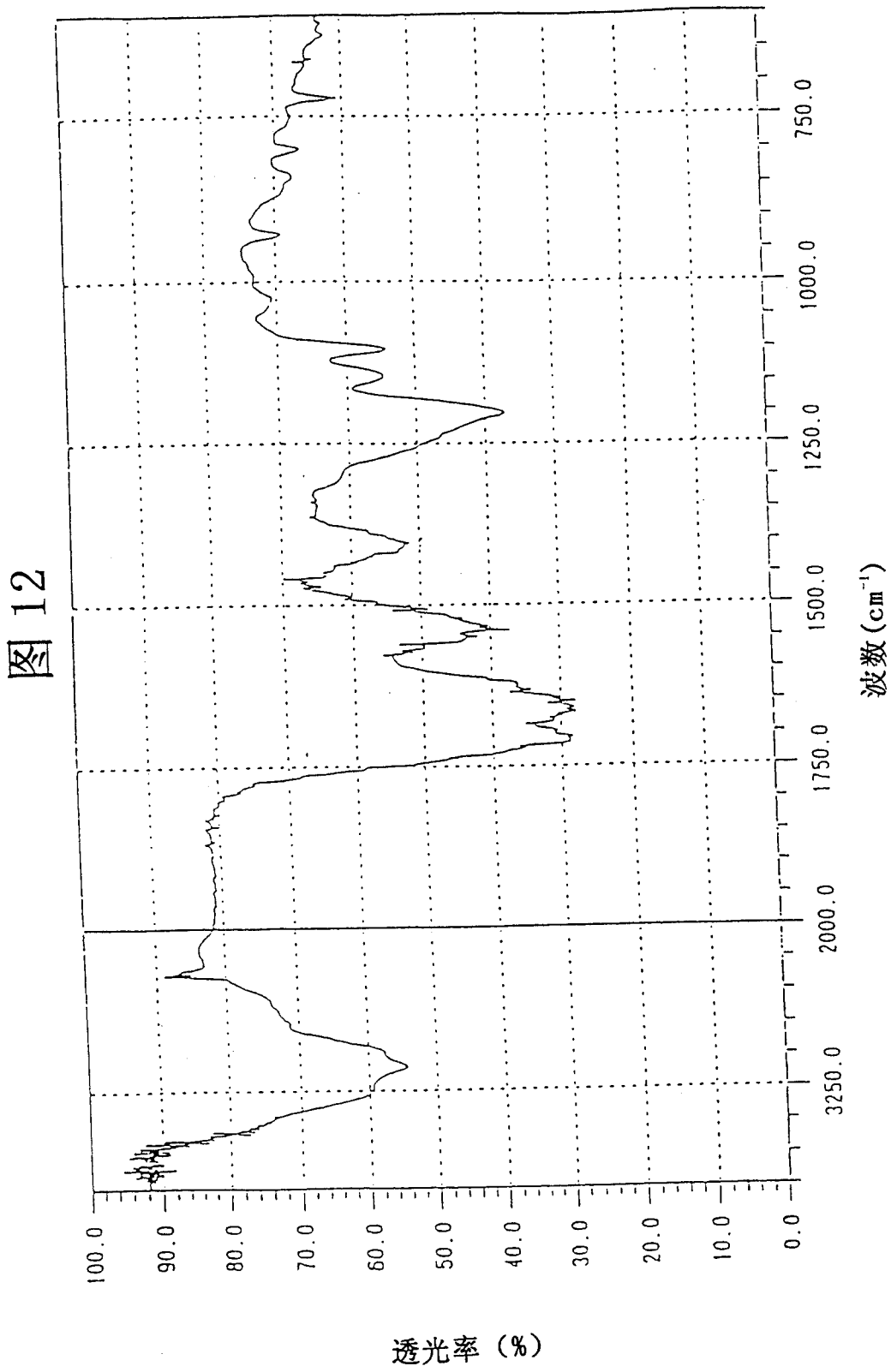

100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
透光率（%）
3250.0
2000.0
1750.0
1500.0
1250.0
1000.0
750.0
波数 (cm⁻¹)

图 13

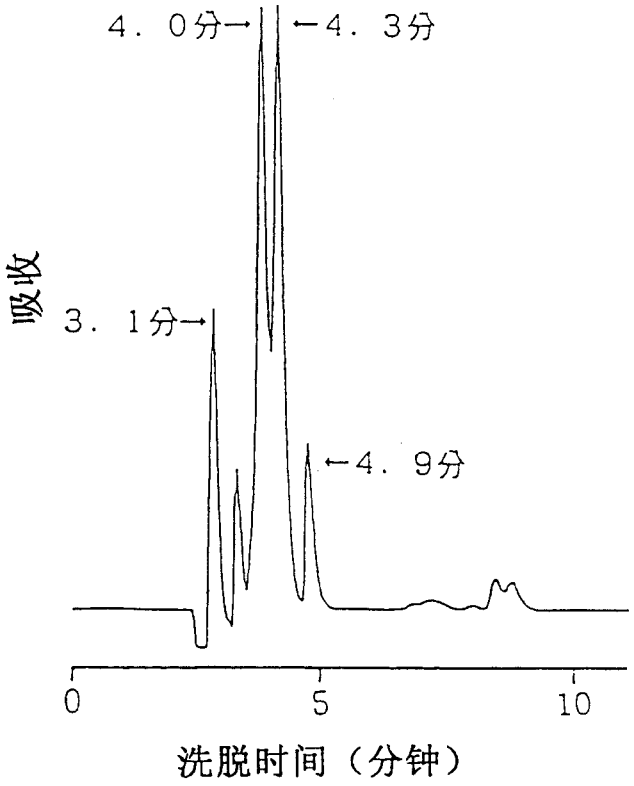


图 14

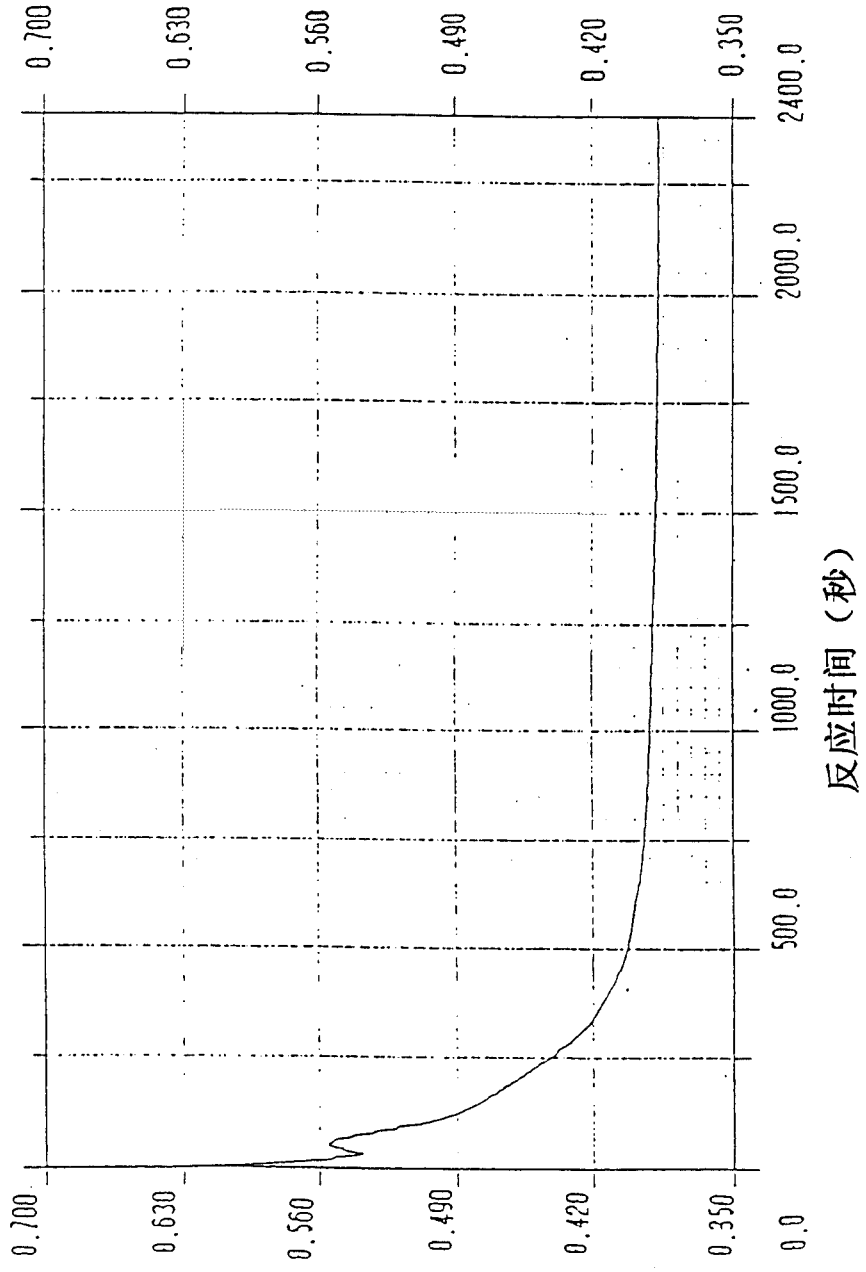

0.700
0.630
0.560
0.490
0.420
0.350
2400.0
2000.0
1500.0
1000.0
500.0
0.0
反应时间（秒）
吸收

图 15

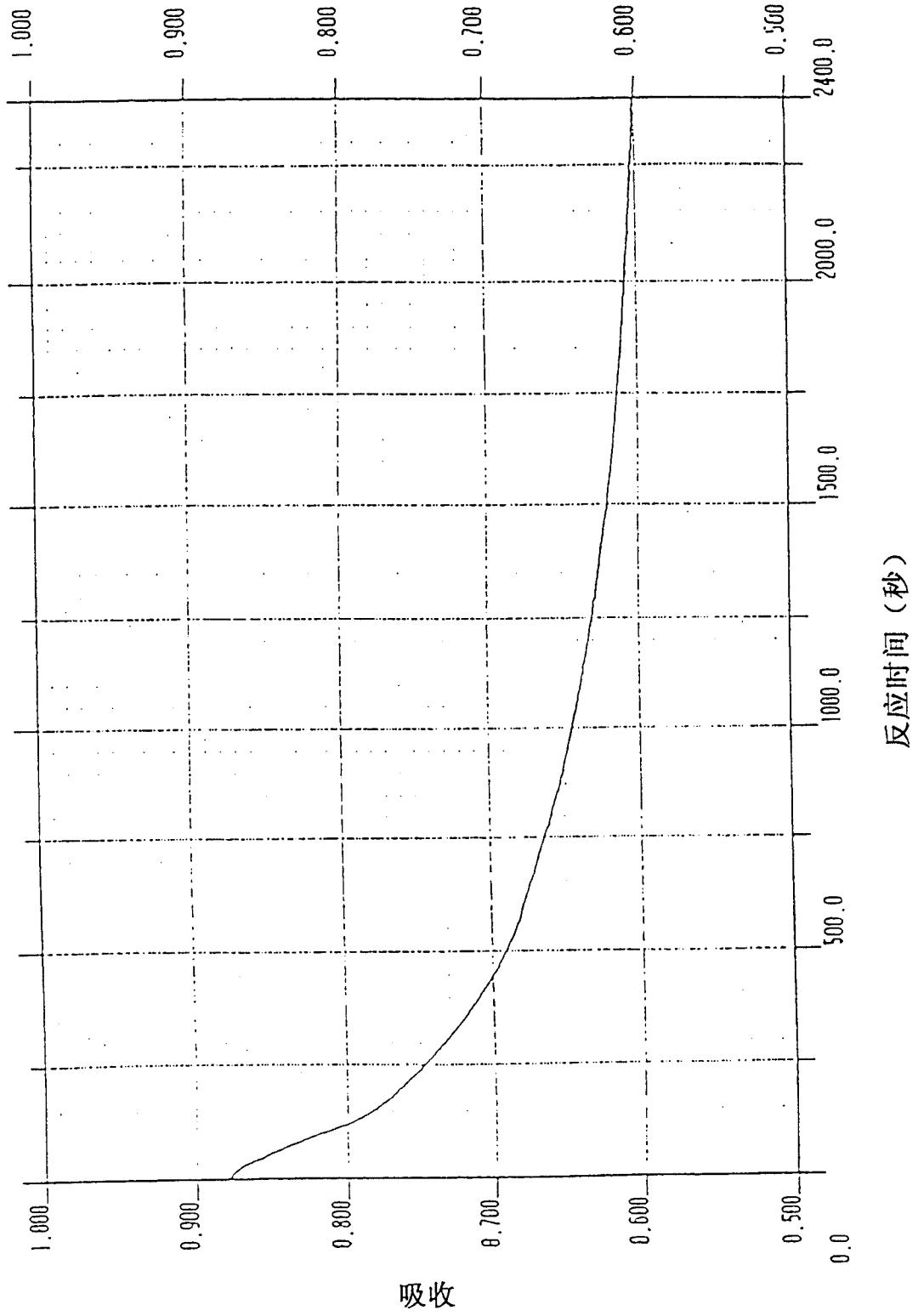

1.000
0.900
0.800
0.700
0.600
0.500
2400.0
2000.0
1500.0
1000.0
500.0
0.0
反应时间（秒）
吸收

