

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， 有 無主張優先權

日本 1999年01月20日 特願平11-011641 有 無主張優先權

日本 1999年09月21日 特願平11-267111 有 無主張優先權

有關微生物已寄存於： 寄存日期： ，寄存號碼：

裝

訂

線

五、發明說明 (1)

技術範圍

本發明係有關治療劑，詳細言之，於醫藥之範圍有用之生理活性物質及該物質之用途。

背景技術

近年來，有關細胞組織之死，細胞凋亡(apoptosis)或自爆死之方式為所矚目。

此細胞凋亡與病理性之細胞死亡之壞死不同，為自最初即併入細胞本身之基因。亦即，任何外部或內部之要因成為扳機，藉由排定細胞凋亡之基因被活化，生合成排定死之蛋白質，又，有的情形作為失活型存在於細胞內之排定死之蛋白質被活化。如此可認為藉由生成之活化型排定死之蛋白質，細胞本身被分解以至於死。

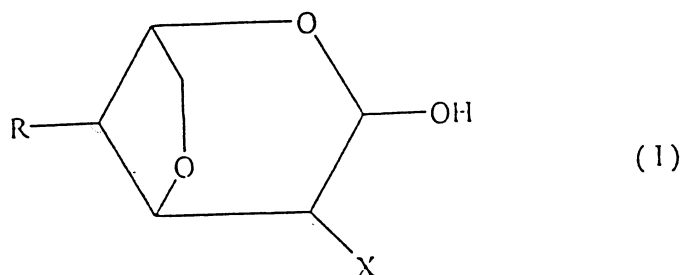
若可使如此之細胞凋亡於所望之組織，細胞表現則可將不要或有害之細胞以自然之形式，自生體排除而深具意義。

發明目的

本發明之目的係提供具有誘發細胞凋亡作用等之生理機能，於醫藥之範圍有用之物質及其之用途。

發明要旨

將本發明概要，則本發明之第一發明係有關以通式I表示之化合物：



五、發明說明 (2)

(式中X為OH或OSO₃H，R為OH以外之取代基，該取代基為藉由其之除去，可於3,6-脫水半乳糖或其之硫酸化物之3位與4位導入不飽和鍵之取代基及/或顯示組織特異性親和性之取代基)。

本發明之第二發明係有關含有以通式I表示之化合物為有效成分之供治療或預防對通式I所表示之化合物顯示感受性之疾病之醫藥。

本發明之第三發明係有關含有、稀釋及/或添加通式I表示之化合物所成之食品或飲料。

圖之簡單說明

圖1:為表示化合物(8)之¹H-NMR光譜之圖。

圖2:為表示化合物(7)之¹H-NMR光譜之圖。

圖3:為表示化合物(10)之¹H-NMR光譜之圖。

圖4:為表示化合物(9)之¹H-NMR光譜之圖。

圖5:為表示化合物(12)之¹H-NMR光譜之圖。

圖6:為表示化合物(11)之¹H-NMR光譜之圖。

圖7:為表示化合物(14)之¹H-NMR光譜之圖。

圖8:為表示化合物(18)之¹H-NMR光譜之圖。

圖9:為表示化合物(17)之¹H-NMR光譜之圖。

圖10:為表示化合物(20)之¹H-NMR光譜之圖。

圖11:為表示化合物(19)之¹H-NMR光譜之圖。

圖12:為表示化合物(22)之¹H-NMR光譜之圖。

圖13:為表示添加化合物(2)培養時之培養基中之NO₂⁻濃度之圖。

五、發明說明 (3)

圖 14: 為表示添加化合物(7)培養時之培養基中之 NO_2^- 濃度之圖。

圖 15: 為表示添加化合物(9)培養時之培養基中之 NO_2^- 濃度之圖。

圖 16: 為表示添加化合物(11)培養時之培養基中之 NO_2^- 濃度之圖。

圖 17: 為表示添加化合物(14)培養時之培養基中之 NO_2^- 濃度之圖。

圖 18: 為表示添加化合物(17)培養時之培養基中之 NO_2^- 濃度之圖。

圖 19: 為表示添加化合物(19)培養時之培養基中之 NO_2^- 濃度之圖。

圖 20: 為表示添加化合物(21)培養時之培養基中之 NO_2^- 濃度之圖。

圖 21: 為表示於各種培養條件下培養時之培養基中之 PGE_2 濃度之圖。

圖 22: 為表示於各種培養條件下培養時之培養基中之 NO_2^- 濃度之圖。

圖 23: 為表示於各種培養條件下培養時之培養基中之 PGE_2 濃度之圖。

圖 24: 為表示氣相層析法結果之圖。

圖 25: 為表示 DGE 與內部標準品之面積比及對應之 DGE 與內部標準品之重量比之檢量線之圖。

圖 26: 為表示自各種化合物轉換為 DGE 之轉換率之時間

五、發明說明 (4)

經過之圖。

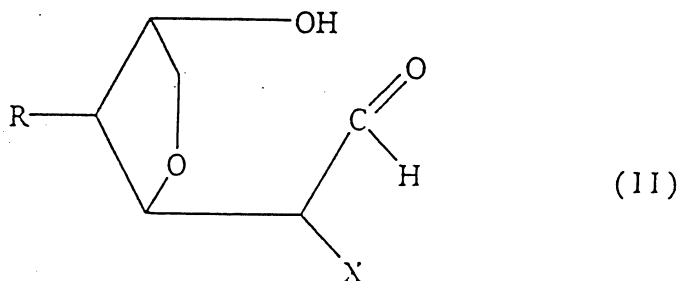
圖 27: 為表示於各種條件培養時之培養上清液中之 IL-10 之濃度之圖。

發明之詳細說明

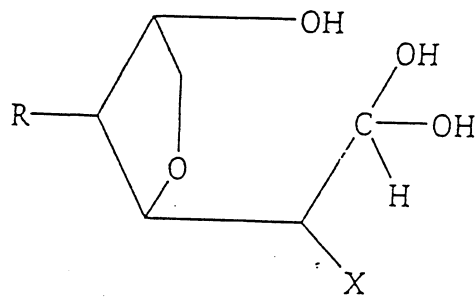
以下，具體說明本發明。

於本發明以通式 I 表示之化合物之製造方法並無特別限定，該化合物可藉由例如本身公知之方法之化學合成法而得。例如，如以下之實施例中所示，藉由將目的之取代基 (R) 導入 3,6-脫水半乳糖或其硫酸化物之 4 位之羥基而得。

於本說明書中，以下，以通式 I 表示之化合物意即以通式 I 表示之化合物，以通式 II 表示之其之醛化物，或以通式 III 表示之其水合物。以通式 I~III 表示之化合物之構造，亦可以其他之方式表示，以通式 I~III 表示亦包括彼等，又亦包括彼等之可能之互變異體。又，於通式 I~III 之立體組態，只要可能所望之活性即可，並無特別限定，為 D-型、L-型或其混合物皆可。

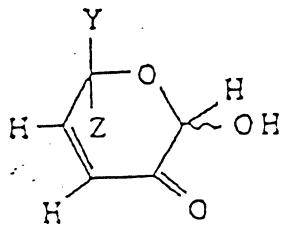


五、發明說明 (5)



(III)

為本發明之代表性化合物之於還原末端具有3,6-脫水半乳糖或其之硫酸化物，有R鍵結於其之3,6-脫水半乳糖或其之硫酸化物之4位之以通式I表示之化合物，於生理條件下，例如還原末端之3,6-脫水半乳糖或其之硫酸化物變化成以通式IV表示之化合物：



(IV)

(Y, Z 為 H 或 CH_2OH ，但 Z 為 CH_2OH 時 Y 為 H，Z 為 H 時 Y 為 $-\text{CH}_2\text{OH}$)。

變化之以通式IV表示之化合物於生理環境下，顯示細胞凋亡誘發能、抗癌作用、抑制活性氧產生之作用、抑制一氧化氮產生之作用、 α -糖苷酶抑制活性、抑制介白素產生之活性、誘導血紅素加氧酶產生之活性或免疫調節作用等之生理作用。

於本發明R為OH以外之取代基，只要例如於生成以通式IV表示之化合物之反應，作為離去基，可將不飽和鍵導入3,6-脫水半乳糖或其之硫酸化物之三位與四位之間及/

五、發明說明 (6)