图 16

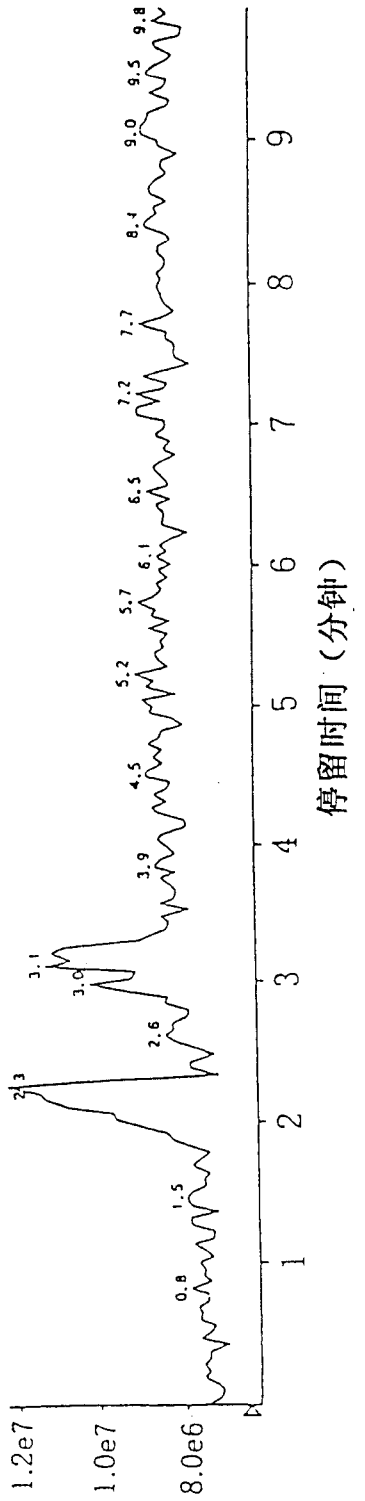

1.2e7
1.0e7
8.0e6
总离子强度（相对值）
1
2
3
4
5
6
7
8
9
停留时间（分钟）
0.8
1.5
2.3
2.6
3.0
3.1
3.9
4.5
5.2
5.7
6.1
6.5
7.2
7.7
8.4
9.0
9.5
9.8

图 17

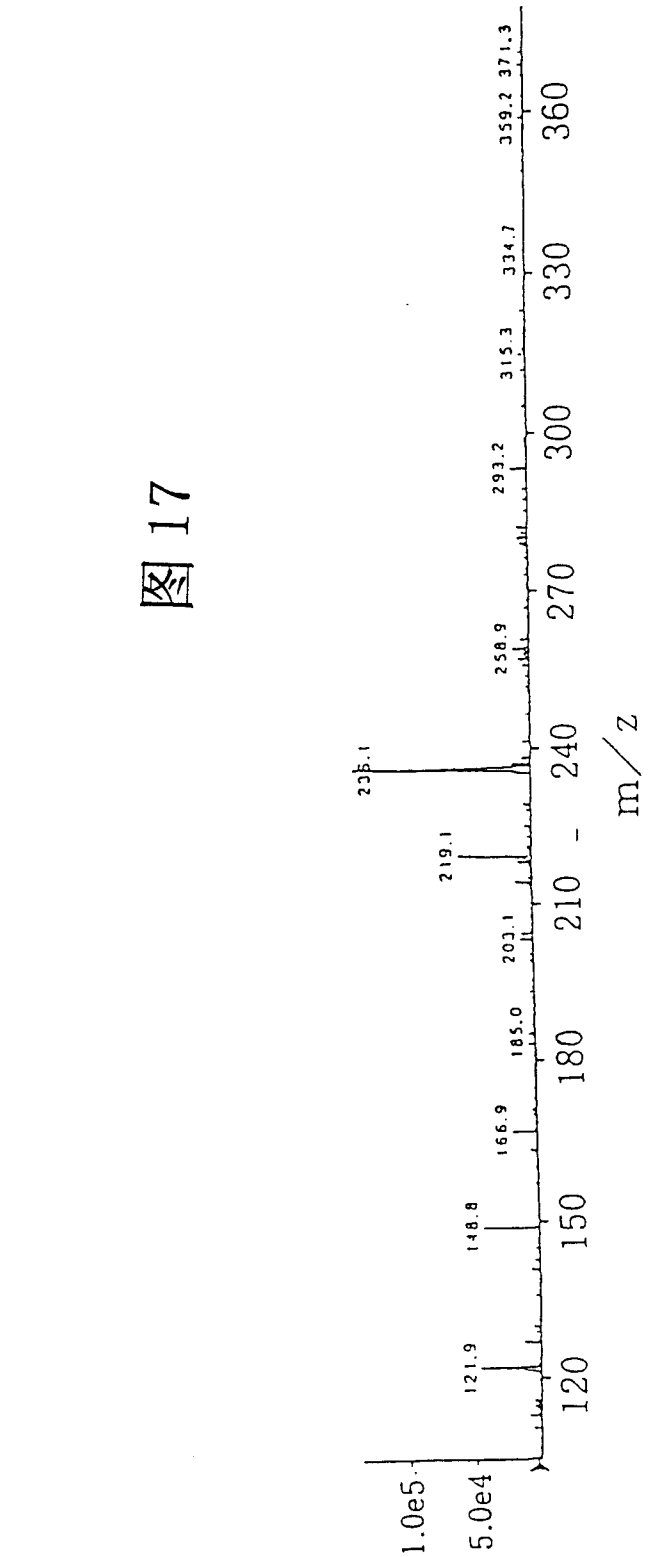

1.0e5
5.0e4
离子强度（相对值）
120
150
180
210
240
270
300
330
360
m/z
121.9
148.8
166.9
185.0
203.1
219.1
258.9
293.2
315.3
334.7
359.2
371.3

图 18

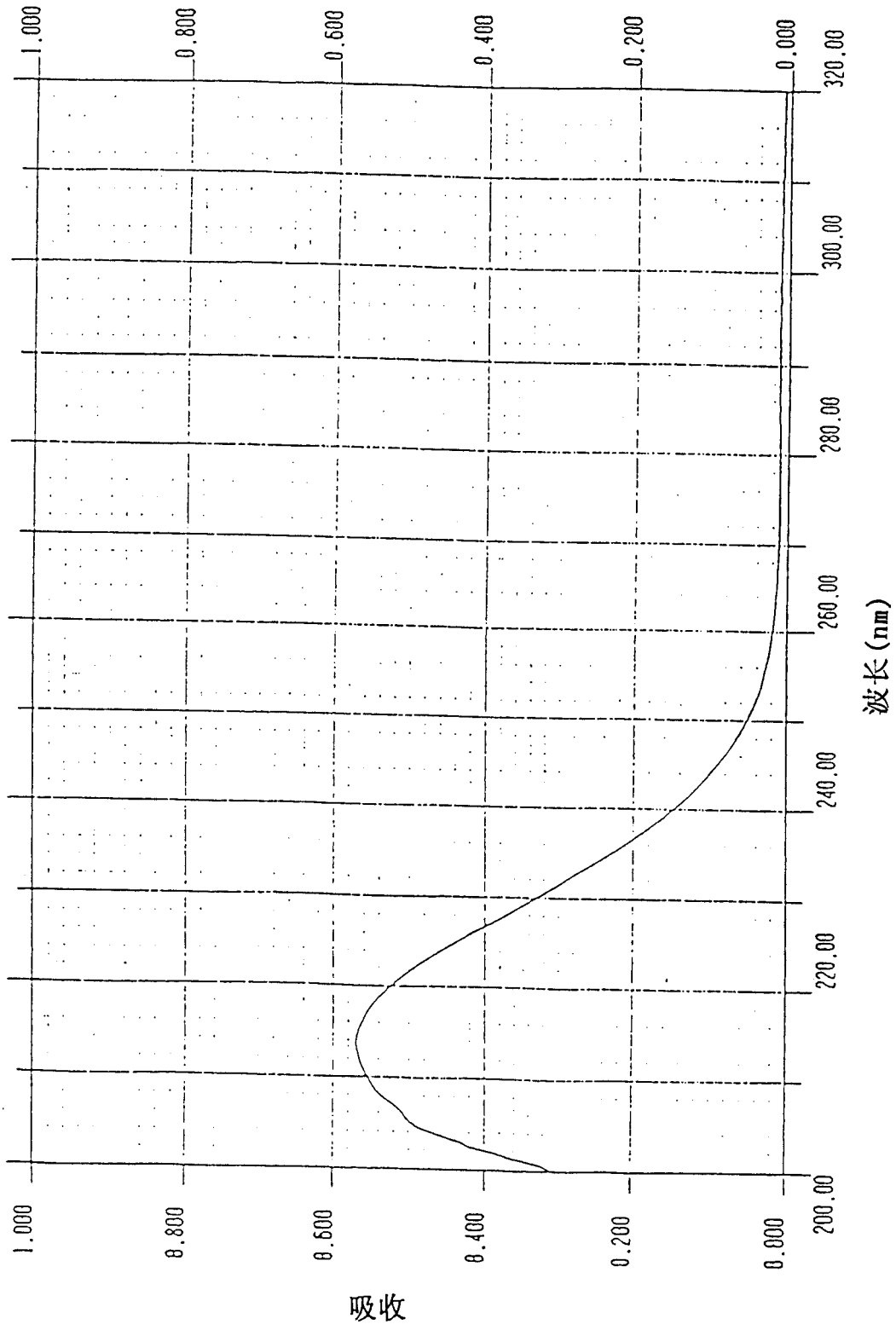

1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
吸收
200.00
220.00
240.00
260.00
280.00
300.00
320.00
波长(nm)