或顯示組織特異性親和性者即可。作為R之例，可舉飽和烴、不飽和烴、芳烴、糖、糖鏈、核酸、脂質、肽、蛋白質、糖蛋白質、糖脂質、磷脂質等。

作為R與3,6-脫水半乳糖或其之硫酸化物之四位之鍵結方式並無特別限定，只要例如於生成以通式IV表示之化合物反應可切斷鍵結即可，可例示酯鍵結、醚鍵結等。

作為R，藉由使用顯示組織親和性之特定之取代基，使通式I所表示之化合物特異性局部存在於特定之臟器、細胞、器官等之特定場所，藉由於其位置除去該取代基，生成通式IV表示之化合物，可使其生理活性於目的之特定部位表現。又，另外，可控制表現時之時間、強度。

另外，藉由使用特定之取代基作為R，亦可提高通式I表示之化合物於生體之吸收性。亦即，藉由使用特定之取代基作為R，可使於投予後不立刻表現活性，更有效率地於體內吸收，可使以通式IV表示之化合物於任意之局部被濃縮後，只於其部位表現生理活性。

亦即，根據本發明提供以通式I表示之化合物為有效成分之於生體內生成通式IV所表示之化合物用之前體藥物。

作為該前體藥物，將通式I所表示之化合物作為有效成分，將此與公知之醫藥用載劑組合，藉由本身公知之方法做成製劑即可。一般言之，將該組合物與醫藥上可接受之液狀或固體狀載劑摻合，且依須要加溶劑、分散劑、乳化劑、緩衝劑、穩定劑、賦形劑、黏合劑、崩散劑、潤滑劑

五、發明說明(7)

等，可做成錠劑、顆粒劑、散劑、粉末劑、膠囊劑等之固形劑、通常液劑、懸浮劑、乳劑等之液劑。又可將此做成於使用前藉由添加適當之載劑即可做成乳狀之乾燥品。

該前體藥物亦可藉由口服劑及注射劑、點滴用劑等之非口服劑之任一種投藥。

醫藥用載劑可按上記投予形式及劑型而選擇，口服劑之情形，利用例如澱粉、乳糖、白糖、甘露醇、羧甲基纖維素、玉米澱粉、無機鹽等。又，當製備口服劑時，另外亦可摻合黏合劑、崩散劑、界面活性劑、潤滑劑、流動促進劑、矯味劑、著色劑、香料等。

一方面，非口服劑之情形，依照本身公知之方法，將為前體藥物之有效成分之以通式I表示之化合物溶解乃至懸浮於作為稀釋劑之注射用蒸餾水，生理食鹽水、葡萄糖水溶液注射用植物油、麻油、花生油、大豆油、玉米油、丙二醇聚乙二醇等，按須要加殺菌劑、穩定劑等諸劑、無痛化劑等而製備。

本發明之前體藥物，按製劑形式之適當投予途徑投藥。投予方法亦無特別限定，可藉由外用及注射。注射劑可投予例如靜脈內、肌肉內、皮下皮內等，外用劑亦包含栓劑。

作為前體藥物之投予量，依其製劑形式、投予方法、使用目的及適用於此之患者之年齡、體重、症狀而適宜設定，並非一定但一般含於製劑中之有效成分之量，成人每天為10微克~200毫克/公斤。當然投予量依種種條件而

五、發明說明 (8)

異，有比上述投予量更少之量，即充分之情形，或亦有必須超過範圍之情形。本發明之藥劑除了照原樣經口投予外，亦可添加於任意之飲食品中使日常攝取。

本發明之以通式I表示之化合物具有細胞凋亡誘發活性、抑癌活性、抑制活性氧產生活性、抑制過氧化脂質自由基產生活性、抑制一氧化氮產生活性等之抗氧化活性、抗病原微生物活性、抗變異原活性、免疫調節作用、抗炎症作用、抗過敏作用、調節細胞素產生作用、抗風濕作用、抗糖尿病作用、誘導血紅素加氧酶產生活性等之生理活性，以通式I所表示之化合物為有效成分，可製造需要誘發細胞凋亡之疾病、癌性疾病、需要抑制活性氧產生之疾病、需要抑制過氧化脂質自由基產生之疾病、需要抑制一氧化氮產生或要調節免疫、抑制炎症、抑制過敏、需要調節細胞素產生之疾病，需要誘導血紅素加氧酶產生之疾病等之治療劑或預防劑，亦即對細胞凋亡誘發劑、抑癌劑、活性氧產生抑制劑、過氧化脂質自由基產生抑制劑、一氧化氮產生抑制劑等之抗氧化劑、抗菌劑、抗病毒劑、抗變異原劑、血糖上升抑制劑、抗高脂質劑、免疫調節劑、抗炎症劑、抗過敏劑、細胞素產生調節劑、抗風濕劑、抗糖尿病劑、血紅素加氧酶產生誘導劑等之該化合物顯示感受性之疾病之治療用或預防用醫藥。

亦即，含有通式I表示之化合物為有效成分之本發明之細胞凋亡誘發劑，有效於排除自體免疫疾病患者之自體反應性淋巴球、癌細胞、病毒感染細胞等，藉由使細胞凋亡

五、發明說明 (9)

於所望之組織、細胞表現，可將不要或有害之細胞以自然之形式自生體排除。本發明之細胞凋亡誘發劑有效之疾病，為例如全身性紅斑性狼瘡、免疫介在性絲球體腎炎、多發性硬化症、膠原病等之自體免疫疾病、風濕等。

本發明之細胞凋亡誘發劑可使用於細胞凋亡誘發方法，該方法有用於細胞凋亡誘發機構之闡明、細胞凋亡誘發劑、細胞凋亡誘發抑制劑之篩選等。

本發明中使用之通式I表示之化合物有用於氧化物質，例如抑制活性氧產生，以該化合物為有效成分之活性氧產生抑制劑等之抗氧化劑，有用於治療或預防起因於活性氧產生及/或過剩之疾病。

活性氧可大分為自由基與非自由基之活性氧。自由基系活性氧有羥基自由基、羥基過氧自由基、過氧自由基、烷氧基自由基、二氧化氮、一氧化氮(以下略為NO)、蒂埃爾(Thiele)自由基，過氧化物。一方面，非自由基系活性氧有單獨氧、過氧化氫、脂質氫過氧化物、次氯酸、臭氧、過氧亞硝酸。任一者皆與許多之病態，亦即各種之炎症性疾病、糖尿病、癌、動脈硬化、神經疾病、缺血再灌注障礙等。

於生體內經常以幾個途徑生成低濃度之活性氧。此為生理上自粒線體等之電子傳遞系漏出之超氧化物及過氧化氫，藉由銅及鐵等之過渡金屬催化之羥基自由基，藉由嗜中性球及單核球等生成之防禦感染用之次氯酸、藉由精胺酸生成之NO等，任一者皆無法避免。對於此等之活性氧

五、發明說明 (10)

生成，生體保有作為活性氧消除系之酵素、低分子化合物，保持生成與消除之平衡。然而，此等之途徑不知以何等原因被活化，反之消除系被失活化、活性氧生成系相對於消除系具優勢時，生體受到氧化性障礙。如此之狀態稱為氧化壓力。

另外，不只生體內失去平衡之情形，生體亦常另受到來自大氣及食品等之生體外之氧化壓力，過日常生活時無法避免氧化壓力。

亦即，氧化壓力如上述般，與種種疾病有關，生體常常遭受與藉由氧化壓力之疾病或與疾病之惡化有關之狀況。因而，本發明之抗氧化劑例如活性氧產生抑制劑有用於如此之氧化壓力所引起之疾病之預防、治療或防止惡化。

又，必然糾纏氧化壓力者為脂質過氧化反應，此反應為過氧化脂質自由基一產生則一舉進行之反應。因此，生成之4-羥基-2-壬烯醛(HNE)為以谷胱甘肽及蛋白質為特異性標的毒性醛。其HNE與蛋白質之反應生成物於各種病態組織檢出，被認為是否為有關氧化壓力之疾病病態之誘發因子，因此，含有可抑制過氧化脂質自由基之生成之本發明中使用之抗氧化物質，亦即以通式I表示之化合物作為有效成分之抗氧化劑，有用於預防及治療藉由氧化壓力之生活習慣病疾病。

NO為來自內皮細胞之血管平滑肌鬆弛因子(FDRF)之本體[Nature，第327卷，第524~526頁(1987)]。根據本發明提供抑制NO產生所必要之疾病治療劑或預防劑。

五、發明說明 (11)

於本發明，必要抑制NO產生之疾病並無特別限定，包括例如毒性休克及某種藉由細胞素治療等伴隨之全身性血壓降低、血壓反應降低、糖尿病、血管機能不全、病理性血管擴張、組織損傷、心臟血管系缺血、痛感過敏症、腦缺血、血管新生之疾病、癌等之疾病。

血管新生為固形癌之增大所必須，血管內皮增殖因子/血管透過性亢進因子(VEGF)於此過程中扮演重要角色。於種種之癌細胞，VEGF為NO所誘導。本發明之NO產生抑制劑藉由抑制NO產生，亦抑制癌細胞之產生VEGF，其結果於癌組織周邊之血管新生受抑制。癌細胞移植於皮下使形成固形腫瘍之小鼠中，投予本發明之NO產生抑制劑，則癌組織之周邊血管之形成變得不充分，癌脫落。

亞硝酸胺為於2級胺附加亞硝基之一群化合物，已知有數百種類，其中許多藉由加諸於DNA之損傷而對動物顯示發癌性。亞硝酸胺亦與人之發癌深切有關，通常於胃中藉由亞硝酸鹽與胺之反應而生成。NO於pH中性之生理條件下亦與胺反應生成亞硝酸胺。又於疫學上與癌之關係高之肝吸蟲感染患者及肝硬化患者，NO之產生亢進。因而，藉由投予本發明之NO產生抑制劑，防止NO產生之亢進，尤其可以預防高危險群之發癌。如上地，本發明之NO產生抑制劑，於發癌之抑制與癌組織之血管新生抑制之2階段顯示抑癌作用。

NO又誘發被確認於炎症性病變為特徵之浮腫，亦即血管透過性亢進 [Maeda等，Japanese Journal of Cancer

五、發明說明 (12)

Research, 第85卷, 第331~334頁(1994)], 又, 使為炎症性介體之前列腺素類之生合成亢進 [Salvemini等, Proceedings of National Academy of Science, USA, 第90卷, 第7240~7244頁(1993)]。一方面, NO與超氧化自由基快速反應, 產生過氧亞硝酸離子, 過氧亞硝酸離子亦被認為引起炎症性之細胞組織障礙。

被活化之免疫細胞進入臟器中放出細胞素, 則誘導NO之產生。胰島素依存型糖尿病為由於胰島β細胞受到特異性地破壞而引起之疾病, 為藉由NO之破壞。又, 伴隨慢性關節性風濕病、變形性關節風濕病、痛風性關節炎、貝捷特(ベーチェット)病之關節炎之患者之病變部之關節液中, 與該患者之正常之關節及健康常人之關節之關節液比較, 含高濃度之NO。將本發明之NO產生抑制劑投予此等之患者, 則抑制於病變部之NO產生, 改善症狀。

腦缺血中及再灌流後增大NO產生, 伴隨此, 腦組織受損傷。於腦缺血時, 藉由投予本發明之NO產生抑制劑, 可減輕腦組織之損傷, 改善預後。

組織之炎症及疼痛之引起, 與花生四烯酸代謝大大有關。來自細胞膜磷脂質之花生四烯酸, 於體內藉由環氧合酶之作用代謝成前列腺素、環前列腺素、凝血噁烷之三者。其中, 前列腺素具有血管擴張作用與伴隨其之對臟器之血流增加作用, 尤其於炎症部位, 前列腺素E₂與I₂藉由其血流增加作用, 使浮腫與白血球浸潤增加。本發明之以通式I表示之化合物, 具有抑制舉列腺素E₂合成之活性。

五、發明說明 (13)

因而，含有本發明之以通式I表示之化合物為有效成分之醫藥有用於治療或預防要抑制前列腺素E₂合成之疾病。亦即，藉由投予本發明之前列腺素E₂合成抑制劑，抑制前列腺素之生合成，可使表現鎮痛、抗炎症作用。另外，浸潤於炎症部分之白血球生產活性氧，由於引起氧化壓力狀態，所以抑制前列腺素之生合成之本發明之前列腺素E₂合成抑制劑，亦有用於預防、治療或防止如上述藉由氧化壓力之種種疾病、疾病之惡化。

又，如前所述，NO誘發被認為炎症狀病變特徵之浮腫，亦即血管透過性亢進作用，藉由使為炎症性介體之前列腺素類之生合成亢進，使本發明之NO產生抑制效果與前列腺素E₂合成抑制效果相乘性地作用，對由於鎮痛、抗炎症作用與氧化壓力之種種疾病、疾病之預防、治療或惡化防止表現相乘效果。

作為本發明之細胞素，可舉例如介白素。介白素為產生淋巴球、單核球等之蛋白質性生物活性物質之總稱。於現在，已知介白素1~18之存在。作為介白素可舉例如IL-6、IL-10。

IL-6係做為引發B細胞的最終分化的分化因子而選擇其cDNA者。不只與免疫回應有關，亦與造血系、神經系之細胞分化及急性反應有關，另外，亦與種種之免疫異常及炎症性疾病淋巴系腫瘍之發病密切相關。又，IL-6對於B細胞誘導抗體產生，產生IgM、IgG、IgA之各類之免疫球蛋白，與IL-4不同，與類別開關(クラススイッチ)無關。

五、發明說明 (14)

又，IL-6亦作為B細胞與血漿細胞之增隨因子而作用。一方面亦與T細胞系有關，使T細胞增殖、分化。IL-6亦與造血系有關，與IL-3協調，藉由縮短G0期而使造血幹細胞增殖。又，促進巨核球之成熟，誘導血小板之增加。IL-6亦與細菌及病毒感染、惡性腫瘤等生體即刻反應之急性期反應有關。IL-6亦與神經系有關，亦作用於自神經系細胞分泌成膠質細胞及星形細胞等，誘導神經系之分化。於慢性關節風濕病及全身性紅斑性狼瘡，可見B細胞之活化患者關節液中存在高濃度之IL-6。以全身性淋巴節腫脹為特徵之Castleman症候群，血中IL-6濃度非常高。於顯示自體免疫疾病樣症狀，心房黏液腫之患者，自腫瘤細胞產生大量之IL-6。又，來自多發性骨髓患者之骨髓瘤細胞之增殖，由於被IL-6抗體抑制，所以IL-6為骨髓瘤細胞之自體增殖因子之可能性高。另外，於原發性絲球體腎炎患者之尿中亦含IL-6，IL-6作為腎小球系膜細胞之增殖因子作用(宮園浩平及管村和夫編「BioScience用語庫:細胞素增殖因子」28-29頁，羊土社(1995))。如此之IL-6之異常產生被認為病體之原因之疾病，藉由投予使用於本發明之化合物，抑制IL-6之產生，可治療或預防症狀。

又，作為要抑制IL-10產生之疾病，可舉例如伴隨免疫降低之疾病，本發明化合物對於如此之疾病有用。

血紅素加氧酶(HO)中存在33 kDa之HO-1及36 kDa之HO-2之二種同功酶。HO-2具有放HO-1之N末端側多餘地附自由20個胺基酸殘基所成之胺基酸序列之構造。其餘之部分

五、發明說明 (15)

之同源性為40~50%，高次構造極為類似。兩者皆於C末端部為疏水性領域，以此部分結合於微粒體膜。以胰蛋白酶處理微粒體則可得具有血紅素分解活性之可溶性部分，所以認為含活性中心之大的結構域突出於細胞質側。

HO-1為誘導酵素，藉由為基質之血紅素、重金屬離子、某種有機化合物、過氧化氫、或如熱休克、UV照射、缺血之化學性、物理性要因、顯著地被誘導於種種細胞。HO-2為構成酵素，於各組織表現，尤其於腦及精巢活性高。HO將血紅素分解成膽綠素、CO、鐵，膽綠素再藉還原酵素成為膽紅素。此膽紅素有脂肪酸之抗氧化作用，脂質自由基之清除作用、抑制伴隨嗜中性球之貪食者發生大量氧自由基而產生磷脂質、中性脂肪、膽固醇之氫過氧化物之產生、抑制與動脈硬化發病深切有關之LDL(低密度脂蛋白)產生之作用、作為單態氧之清除作用等之抗氧化物質之活性，作為內因性抗氧化物質於生體內擔任重要角色。各種自由基，不只脂質，作用於蛋白質、核酸等之種種生物體質，成為慢性疾病、引起癌之要因，膽紅素使減少如此之各種自由基(ポルフィリン研究会編「卟啉，血紅素之生命科學：對遺傳病、癌、工學應用等之展開」東京化學同人(1995))。亦即，藉由誘導HO，誘導具抗氧化活性之膽紅素之產生，可治療或預防藉由各種自由基之疾病。使用於本發明之化合物誘導HO之產生，有用於對於要誘導如上述之HO之產生之疾病之治療或預防。

以通式I表示之化合物為有效成分之免疫調節劑具有淋

五、發明說明 (16)