图 19

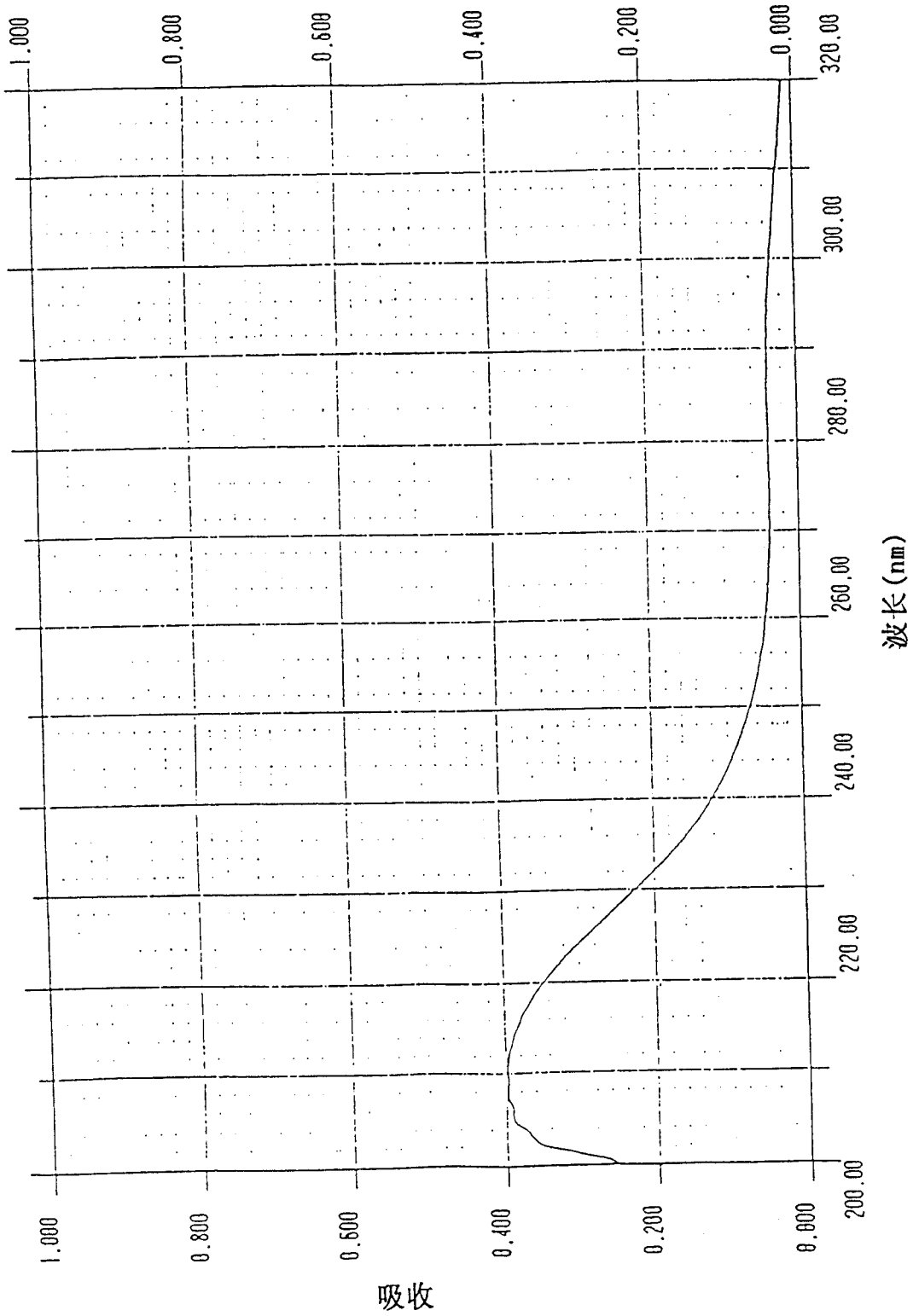

1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
320.00
300.00
280.00
260.00
240.00
220.00
200.00
波长(nm)
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
吸收

图 20

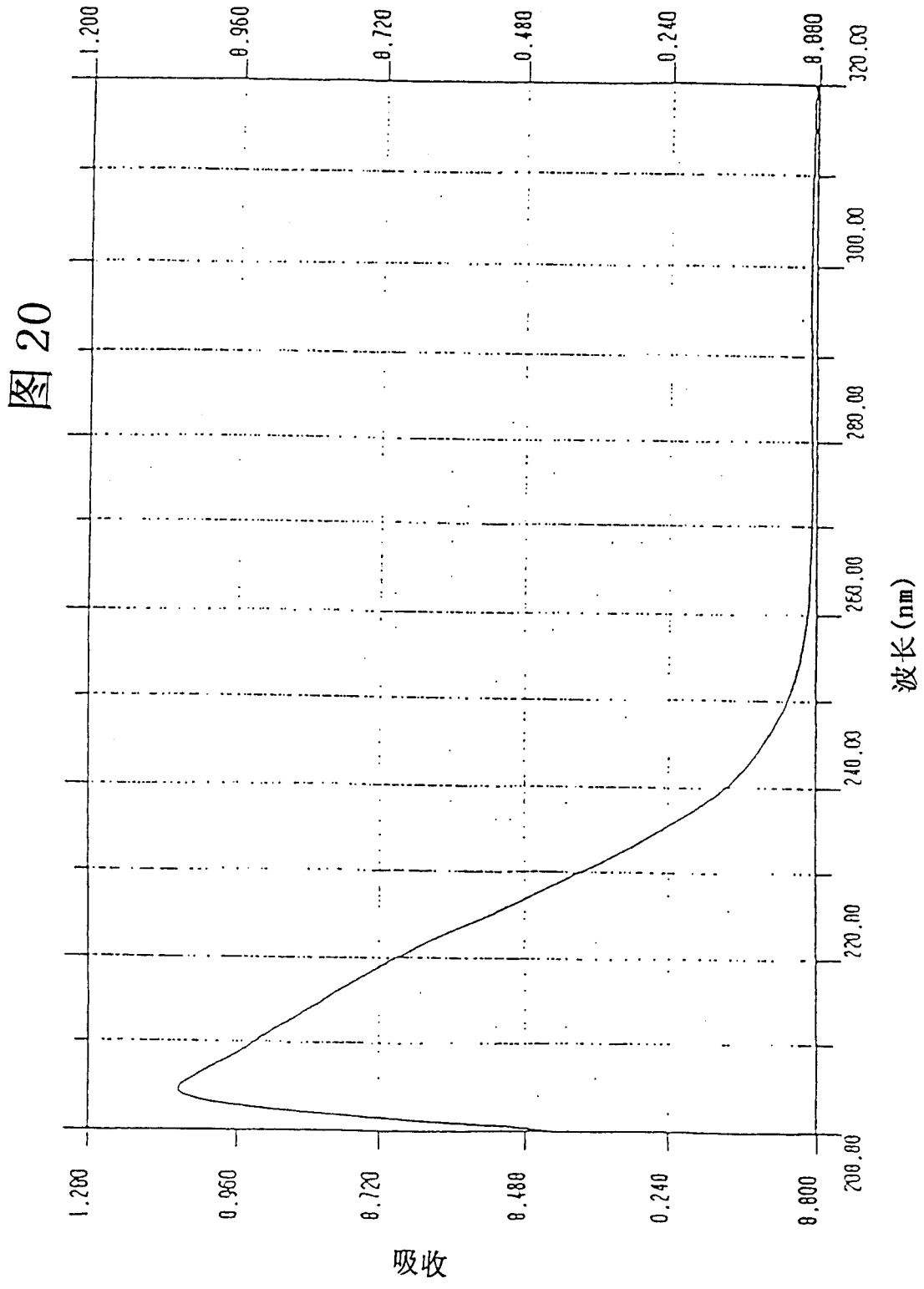

1.200
0.960
0.720
0.480
0.240
0.000
320.00
300.00
280.00
260.00
240.00
220.00
200.00
波长(nm)
吸收

图 21

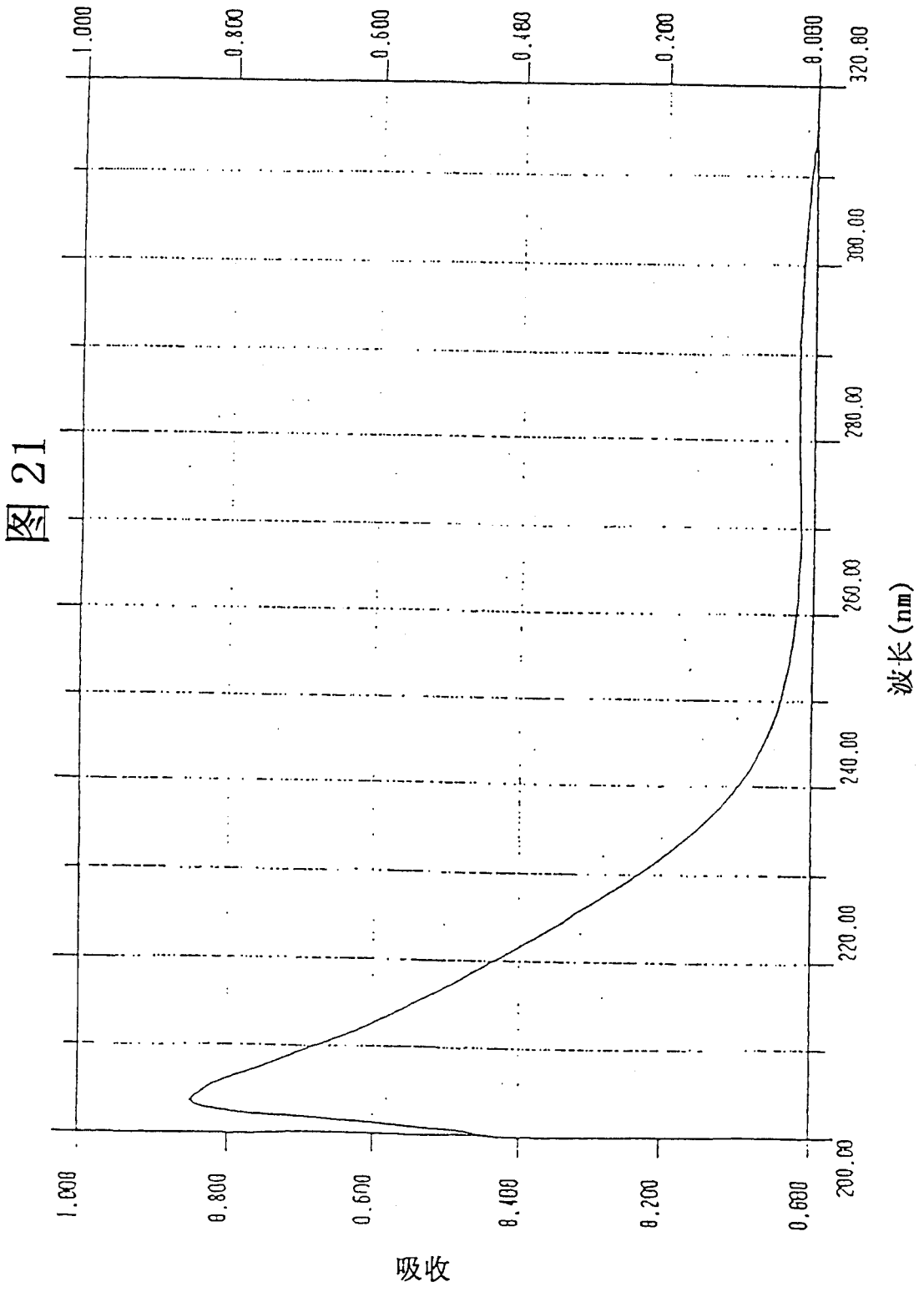

1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
320.00
300.00
280.00
260.00
240.00
220.00
200.00
波长(nm)
吸收