巴球幼化反應抑制作用、混合淋巴球反應抑制等之免疫調節作用，該免疫調節劑作為起因於此等之免疫系、免疫因子之異常之疾病之治療劑或預防劑有用。

又，淋巴球幼化反應為分裂素結合於淋巴球表面之受體，使淋巴球活化，促進其之分裂、增殖之反應。混合淋巴球反應，為藉由混合培養由同種異系之動物所得之淋巴球，誘導藉由主要組織適合抗原之一致之淋巴球之活化，促進淋巴球之分裂、增殖之反應。本發明之免疫調節劑抑制此等反應，特別有用於治療或預防起因於淋巴球之異常亢進之自體免疫性疾病，例如慢性腎炎、慢性大腸炎、I型糖尿病、慢性關節風濕病等之慢性疾病，又於移植物排斥反應之抑制上亦有用。

作為本發明之細胞凋亡誘發劑，只要以通式I表示之化合物為有效成分，將此與公知之醫藥用載劑組合製劑化即可。該細胞凋亡誘發劑之製造可依照上述之程序之製造方法進行。

該細胞凋亡誘發劑，按照製劑形式，以適當之投予途徑投予。投予方法亦無特別限定，可藉由內用、外用及注射。注射劑可例如靜脈內、肌肉內、皮下、皮內等投予，外用劑亦包含栓劑等。

作為細胞凋亡誘發劑之投予量，依其製劑形式、投予方法、使用目的及適用此之患者之年齡、體重、症狀而適宜設定，並非一定，一般含於製劑中之有效成分之量為成人每1天10微克~200毫克/公斤。當然，投予量依種種條件

五、發明說明 (17)

而異，有比上述投予量少之量即充分之情形，或亦有必須超過此範圍之情形。本發明之藥劑可照原樣投予外，亦可添加於任意之飲食品使日常地攝取。

作為本發明之抑癌劑，只要以通式I表示之化合物為有效成分，將此與公告之醫藥用載劑組合製劑化即可，該抑癌劑之製造可依上述之程序之製造方法進行。

作為該抑癌劑，以按照製劑形式之適當投予途徑投予。投予方法亦無特別限定，可藉由內用、外用及注射。注射劑可以例如靜脈內、肌肉內、皮下、皮內等投予，外用劑亦包含栓劑等。

作為抑癌劑之投予量依其製劑形式、投予方法、使用目的及適用此之患者之年齡、體重、症狀而適宜設定，並非一定，一般含於製劑中之有效成分之量，為成人每1天10微克~200毫克/公斤。當然投予量依種種條件而異，有比上述投予量少之量即充分之情形，或亦有必要超過此範圍之情形。本發明之藥劑照原樣經口投予外，亦可添加於任意之飲食品中，使日常地攝取。

又，以通式I表示之化合物為有效成分之抗氧化劑、活性氧產生抑制劑、過氧化脂質自由基產生抑制劑、NO產生抑制劑，可依上述細胞凋亡誘發劑而製造，用法、用量只要依其症狀、以上述細胞凋亡誘發劑為準使用即可。

作為抗氧化劑、活性氧產生抑制劑、過氧化脂質自由基產生抑制劑、NO產生抑制劑按照製劑形式，以適當之投予途徑投予，投予方法亦無特別限定，可藉由內用、外用

五、發明說明 (18)

及注射。注射劑可投予例如靜脈內、肌肉內、皮下、皮內等，外用劑亦包含栓劑等。

作為抗氧化劑、活性氧產生抑制劑、過氧化脂質自由基產生抑制劑、NO產生抑制劑之投予量，依使用目的及適用此之患者之年齡、體重、症狀而適宜設定，並非一定，一般，含於製劑中之有效成分之量，成人每1日10微克~200毫克/公斤。當然投予量依種種條件而異，有比上述投予量少之量即充分之情形，亦有必要超過此範圍之情形。本發明之藥劑照其原樣經口投予以外，亦可添加於任意之飲食品，使日常地攝取。

另外，以通式I表示之化合物，於生體內藉由變化成以通式IV表示之化合物，顯示對 α -糖苷酶例如蔗糖酶之抑制活性，可製造以通式I表示之化合物為有效成分之血糖上升抑制劑、抗高脂血症劑、抗肥胖劑、抗糖尿病劑等。此等之藥可依照上述細胞凋亡誘發劑製造，用法、用量按治療、預防目的之疾病症狀，以上述細胞凋亡誘發劑為準用即可。

其次，含有、稀釋及/或添加以通式I表示之化合物所成之食品或飲料(以下稱為本發明之食品或飲料)，藉由其之細胞凋亡誘發劑作用、抑癌作用、抗氧化作用、抗病原微生物活性、抗變異原活性等，對通式I表示之化合物顯示感受性之疾病例如需要誘發細胞凋亡之疾病、癌性疾病、需要抑制活性氧產生之疾病、需要抑制NO產生之疾病、藉由病原微生物之疾病、由變異原引起之疾病等之症狀改

五、發明說明 (19)

善、預防上極為有用。

本發明之食品或飲料之製造法並無特別限定，可舉藉由調理、加工及一般使用之食品或飲料之製造法之製造，製造之食品或飲料中，含有添加及/或稀釋通式I表示之化合物為有效成分即可。

作為本發明之食品或飲料，含有、稀釋及/或添加通式I表示之化合物，只要含有供表現其生理機能之必要量，則其形狀並無特別限定，亦包含錠片狀、顆粒狀、膠囊狀等之形狀之經口可攝食之形狀物。

本發明之食品或飲料含有具生理活性之通式I表示之化合物，為藉由此等之細胞凋亡誘發作用，抑癌作用等之生理機能，藉由攝取此等對發癌預防、癌抑制效果等之通式I表示之化合物顯示感受性之顯示疾病之症狀改善作用或預防作用之健康食品或飲料，尤其為有用於胃腸健康之保持之食品或飲料。

又，以通式I表示之化合物，具有活性氧產生抑制作用，過氧化脂質自由基產生抑制作用等之抗氧化活性，作為抗氧化用食品用之抗氧化劑或抗氧化用飲料用之抗氧化劑，例如活性氧產生抑制劑、過氧化脂質自由基產生抑制劑、NO產生抑制劑，可用於抗氧化用食品或抗氧化用飲料之製造。

另外，根據本發明提供含有以通式I表示化合物之甘味料。亦即，以通式I表示之化合物，具有甘味，有用地作為代替砂糖之低熱量甘味料之有效成分。

五、發明說明 (20)

以通式I表示之化合物，經口投予小鼠其生理活性之有效量亦無確認急性毒性。

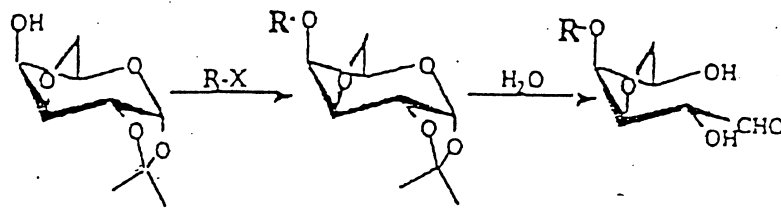
實施例

以下，舉實施例更具體說明本發明，但本發明並無限於此等之實施例。

實施例1

(1) 1,2-O-亞異丙基-3,6-脫水-D-半乳糖[化合物(3)]

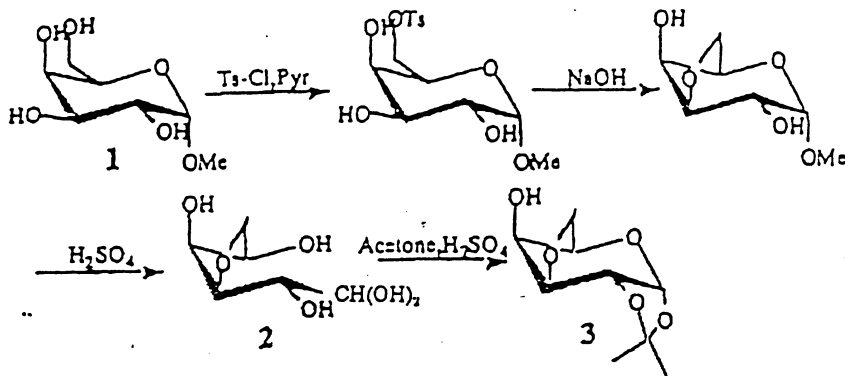
為了於3,6-脫水半乳糖之4位之羥基導入特異性之種種取代基，使用示於反應式I之方法：



亦即，於化合物(3)之4位之羥基中導入目的之取代基(R)後於酸性條件下，只除去1,2-O-亞異丙基。

於此，必要之化合物(3)，藉由如示於下述之反應式II之Haworth等之方法 [Imperial Collection of Science and Technology, 第620~631頁(1940)]，將 α -D-甲基-D-吡喃半乳糖[化合物(1)]衍生至3,6-脫水-D-半乳糖[化合物(2)]後，以Hirase等之方法 [Bulletin of the Chemical Society of Japan, 第41卷, 第626~628頁(1968)]，藉由1,2-O-亞異丙基化而合成。

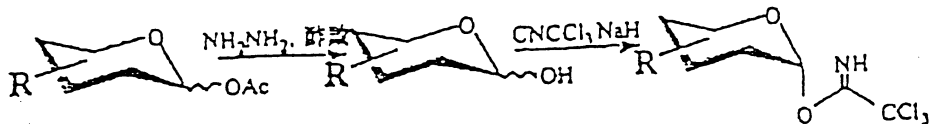
五、發明說明 (21)



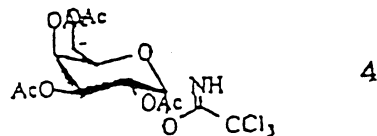
(2) 糖予體之合成

糖之導入於本案施例之化合物(3)，完全藉由Schmidt開發之三氯乙醯基亞胺酸酯法[Liebigs ann. Chem., 第1249~1256頁(1983)]進行。

糖之三氯亞胺酸酯化物依照Kobayashi等之方法[Carbohydrate Research, 第201卷, 第51~67頁(1990)]等, 藉由如下述反應式III所示方法合成。

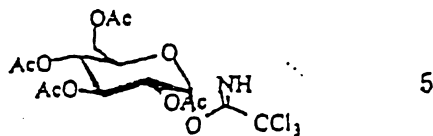


藉由此方法，進行分別以下述式V~VII表示之化合物(4)、(5)、(6)之合成。

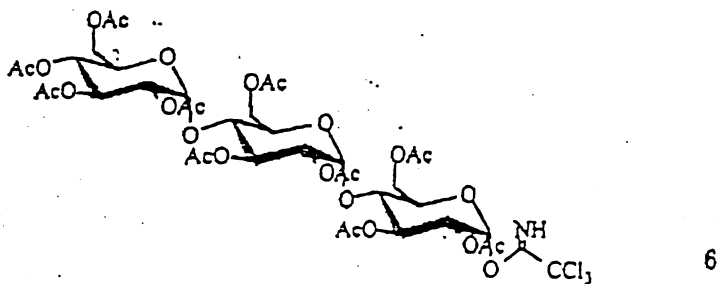


(V)

五、發明說明 (22)



(V I)



(V I I)

(3) 4-O-苯醯基-3,6-脫水-D-半乳糖[化合物(7)]

(i) 4-O-苯醯基-1,2-O-亞異丙基-3,6-脫水-D-半乳糖[化合物(8)]

將化合物(3) 100毫克(0.5毫莫耳)、無水苯甲酸(拿卡來鐵斯克(ナカライテスク):Code 042-24) 170毫克(0.75毫莫耳)及4-二甲胺基吡啶(拿卡來鐵斯克:Code. 129-22) 12.2毫克(0.1毫莫耳)溶於二氯甲烷5毫升,冰冷後,加三乙胺(拿卡來鐵斯克:Code. 348-05) 104毫升(0.75毫莫耳),於室溫攪拌2小時。

反應液濃縮後,藉由矽膠層析法以己烷:乙酸乙酯=11:2為展開溶媒,得化合物(8) 146毫克,藉由核磁共振(NMR)光譜(JNM-A500(日本電子社製)進行化合物(8)之構造解析。

五、發明說明 (23)

 $^1\text{H-NMR}$

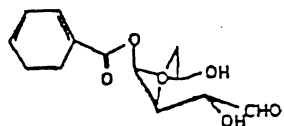
δ 1.37 (3H, s, Me)、1.64 (3H, s, Me)、4.09 (1H, dd, $J=3.5$, 16.5Hz, H-6)、4.17 (1H, d, $J=10.5\text{Hz}$, H-6)、4.35 (1H, dd, $J=2.5$, 5Hz, H-2)、4.56 (1H, m, H-5)、4.68 (1H, d, $J=5\text{Hz}$, H-3)、5.48 (1H, d, $J=2.5\text{Hz}$, H-1)、5.71 (1H, d, $J=1.5\text{Hz}$, H-4)、7.43 (2H, t, $J=8.5\text{Hz}$, Bzl)、7.59 (1H, td, $J=1$, 8.5, Bzl)、8.00 (2H, dd, $J=1$, 8.5, Bzl)

但，檢品溶於重氯仿，氯仿之質子之化學位移值表示為 7.24ppm。

圖 1 為表示化合物 (8) 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜之圖。於圖 1，橫軸表示化學位移值 (ppm)，縱軸表信號強度。

(ii) 化合物 (7)

將化合物 (8) 80 毫克溶於二氯甲烷 30 毫升，加三氟乙酸 / 水 (2.85 毫升 / 0.15 毫升)，於室溫攪拌 3 小時。反應液以乙酸乙酯 300 毫升稀釋，以飽和 NaHCO_3 水洗淨。有機層減壓濃縮，藉由層析法以氯仿：甲醇 = 25:1 為展開溶媒，得以下述式 VIII 表示之化合物 (7) 52 毫克。化合物 (7) 藉由核磁共振 (NMR) 光譜 (JNM-A500 (日本電子社製)，質譜 (MS) (DX302) 質量分析計 (日本電子社製) 解析構造。



7

(VIII)

 $^1\text{H-NMR}$

五、發明說明 (24)

將化合物(7)溶於重氯仿，藉由核磁共振進行構造解析。圖2為表示化合物(7)之¹H-NMR光譜之圖。於圖2，橫軸表化學位移值(ppm)，縱軸表信號強度。

其結果，此物質由於於重氯仿中，3,6-脫水-D-半乳糖1位醛具有與半縮醛結合(α,β)之平衡關係，所以信號之歸屬為不可能。但，化合物(8)確認來自1,2-O-亞異丙基之信號(圖1中，δ 1.37 ppm, 1.64 ppm之信號)之消失及來自醛之信號(圖2中，δ 9.75 ppm之信號)之生成。

FAB-MS

m/z 267 (M+H)⁺使用甘油為基質。

(4) 4-O-[β-D-2,3,4,6-四-O-乙醯基吡喃半乳糖基)-3,6-脫水-D-半乳糖[化合物(9)]

(i) 4-O-[β-D-2,3,4,6-四-O-乙醯基吡喃半乳糖基)-1,2-O-亞異丙基-3,6-脫水-D-半乳糖[化合物(10)]

於Ar大氣下，添加CH₂Cl₂ 2毫升於化合物(4) 355毫克(0.72毫莫耳)、化合物(3) 146毫克(0.72毫莫耳)中，以冰/食鹽，於-20°C冰冷。於此，慢慢添加CF₃SO₃Si(CH₃)₃(東京化成:T0871) 32毫升(0.14毫莫耳)/2毫升CH₂Cl₂，於-20°C攪拌1.5小時。反應液中添加飽和NaHCO₃水、乙酸乙酯後，回收有機層。以己烷:乙酸乙酯=1:1為展開溶媒，將此有機層供薄層層析，則於R_f 0.45附近檢出目的之生成物。另外，有機層以無水MgSO₄乾燥後減壓濃縮，藉由層析法以己烷:乙酸乙酯=5:4為展開溶媒，得化合物(10) 101毫克，藉核磁共振(NMR)光譜(JNM-A500(日本電子社

五、發明說明 (25)

製)進行化合物(10)之構造解析。

 $^1\text{H-NMR}$

δ 1.29 (3H, s, Me)、1.51 (3H, s, Me)、1.94 (3H, s, Ac)、1.97 (3H, s, Ac)、1.98 (3H, s, Ac)、2.08 (3H, s, Ac)、3.90 (2H, m)、3.96 (1H, d, $J=10\text{Hz}$, H-6a)、4.06 (1H, dd, $J=6, 11\text{Hz}$, H-6b)、4.11 (1H, dd, $J=7, 11\text{Hz}$, H-6b)、4.23 (1H, dd, $J=3, 5\text{Hz}$, H-2a)、4.36 (1H, d, $J=5\text{Hz}$, H-3a)、4.42 (1H, m, H-5a)、4.47 (1H, d, $J=1.5\text{Hz}$, H-4a)、4.52 (1H, d, $J=8\text{Hz}$, H-1b)、4.95 (1H, dd, $J=3.5, 10\text{Hz}$, H-3b)、5.11 (1H, dd, $J=8, 10\text{Hz}$, H-2b)、5.33 (1H, d, $J=3.5\text{Hz}$, H-4b)、5.35 (1H, d, $J=3.0\text{Hz}$, H-1a)。