图 22

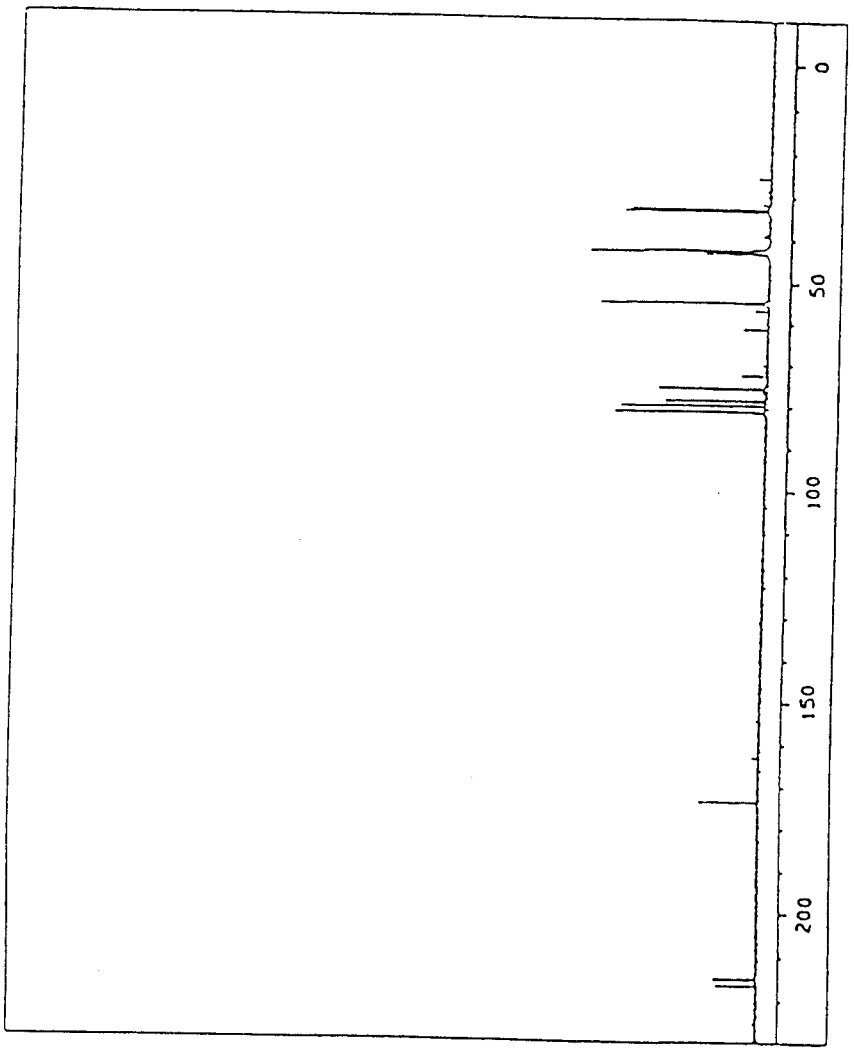


图 23

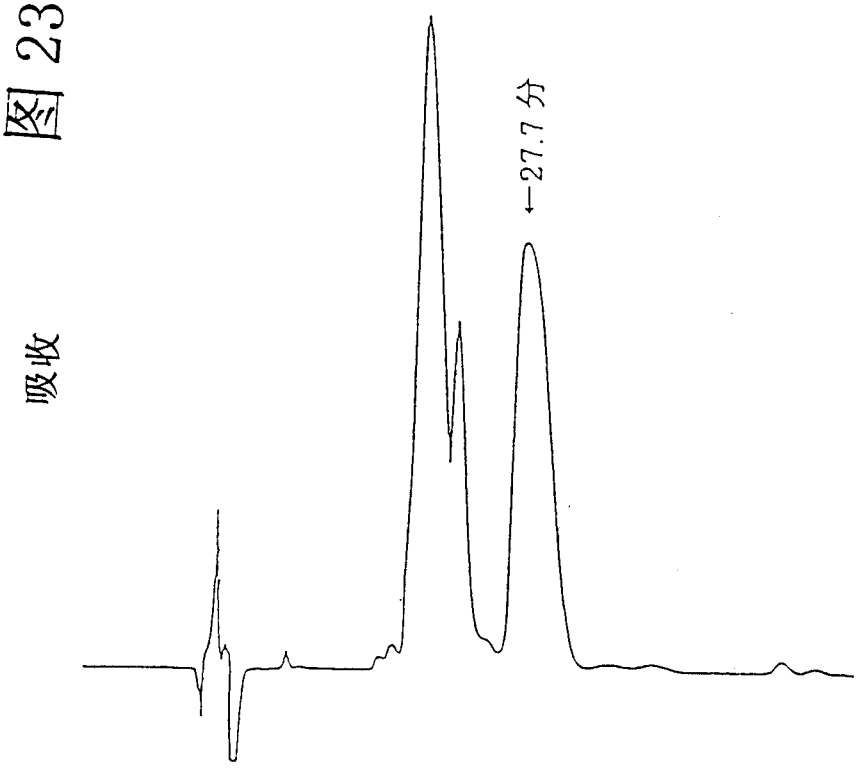


图 24

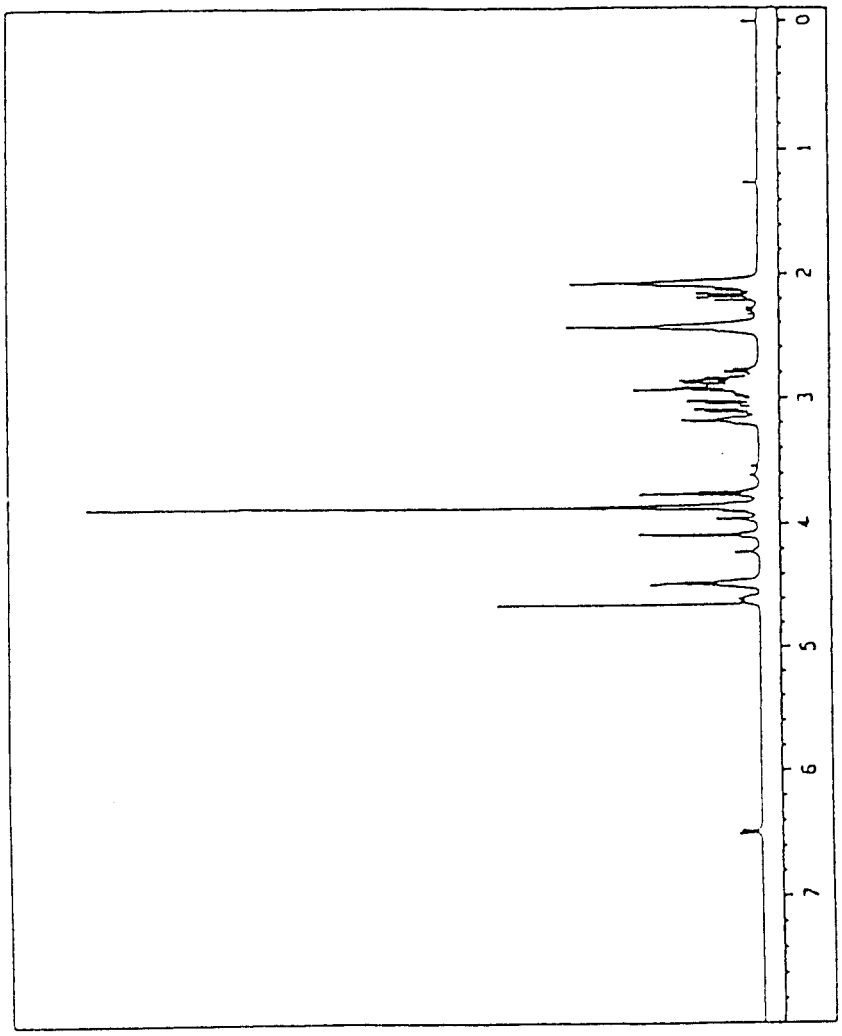


图 25

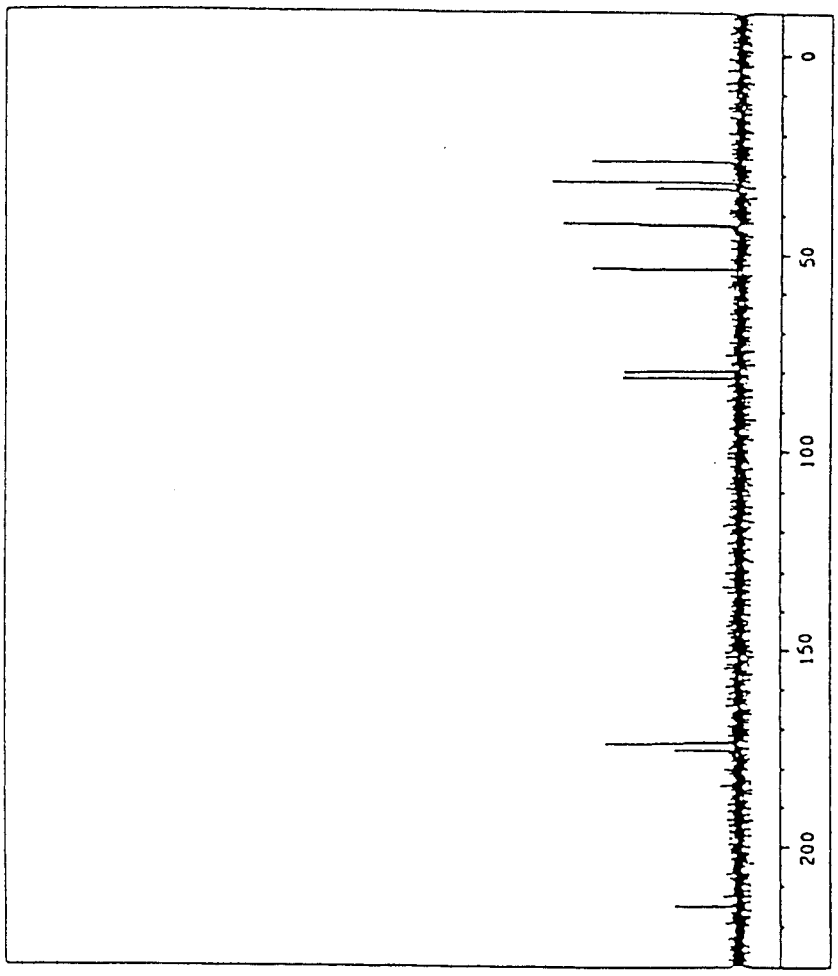


图 26

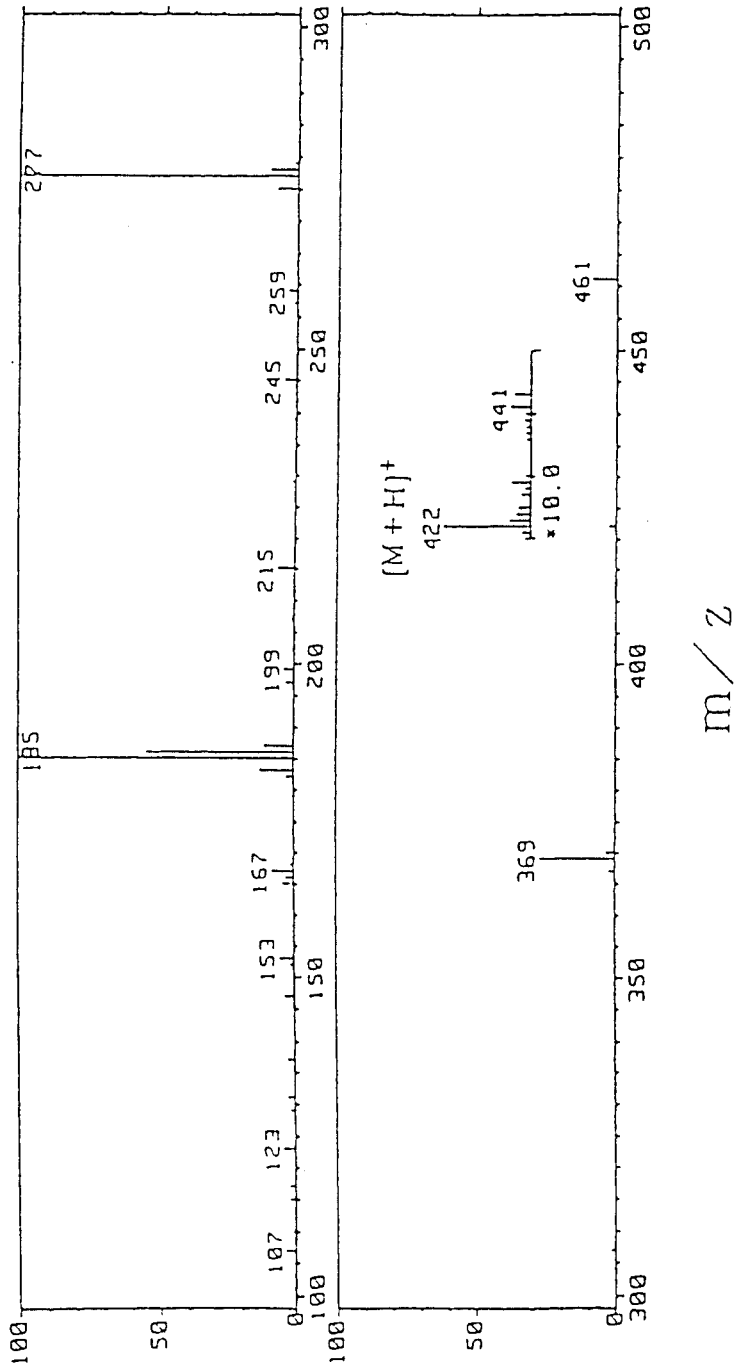

100
50
0
100
50
0
107
123
153
167
185
199
215
245
259
277
[M+H]+
422
441
*10.0
461
369
300
350
400
450
500
m/z
相对强度（%）