但，檢品溶於重氯仿，氯仿之質子之化學位移值以7.24 ppm表示。

圖3為表示化合物(10)之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜之圖。於圖3，橫軸表化學位移值(ppm)，縱軸表信號強度。

(ii) 化合物(9)

將化合物(10) 44毫克溶於10毫升 CH_2Cl_2 ，加三氟乙酸/水(1.14毫升/60毫升)，於室溫攪拌3小時。減壓濃縮反應液，藉由矽膠層析法以 $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}=19:1$ 為展開溶媒，得化合物(9) 9毫克。藉由核磁共振(NMR)光譜(JNM-A500(日本電子社製)進行化合物(9)之構造解析。

 $^1\text{H-NMR}$

δ 1.91 (3H, s, Ac)、1.99 (3H, s, Ac)、2.02 (3H, s, Ac)、2.11 (3H, s, Ac)、3.45 (1H, dd, $J=3.5, 6.5\text{Hz}$, H-2a)、3.81

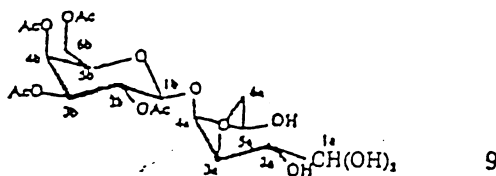
五、發明說明 (26)

(1H, dd, J=3, 10Hz, H-6a)、3.87 (1H, dd, J=4.5, 10Hz, H-6a)、3.91 (1H, t, J=3.5Hz, H-3a)、4.23 (4H, m)、4.37 (1H, dt, J=3, 4.5Hz, H-5a)、4.89 (1H, d, J=8Hz, H-1b)、4.93 (1H, d, J=6.5Hz, H-1a)、5.05 (1H, dd, J=8, 10Hz, H-2b)、5.22 (1H, dd, J=3, 10Hz, H-3b)、5.35 (1H, d, J=3.0Hz, H-4b)。

但，檢品溶於重水HOD之化學位移表示為4.65 ppm。

圖4為表示化合物(9)之¹H-NMR光譜之圖。於圖4，橫軸表化學位移值(ppm)，縱軸表信號強度。

又，於¹H-NMR之峰之歸屬編號如下述式IX。



(IX)

(5) 4-O-β-D-吡喃葡萄糖基-3,6-脫水-D-半乳糖 [化合物(11)]

(i) 4-O-(β-D-2,3,4,6-四-O-乙醯基吡喃葡萄糖基)-1,2-O-亞異丙基-3,6-脫水-D-半乳糖 [化合物(12)]

於Ar大氣下，將CH₂Cl₂ 10毫升加至化合物(5) 1.22克(2.47毫莫耳)、化合物(3) 354毫克(1.75毫莫耳)中，以冰/食鹽於-20℃冰冷。於此慢慢添加CF₃SO₃Si(CH₃)₃ 100毫升(0.4毫莫耳)/2毫升CH₂Cl₂，於-20℃攪拌2.5小時。反應液中加飽和NaHCO₃水、乙酸乙酯後，回收有機層。將此

五、發明說明 (27)

有機層提供以己烷:乙酸乙酯=1:1為展開溶媒之薄層層析法，則於Rf值0.45附近檢出目的之生成物。另外，以無水MgSO₄乾燥有機層後，減壓濃縮，藉由以己烷:乙酸乙酯=5:4為展開溶媒之矽膠層析法，得化合物(12) 230毫克，藉核磁共振(NMR)光譜(JNM-A4500(日本電子社製)進行化合物(12)之構造解析。

¹H-NMR

δ 1.29 (3H, s, Me)、1.51 (3H, s, Me)、1.94 (3H, s, Ac)、1.97 (3H, s, Ac)、1.98 (3H, s, Ac)、2.02 (3H, s, Ac)、3.69 (1H, ddd, J=2.5, 5, 10Hz, H-5b)、3.89 (1H, dd, J=3, 10Hz, H-6a)、3.96 (1H, d, J=10Hz, H-6a)、4.09 (1H, dd, J=2.5, 12.5Hz, H-6b)、4.17 (1H, dd, J=5, 12.5Hz, H-6b)、4.22 (1H, dd, J=3.5, 4.5Hz, H-2a)、4.36 (1H, d, J=4.5Hz, H-3a)、4.43 (1H, m, H-5a)、4.45 (1H, d, J=1.5Hz, H-4a)、4.57 (1H, d, J=7.5Hz, H-1b)、4.90 (1H, dd, J=7.5, 10Hz, H-2b)、4.99 (1H, t, J=10Hz, H-3b)、5.14 (1H, t, J=10Hz, H-4b)、5.34 (1H, d, J=3.5Hz, H-1a)。

但，檢品溶於重氯仿，氯仿之質子之化學位移值表示為7.24 ppm。圖5為表示化合物(12)之¹H-NMR光譜之圖。於圖5，橫軸表化學位移值(ppm)，縱軸表信號強度。

(ii) 4-O-β-D-吡喃葡萄糖基-1,2-O-亞異丙基-3,6-脫水-D-半乳糖[化合物(13)]

將化合物(12) 230毫克溶於甲醇5毫升，加0.1N甲醇鈉/甲醇溶液1.5毫升，於室溫攪拌30分，此反應液提供於以

五、發明說明 (28)

CHCl₃:CH₃OH=5:1 為展開溶媒之薄層層析法，於 R_f 值 0.3 附近檢出目的之生成物。反應液以 H₂CO₃ 氣體中和，減壓濃縮後，藉由矽膠層析法，以 CHCl₃:CH₃OH=5:1 為展開溶媒，得化合物(13) 90 毫克。

(iii) 化合物(11)

將化合物(13) 90 毫克溶於水 4 毫升，加 0.1N H₂SO₄ 溶液 2 毫升，於 95°C 攪拌 2 小時。此反應液提供於以丁醇:乙醇:水=5:5:1 為展開溶媒之薄層層析法。於 R_f 值 0.5 附近檢出目的之生成物。反應液以 BaCO₃ 中和，除去沈澱後，將水溶液冷凍乾燥，得化合物(11) 64 毫克。化合物(11) 藉由核磁共振(NMR) 光譜(JNM-A500(日本電子社製)、質譜(MS)((DX 302) 質量分析計(日本電子社製)) 解析構造。

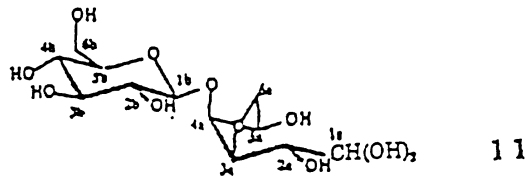
¹H-NMR

δ 3.18 (1H, dd, J=8, 9Hz, H-2b)、3.27 (1H, t, J=9Hz, H-3b)、3.39 (2H, m)、3.52 (1H, dd, J=3.5, 6Hz, H-2a)、3.60 (1H, dd, J=6.5, 12.5Hz, H-6b)、3.73 (1H, dd, J=2.5, 10Hz, H-6a)、3.82 (1H, dd, J=2.5, 12.5Hz, H-6b)、3.88 (1H, dd, J=4.5, 10Hz, H-6a)、3.95 (1H, dd, J=3.5, 5Hz, H-3a)、4.16 (1H, dd, J=2.5, 5Hz, H-4a)、4.35 (1H, dt, J=2.5, 4.5Hz, H-5a)、4.45 (1H, d, J=8Hz, H-1b)、4.89 (1H, d, J=6Hz, H-1a)。

但，檢出溶於重水，HOD 之化學位移值以 4.65 ppm 表示。圖 6 為表示化合物(11) 之 ¹H-NMR 光譜之圖。於圖 6，橫軸表化學位移值(ppm)，縱軸表信號強度。

五、發明說明 (29)

又，於¹H-NMR之峯之歸屬如下述式X。



(X)

FAB-MS

m/z 325 (M+H)⁺使用甘油為基質。

(6) 4-O-β-麥芽三糖基-3,6-脫水-D-半乳糖[化合物(14)]

(i) 4-O-(十二-O-乙醯基麥芽三糖基)-1,2-O-亞異丙基-3,6-脫水-D-半乳糖[化合物(15)]

於Ar大氣下，將二氯甲烷30毫升加於化合物(6) 5.1克(4.75毫莫耳)、化合物(3) 960毫克(4.75毫莫耳)中，以冰/食鹽冷卻至-20°C。於此之中，慢慢加CF₃SO₃Si(CH₃)₃ 200毫升(0.95毫莫耳)/2毫升二氯甲烷，於-20°C攪拌1.5小時。於反應液中添加飽和NaHCO₃水、乙酸乙酯後，回收有機層。將此有機層提供於薄層層析法以己烷:乙酸乙酯=1:2為展開溶媒，於R_f值0.4附近檢出目的之生成物。另外，有機層以無水MgSO₄乾燥後，減壓濃縮，藉由=氧化矽層析法，以己烷:乙酸乙酯=2:1為展開溶媒，得化合物(15) 936毫克。

(ii) 1,2-O-亞異丙基-4-O-麥芽三糖基-3,6-脫水-D-半乳糖[化合物(16)]

五、發明說明 (30)

將化合物(15) 936毫克溶於甲醇45毫升，添加0.1 N 甲醇鈉/ 甲醇溶液4.5毫升，於室溫攪拌1小時。此反應液提供薄層層析法，以氯仿：甲醇=1:1為展開溶媒，則於Rf值0.5附近檢出目的之生成物。反應液以CO₂中和、減壓濃縮後，藉由矽膠層析法以氯仿：甲醇=1:1為展開溶媒，得化合物(16) 457毫克。

(iii) 化合物(14)

將化合物(16)溶於0.02 N H₂SO₄溶液中，於95℃攪拌2小時。將此反應液提供薄層層析法，以丁醇：乙醇：水=5:5:1為展開溶媒，於Rf值0.5附近，檢出目的之生成物。反應液以BaCO₃中和，除去沈澱後，將水溶液冷凍乾燥，得化合物(14) 390毫克。

藉由核磁共振(NMR)光譜(JNM-A500(日本電子社製)、質譜(MS)(DX302)質量分析儀(日本電子社製)解析化合物(14)之構造。

¹H-NMR

δ 3.22 (1H, dd, J=8, 9.5Hz, H-2b)、3.30 (1H, t, J=9.5Hz, H-3b)、3.46 (1H, dd, J=4, 10Hz, H-2c)、3.50 (1H, dd, J=4, 10Hz, H-2d)、3.5~3.75 (14H, m)、3.83 (3H, m)、3.88 (1H, dd, J=5, 10.5Hz, H-6a)、3.94 (1H, dd, J=2.5, 5Hz, H-4a)、4.16 (1H, dd, J=2.5, 5Hz, H-5a)、4.46 (1H, d, J=8Hz, H-1b)、4.46 (1H, d, J=6.5Hz, H-1a)、5.27 (2H, d, J=4Hz, H-1d, 1c)。

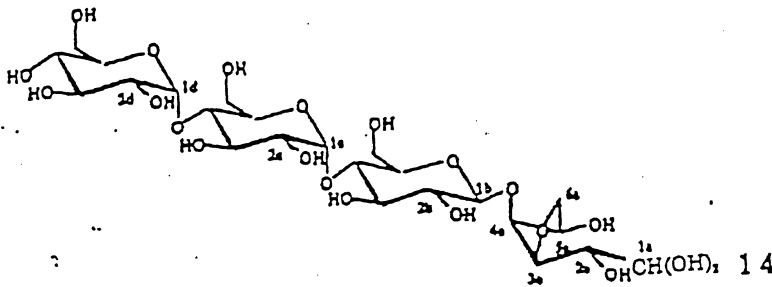
但，檢品溶於重水，HOD之化學位移值表示為4.65

五、發明說明 (31)

ppm。圖7為表示化合物(14)之¹H-NMR光譜之圖。

於圖7橫軸表化學位移值(ppm)，縱軸表信號強度。

又，於¹H-NMR之峯之歸屬如下述式I。



(X I)

FAB-MS

m/z 649 (M=H)⁺使用甘油為基質。

(7) 4-O-苄基-3,6-脫水-D-半乳糖[化合物(17)]

(i) 4-O-苄基-1,2-O-亞異丙基-3,6-脫水-D-半乳糖[化合物(18)]

於Ar大氣下，將二氯甲烷10毫升添加於化合物(3) 200毫克(1毫莫耳)，以冰/食鹽冷卻至-20°C。於此，慢慢地添加苄基-2,2,2-三氯乙醯基亞胺酸酯(東京化成:B1483) 280毫升(1.5毫莫耳)、CF₃SO₃Si(CH₃)₃ 36毫升(0.2毫莫耳)/2毫升二氯甲烷，於-20°C攪拌1.5小時。反應液中添加飽和NaHCO₃水、乙酸乙酯後，回收有機層。此有機層提供薄層層析法以己烷:乙酸乙酯=6:1為展開溶媒，於R_f值0.2附近檢出目的之生成物。另外，以無水MgSO₄乾燥有機層後，減壓濃縮，藉由矽膠層析法以己烷:乙酸乙酯=6:1為展開溶媒，得化合物(18) 87毫克。以核磁共振(NMR)

五、發明說明 (32)

光譜解析化合物(18)。

$^1\text{H-NMR}$

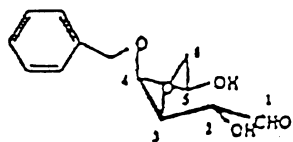
δ 1.34 (3H, s, Me)、1.52 (3H, s, Me)、4.1 (2H, m, H-6)、4.33 (1H, dd, $J=3, 4.5\text{Hz}$, H-2)、4.35 (1H, d, $J=3\text{Hz}$, H-4)、4.38 (1H, m, H-5)、4.54 (1H, d, $J=4.5\text{Hz}$, H-3)、4.57 (1H, d, $J=12\text{Hz}$, $-\text{CH}_2-$)、4.65 (1H, d, $J=12\text{Hz}$, $-\text{CH}_2-$)、5.43 (1H, d, $J=3\text{Hz}$, H-1)、7.32 (5H, m, Ph)。

但，檢品溶於重氯仿，氯仿之質子化學位移值表示為 7.24 ppm。

圖 8 為表示化合物(18)之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜之圖。於圖 8，橫軸表示化學位移(ppm)，縱軸表信號強度。

(ii) 化合物(17)

將化合物(18) 80毫克溶於二氯甲烷30毫升中，加三氟乙酸/水(3.8毫升/0.2毫升)，於室溫攪拌3小時。反應液以乙酸乙酯300毫升稀釋，以 NaHCO_3 水洗淨。有機層減壓濃縮，藉由矽膠層析法以氯仿:甲醇=25:1為展開溶媒得以下述式XII表示之化合物(17) 52毫克。藉由核磁共振(NMR)光譜(JNM-A500(日本電子社製)、質譜(MS)((DX302)質量分析儀(日本電子社製)解析化合物(17)之構造。



17

(XII)

五、發明說明 (33)

 $^1\text{H-NMR}$

將化合物(17)溶於重氯仿，以核磁共振進行構造解析。圖9為表示化合物(17)之 $^1\text{H-NMR}$ 之圖。於圖9，橫軸表化學位移值(ppm)，縱軸表信號強度。

其結果，此物質由於3,6-脫水-D-半乳糖於重氯仿中，1位醛與半縮醛結合(α, β)之平衡關係，信號之歸屬為不可能。然而，化合物(18)確認來自1,2-O-亞異丙基之信號(圖8中， δ 1.34 ppm, 1.52 ppm之信號)之消失及來自醛之信號(圖9中， δ 9.65 ppm之信號)之生成。

FAB-MS

m/z 253 (M+H)⁺使用甘油為基質。

(8) 4-O-乙醯基-3,6-脫水-D-半乳糖[化合物(19)]

(i) 4-O-乙醯基-1,2-O-亞異丙基-3,6-脫水-D-半乳糖
[化合物(20)]

將化合物(3) 200毫克(1毫莫耳)、無水乙酸(拿卡來鐵斯克(ナカライテスク):Code. 042-24) 113毫升(1.2毫莫耳)及4-二甲胺基吡啶(拿卡來鐵斯克:Code. 129-22) 24毫克(0.2毫莫耳)溶於二氯甲烷10毫升，冰冷後，加三乙胺(拿卡來鐵斯克:Code. 348-05) 166毫升(1.2毫莫耳)，於室溫攪拌1小時。

將反應液濃縮後，藉二氧化矽層析法以己烷:乙酸乙酯=2:1為展開溶媒，得化合物(20) 210毫克。以核磁共振(NMR)光譜(JNM-A500(日本電子社製)進行化合物(20)之構造解析。