图 27

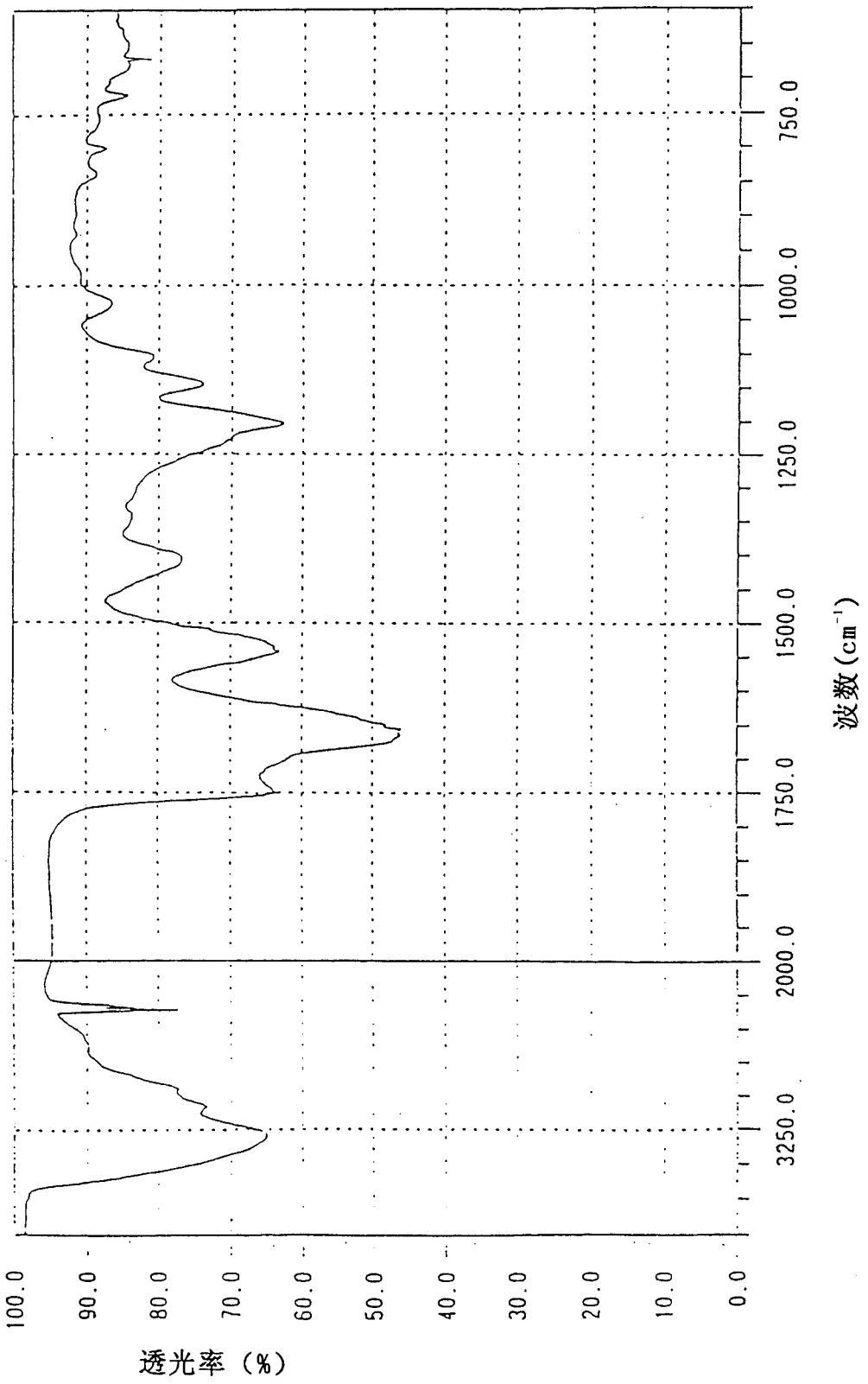

100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
透光率（%）
3250.0
2000.0
1750.0
1500.0
1250.0
1000.0
750.0
波数（cm⁻¹）

图 28

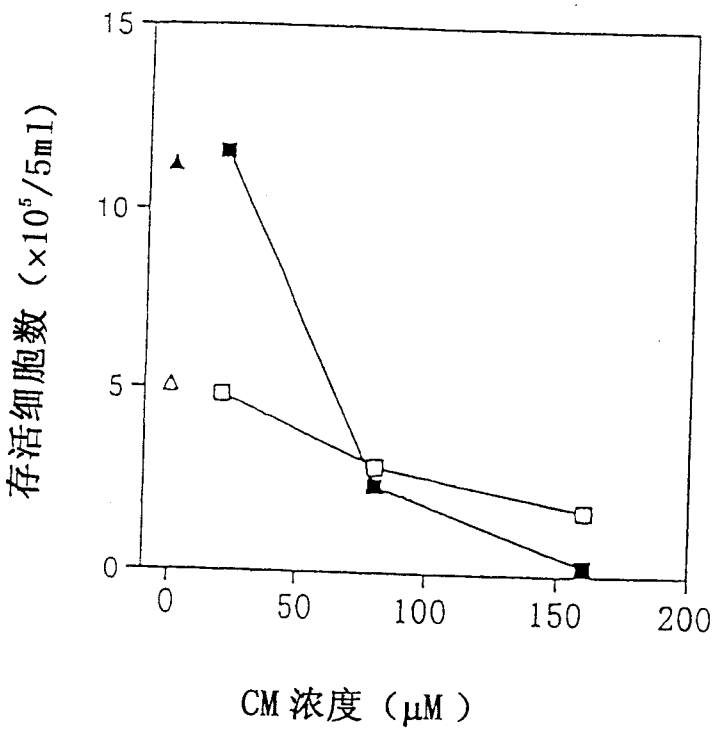


图 29

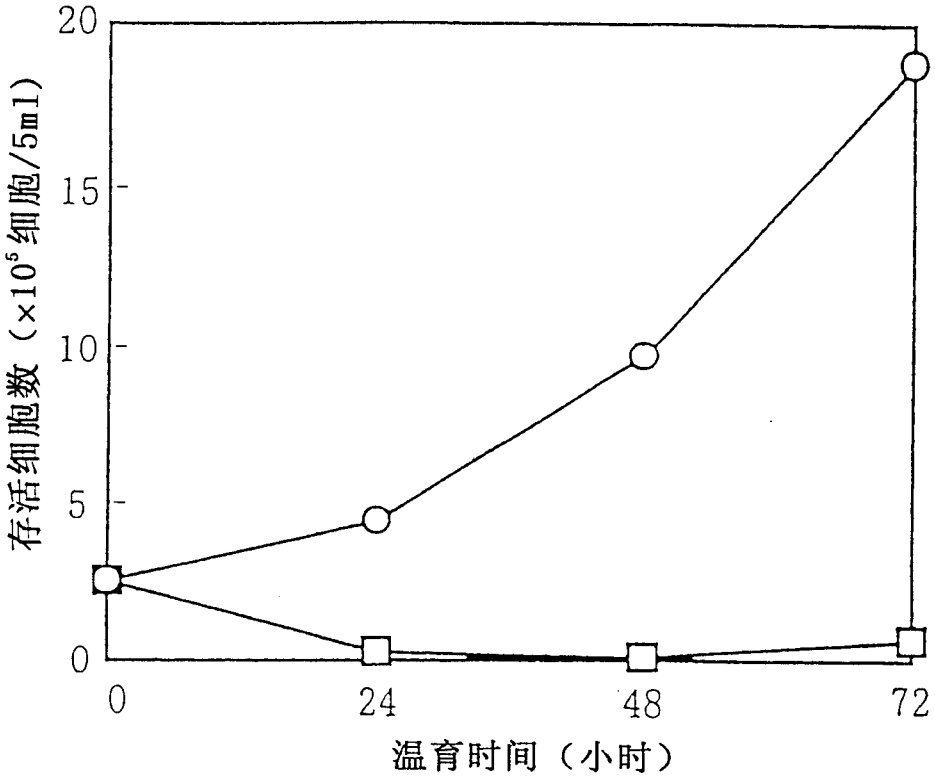


图 30

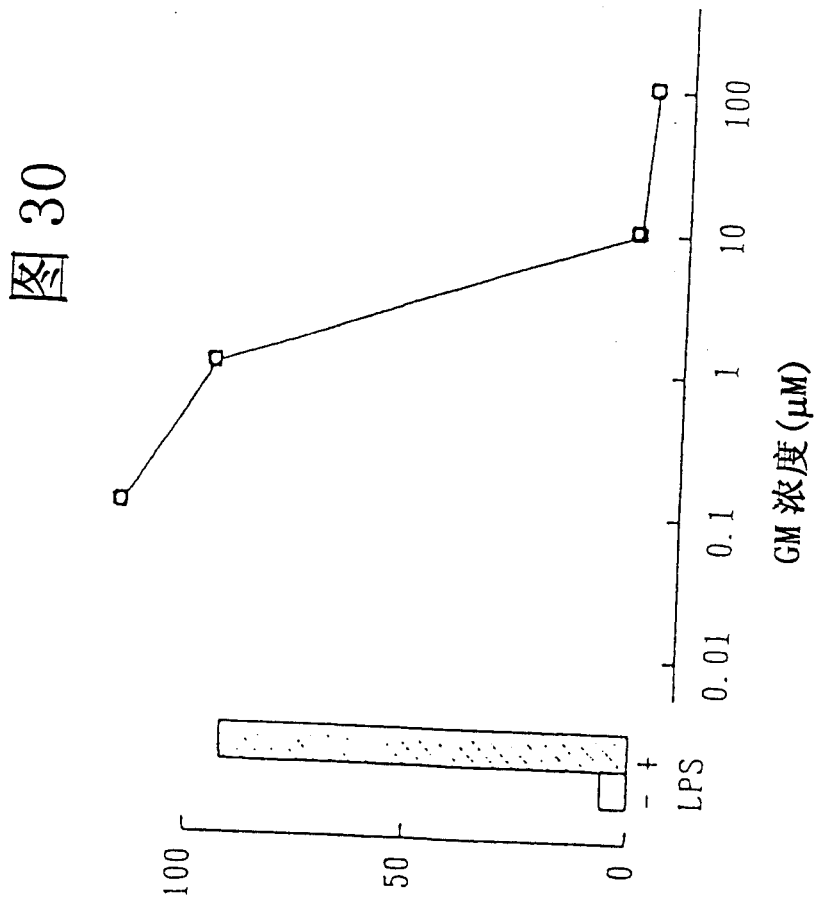


图 31

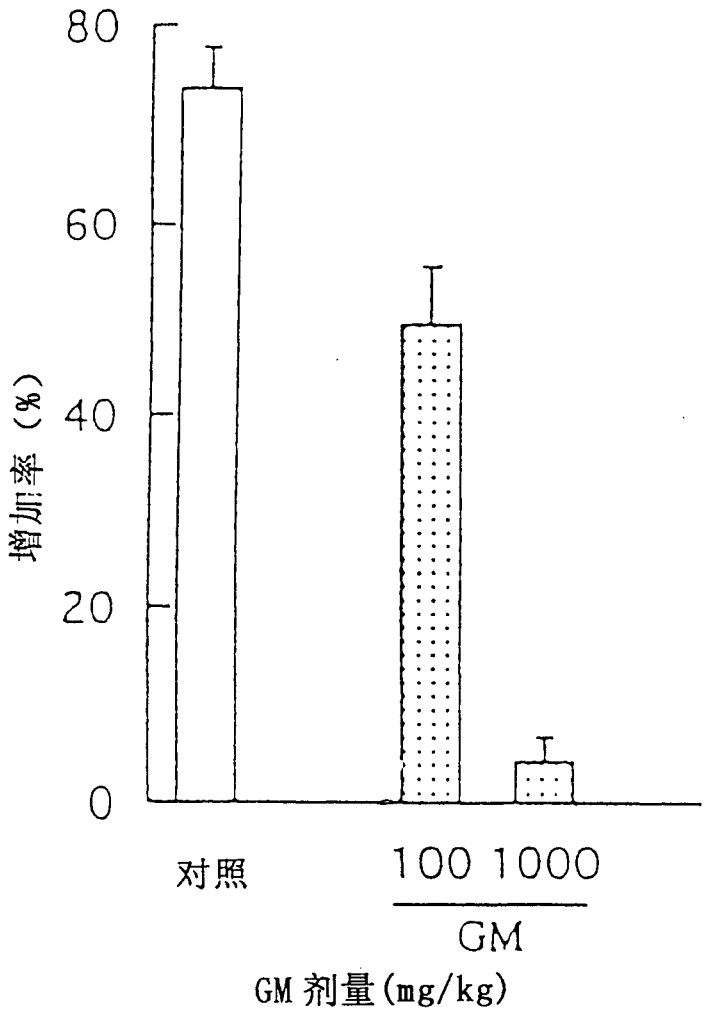


图 32

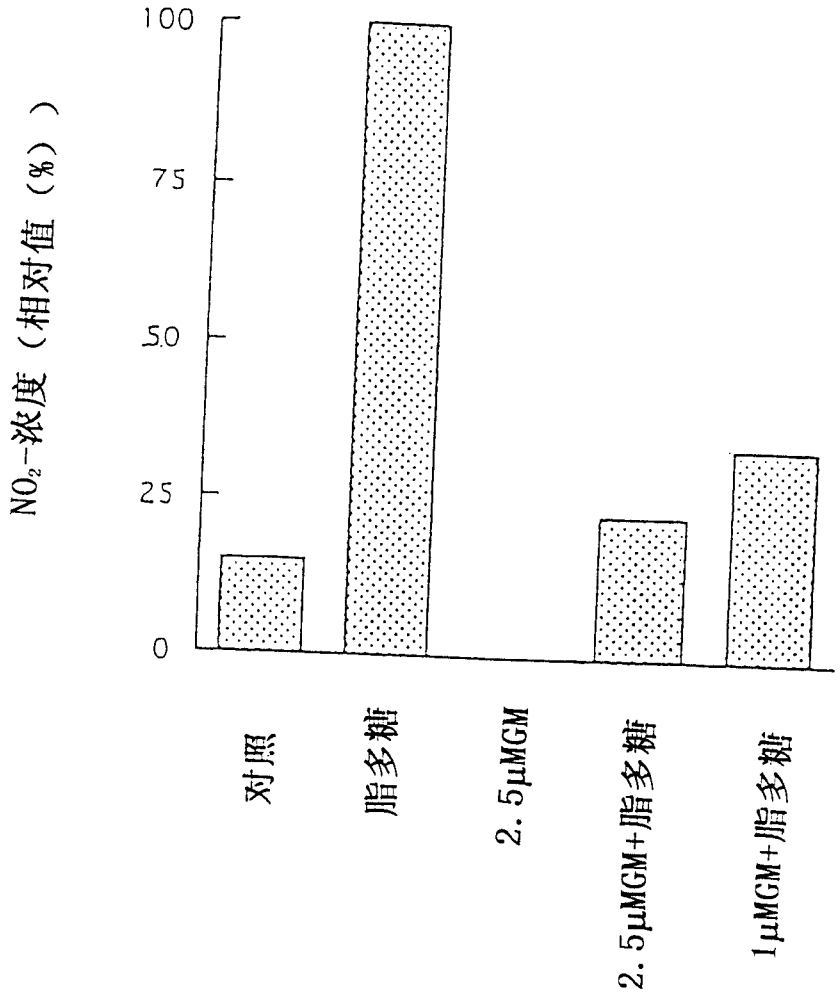


图 33

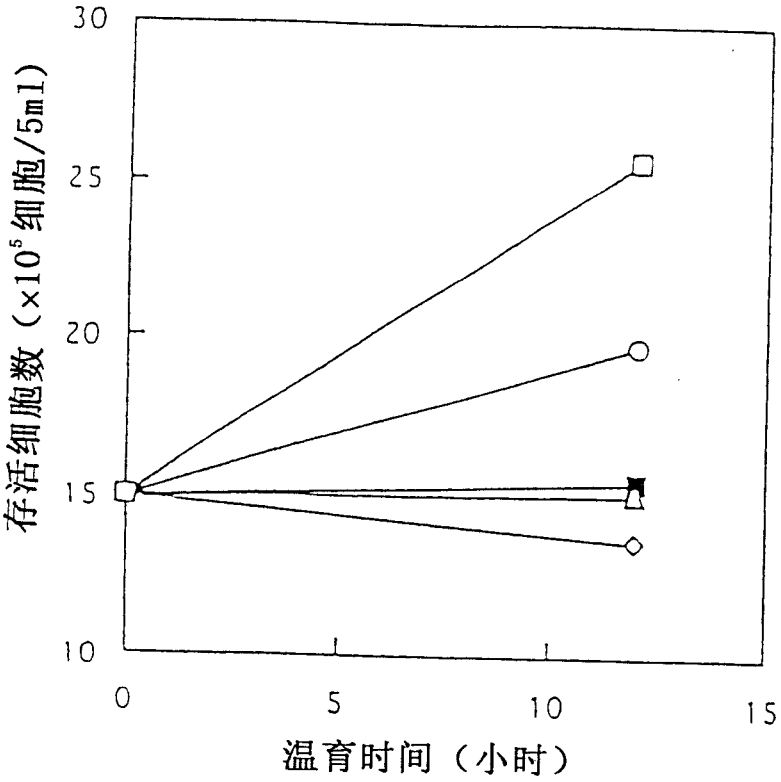


图 34

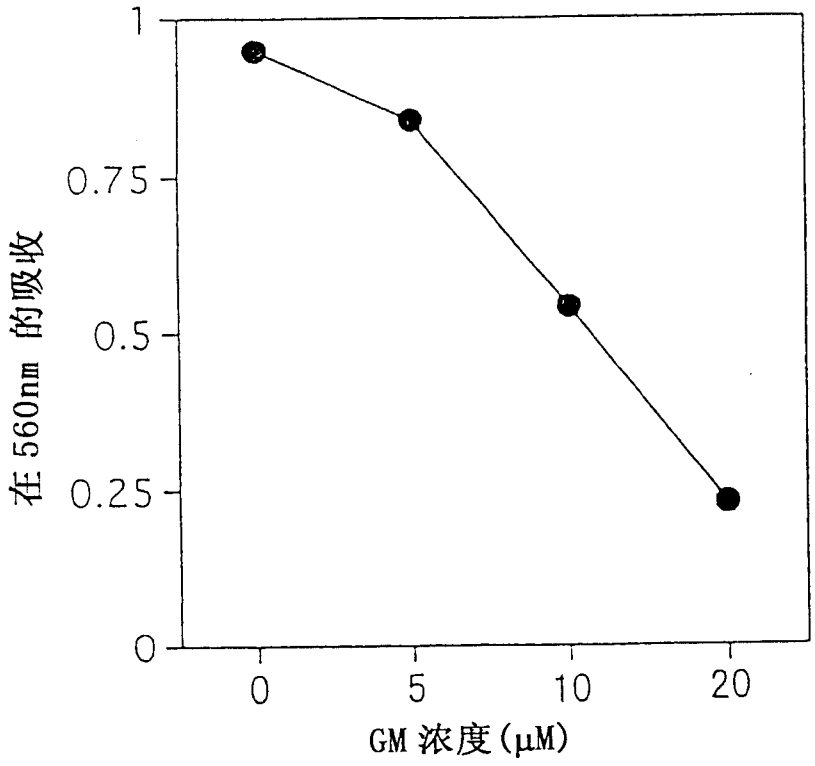


图 35

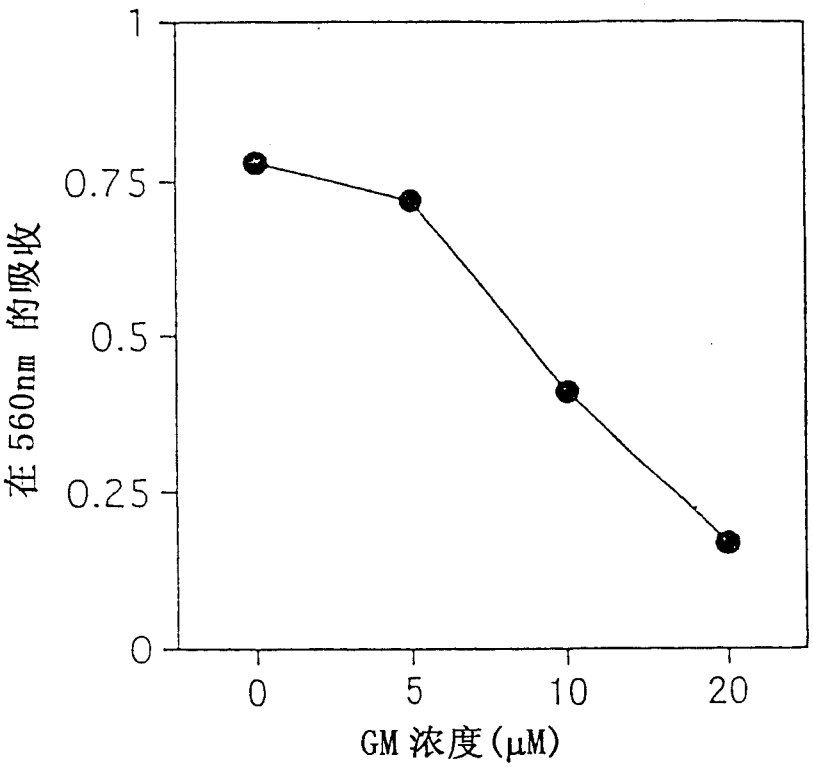


图 36

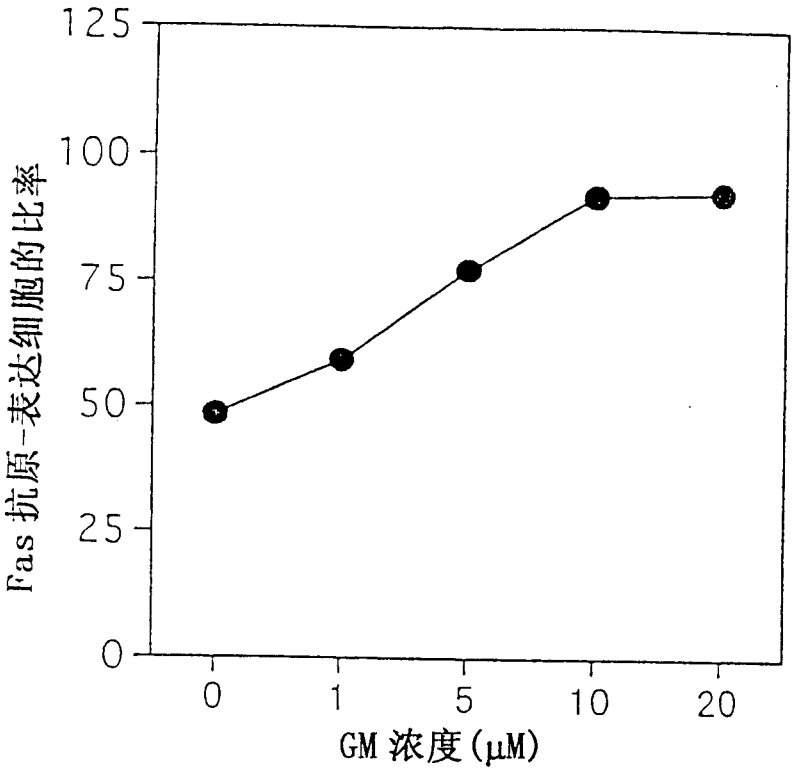


图 37

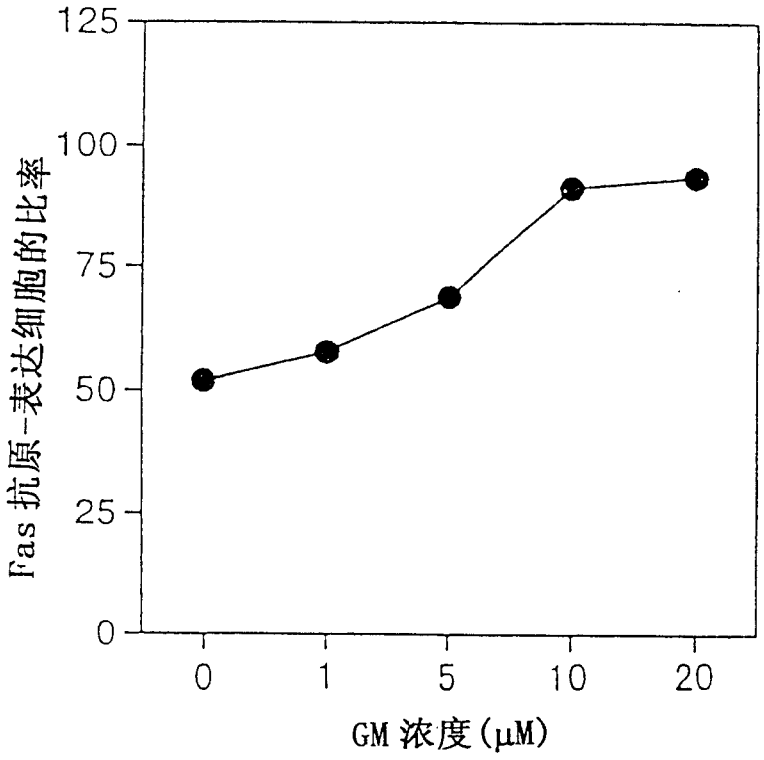


图 38

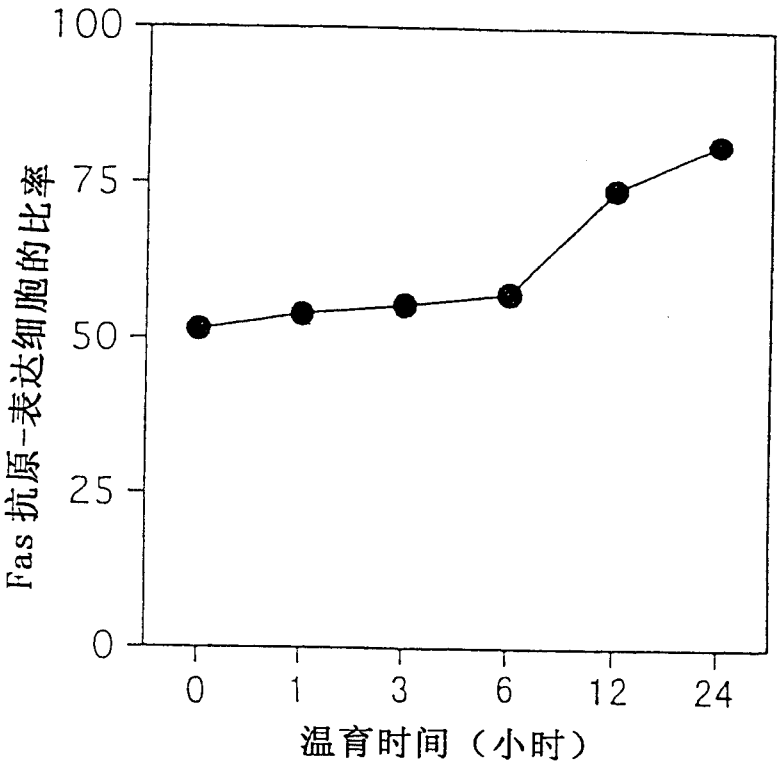


图 39

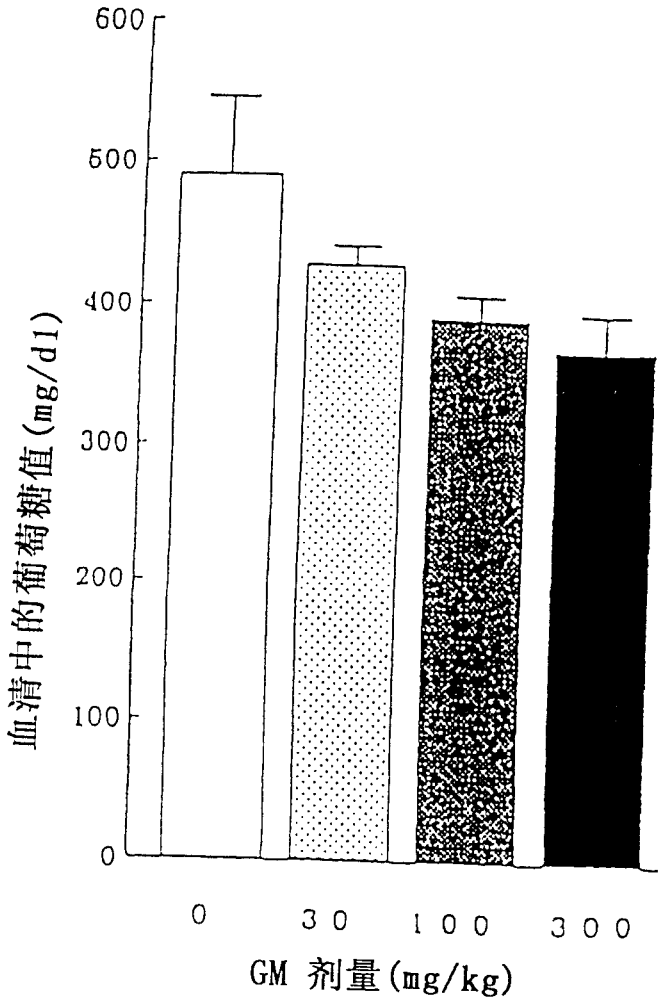


图 40

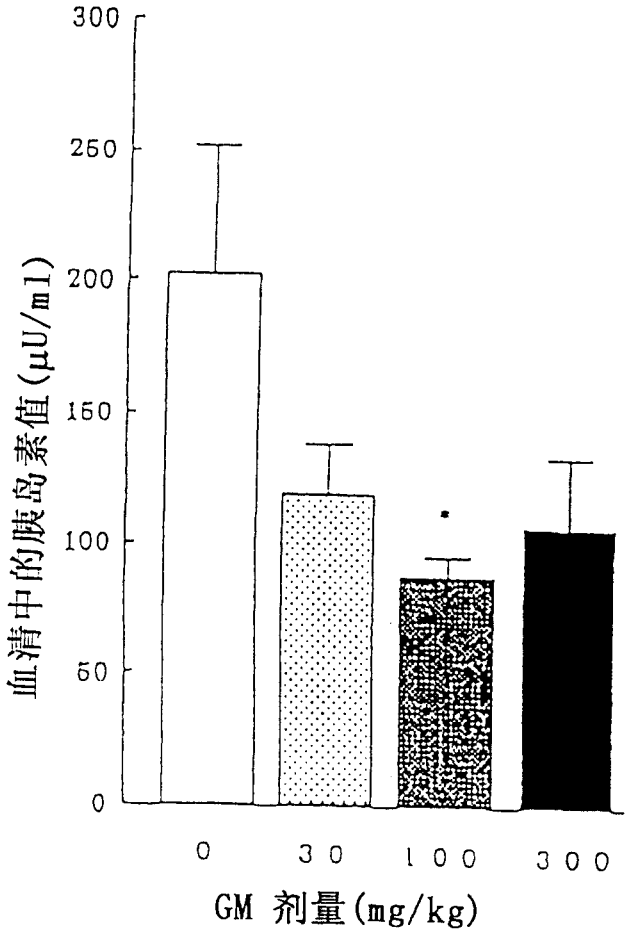


图 41

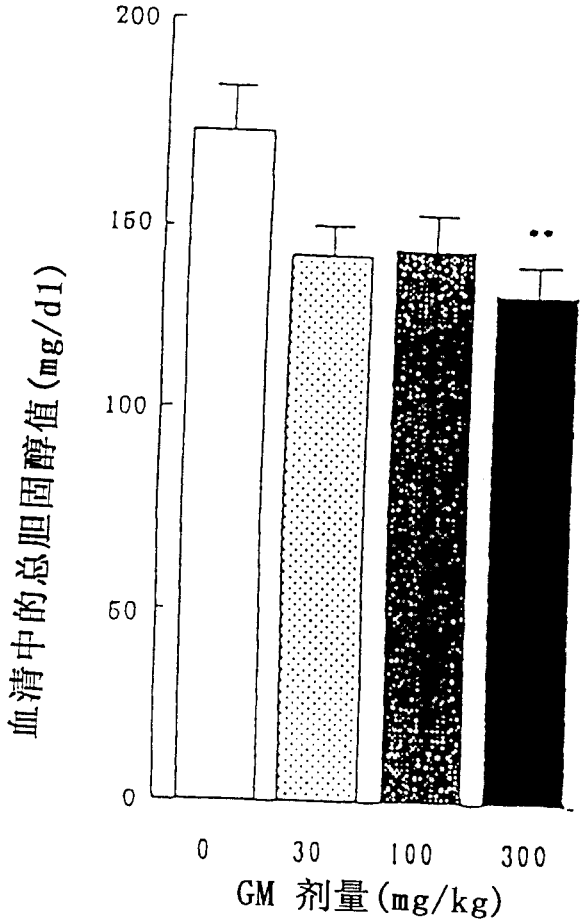


图 42

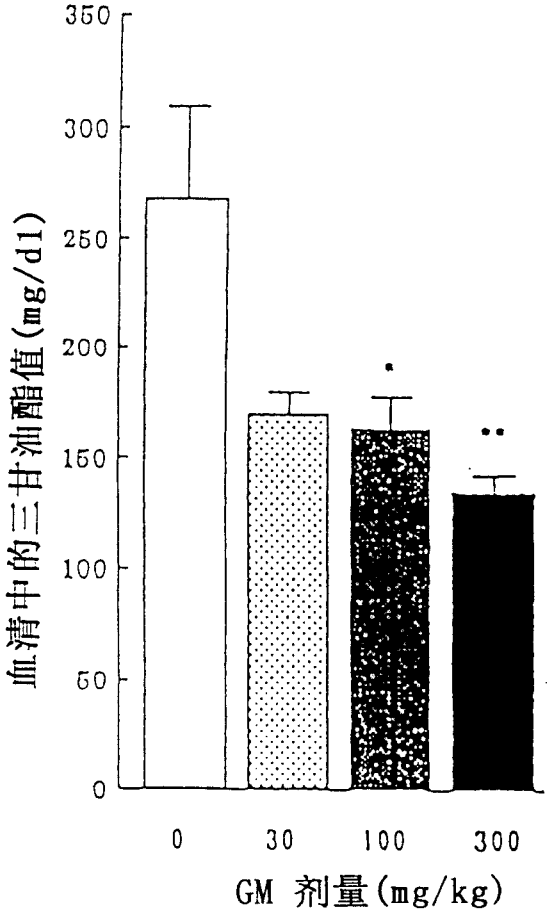

350
300
250
200
150
100
50
0
血清中的三甘油酯值(mg/dl)
*
**
0
30
100
300
GM 剂量(mg/kg)

图 43

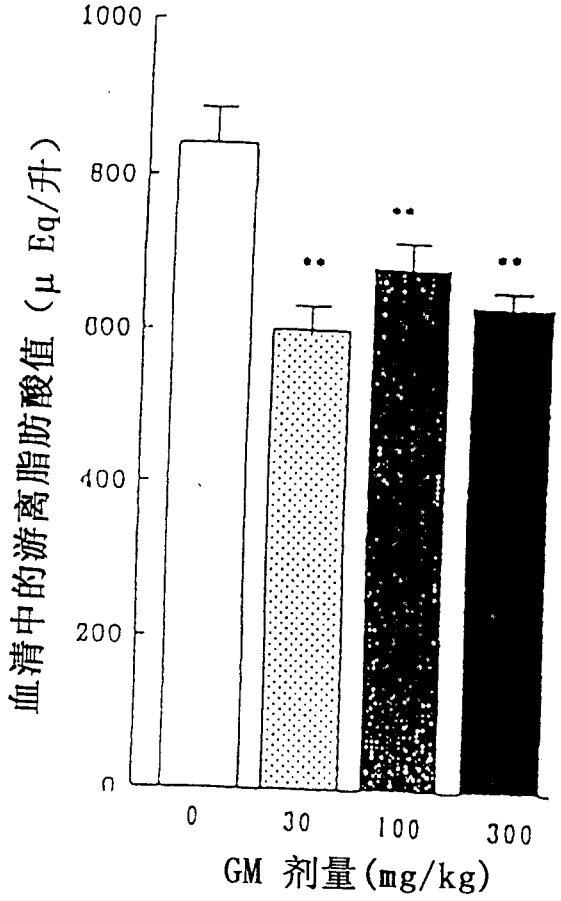


图 44

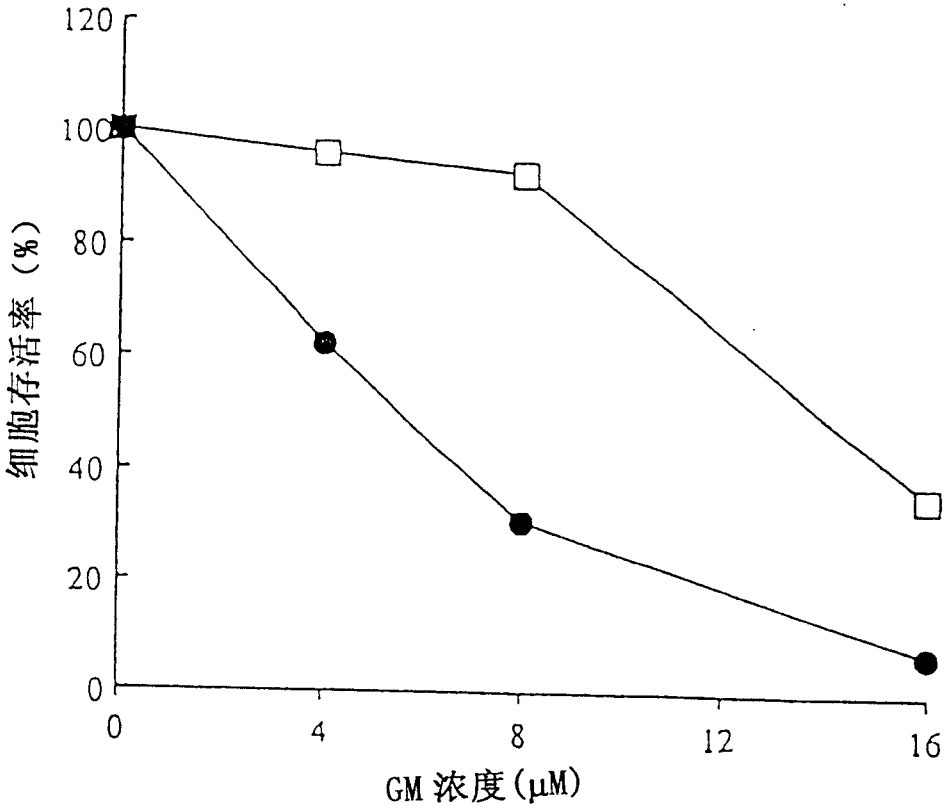


图 45

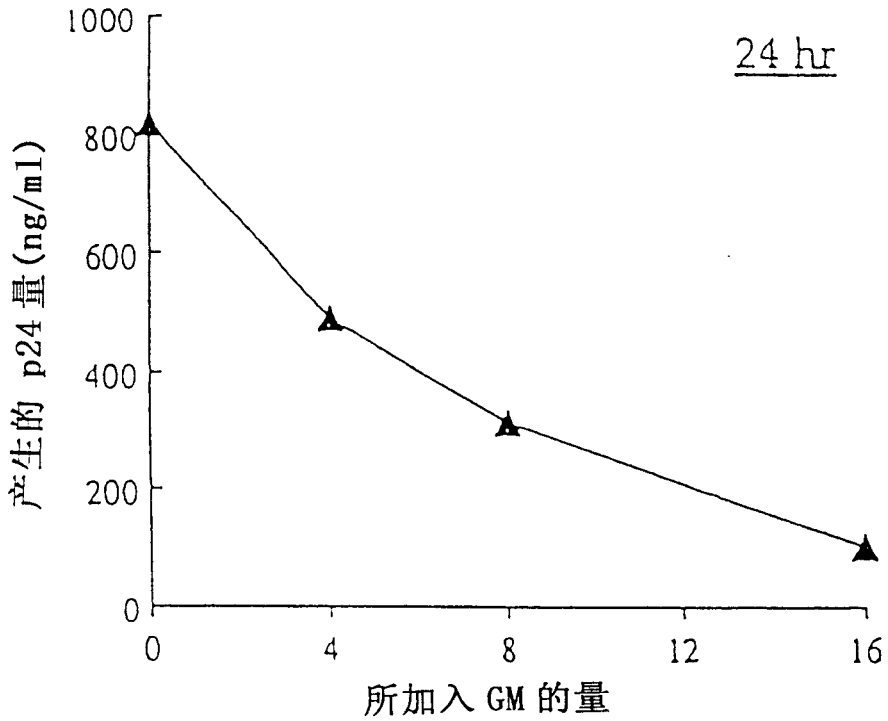


图 46

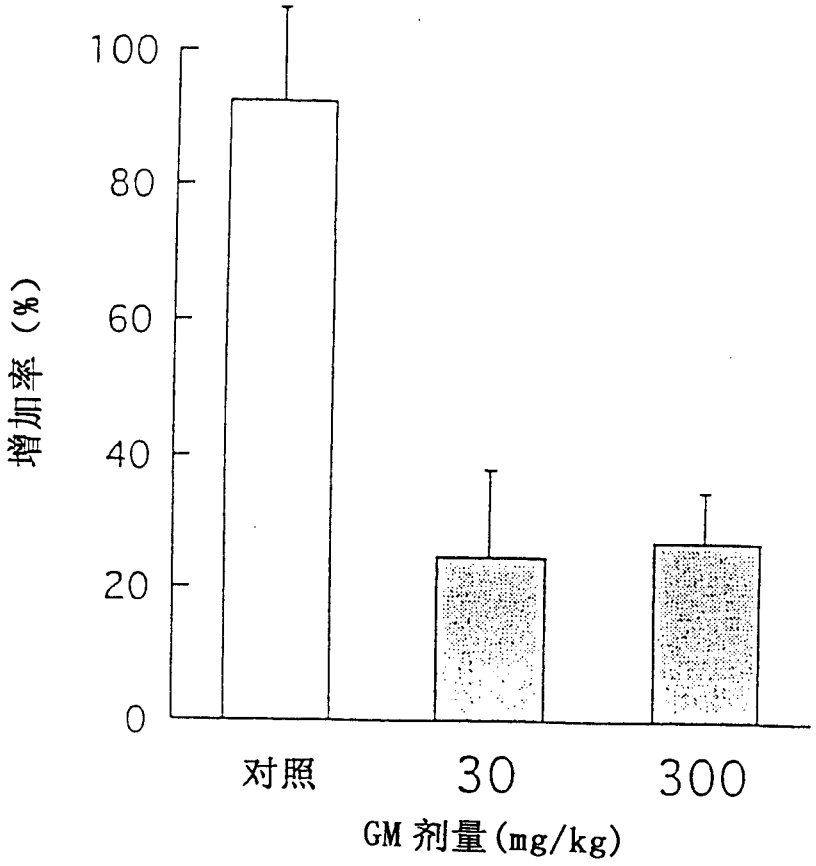
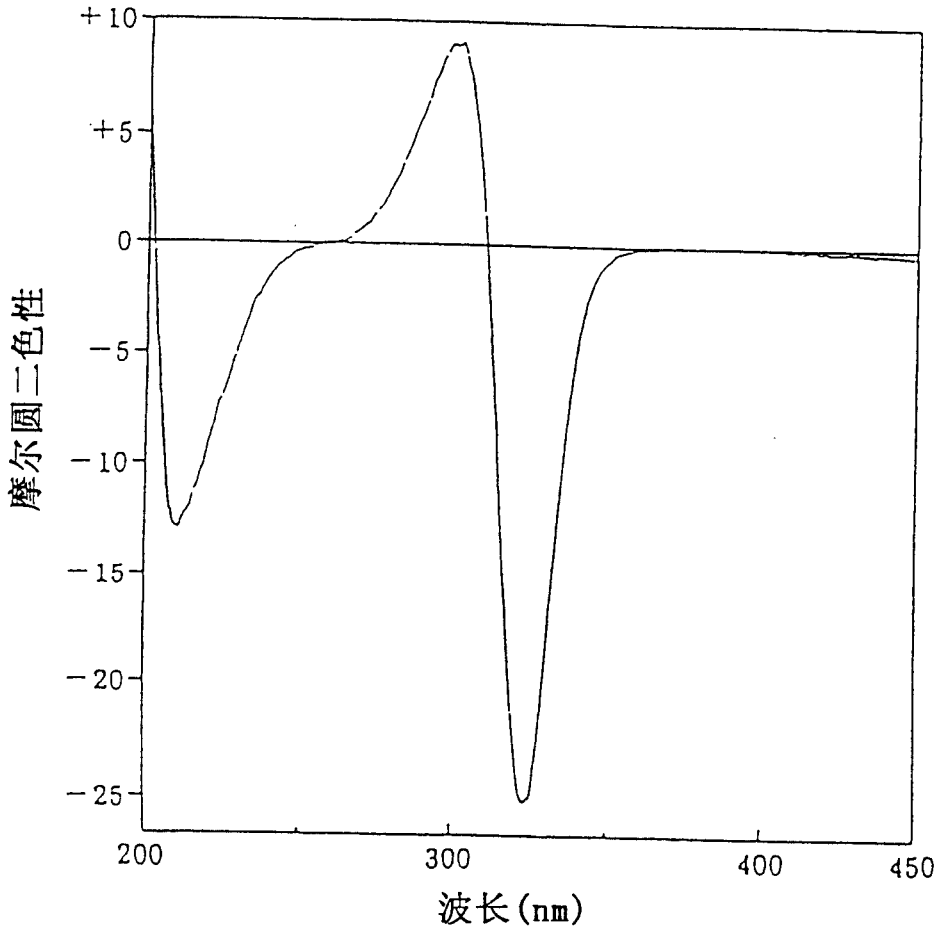


图 47



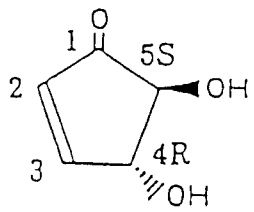
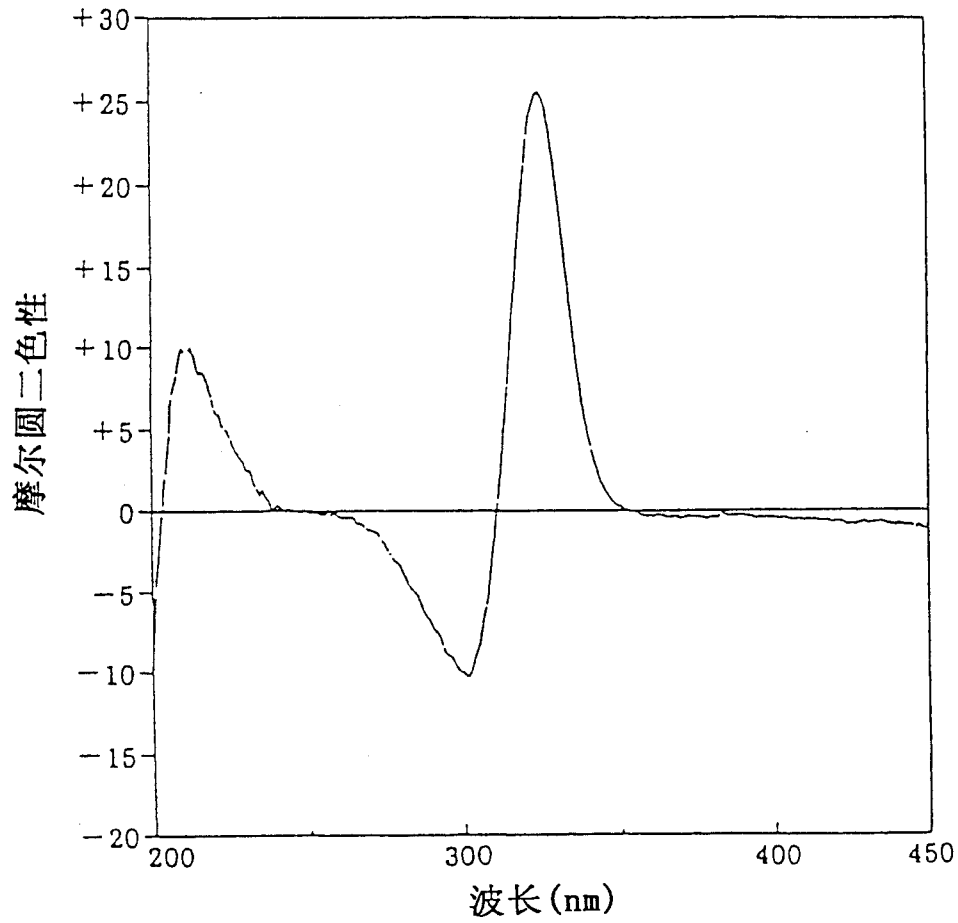
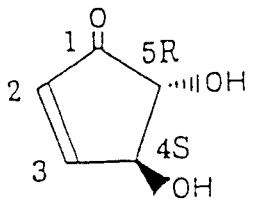


图 48


+30
+25
+20
+15
+10
+5
0
−5
−10
−15
−20
摩尔圆二色性
200
300
400
450
波长(nm)


O
1
5R
OH
2
4S
3
OH