五、發明說明 (34)

 $^1\text{H-NMR}$

d1.30 (3H, s, Me)、1.54 (3H, s, Me)、2.02 (3H, s, Ac)、3.93 (1H, dd, $J=3.5, 10\text{Hz}$, H-6)、4.05 (1H, d, $J=10\text{Hz}$, H-6)、4.24 (1H, dd, $J=3.5\text{Hz}$, H-2)、4.37 (1H, m, H-5)、4.48 (1H, d, $J=5\text{Hz}$, H-3)、5.38 (1H, d, $J=3\text{Hz}$, H-1)、5.40 (1H, d, $J=1.5\text{Hz}$, H-4)。

但，檢品溶於重氯仿，殘留之氯仿之質子之化學位移值表示為7.24 ppm。

圖10中，表示化合物(20)之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜於圖10，橫軸表化學位移值(ppm)，縱軸表信號強度。

(ii) 化合物(19)

將化合物(8) 200毫克溶於70%乙酸水溶液15毫升，於95°C攪拌2小時。將反應液減壓濃縮，藉由二氧化矽層析法以氯仿：甲醇=17:1為展開溶媒，得化合物(7) 100毫克。以核磁共振(NMR)光譜(JNM-A500(日本電子社製)、質譜(MS)(DX302)質量分析儀(日本電子社製))進行化合物(20)之構造解析。

 $^1\text{H-NMR}$

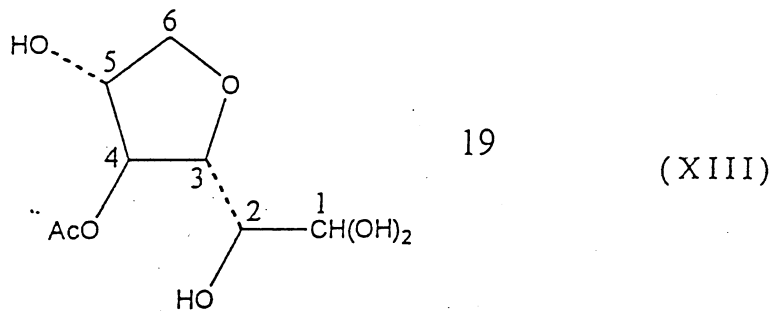
d2.03 (3H, s, Ac)、3.59 (1H, dd, $J=4, 6.5\text{Hz}$, H-2)、3.82 (1H, dd, $J=1.5, 10\text{Hz}$, H-6)、3.87 (1H, dd, $J=4, 10\text{Hz}$)、3.99 (1H, dt, $J=4\text{Hz}$, H-3)、4.27 (1H, ddt, $J=1.5, 4\text{Hz}$)、4.89 (1H, d, $J=6.5\text{Hz}$, H-1)、5.01 (1H, d, $J=4\text{Hz}$, H-4)。

但，檢品溶於重水，將HOD之化學位移表示為4.65 ppm。

五、發明說明 (35)

圖 11 中表示化合物 (19) 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜。於圖 11，橫軸表化學位移值 (ppm)，縱軸表信號強度。

又，於 $^1\text{H-NMR}$ 之峯之歸屬編號如下述式 XIII。



FAB-MS

m/z 205 ($M+H$)⁺ 使用甘油為基質。

(9) 4-O-戊基-3,6-脫水-D-半乳糖 [化合物 (21)]

(i) 4-O-戊基-1,2-O-亞異丙基-3,6-脫水-D-半乳糖 [化合物 (22)]

將化合物 (3) 200 毫克 (1 毫莫耳) 溶於二甲基甲醯胺 4 毫升，於冰冷下，加 NaH (拿卡來鐵斯: Code. 042-24) 30 毫克 (1.2 毫莫耳)，於室溫攪拌 30 分。於冰冷下，將戊基碘 (東京化成: I0066) 260 毫升 (2 毫莫耳) 攪拌 1 小時。

將反應液洗淨、濃縮後，藉由二氧化矽層析法以己烷: 乙酸乙酯 = 8:1 為展開溶媒，得化合物 (22) 270 毫克，以核磁共振 (NMR) 光譜 (JNM-A500 (日本電子社製) 進行化合物 (22) 之構造解析。

 $^1\text{H-NMR}$

δ 0.87 (3H, m, H-11)、1.29 (4H, m, H-9, 10)、1.33 (3H, s,

五、發明說明 (36)

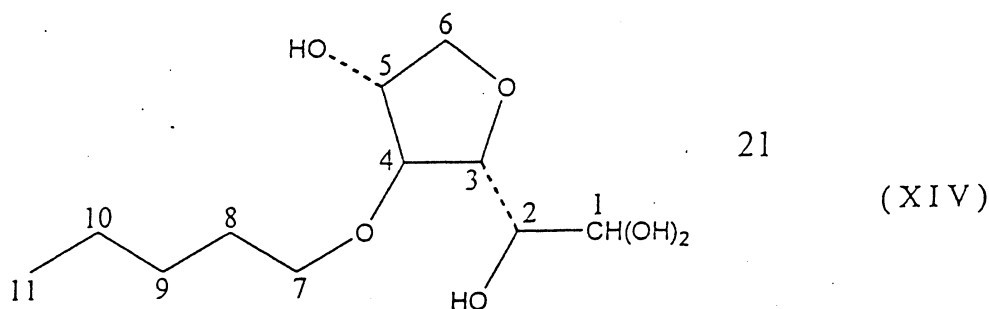
Me)、1.56 (2H, m, H-8)、1.56 (3H, s, Me)、3.50 (2H, m, H-7)、3.98 (1H, dd, J=3, 10Hz, H-6)、4.02 (1H, d, J=10Hz, H-6)、4.28 (1H, dd, J=3.5Hz, H-2)、4.36 (1H, m, H-5)、4.46 (1H, d, J=5Hz, H-3)、5.41 (1H, d, J=3Hz, H-1)。

但，檢品溶於重氯仿，殘留之氯仿之質子之化學位移表為7.24 ppm。

圖12中，表示化合物(22)之¹H-NMR光譜。於圖12，橫軸表化學位移值(ppm)，縱軸表信號強度。

(ii) 化合物(21)]

將化合物(22) 270毫克溶於CH₂Cl₂ 30毫升中，加三氟乙酸/水(2.85毫升/0.15毫升)，於室溫攪拌3小時。反應液以乙酸乙酯300毫升稀釋，以NaHCO₃水洗淨。有機層減壓濃縮，藉由二氧化矽層析法以氯仿:甲醇=25:1為展開溶媒，得化合物(21) 100毫克。化合物(21)藉由質譜(MS)((DX302)質量分析儀(日本電子社製)解析構造，化合物(21)之化學式示於下述XIV。



FAB-MS

m/z 233 (M+H)⁺使用甘油為基質。

五、發明說明 (37)

實施例2

將實施例1合成之化合物(7)、化合物(9)分別溶於含有10%胎牛血清之RPMI 1640培養基使最後濃度為10 mM。將此等檢品於37°C靜置4小時後，將1毫升提供薄層層析，以氯仿:甲醇=5:1為展開溶媒，以地衣酚硫酸檢出。

其結果，自任一者之檢品皆檢出與通式IV所表示之化合物其中Z為CH₂OH，Y為H之化合物(L-甘油基-1,5-環氧基-1 α β ,6-二羥基-順-己-3-烯-2-酮:以下稱為DGE)於同一Rf值(=0.5)之斑點。

又，對於實施例1合成之化合物(2)、化合物(11)、化合物(14)、化合物(17)、亦可見到轉變成DGE。

實施例3

將於含有56°C下處理30分之胎牛血清(JRH生物科學(バイオサイエンス)公司製)10%之RPMI 1640培養基(紀夫可(ギブコ)公司製)37°C下培養之人類前骨髓性白血病細胞HL-60(ATCC CCL-240)以同一培養基使懸浮成5000個/90微升。將此懸浮液各90微升分注於96孔洞培養皿(發耳康(ファルコン)社製)，於各別之懸浮液中，將實施例1所得之化合物(2)之200 mM水溶液、化合物(7)之50 mM水溶液、化合物(9)之50 mM水溶液、化合物(11)之100 mM水溶液、化合物(14)之100 mM水溶液、化合物(17)之20 mM水溶液、化合物(19)之12.5 mM水溶液、化合物(21)之12.5 mM水溶液過濾滅菌，以滅菌水稀釋2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍及128倍稀釋液及水分別各添加

五、發明說明 (38)

10 微升，於 37°C、5% CO₂ 存在下培養，培養開始後 48 小時後，依照「細胞凋亡實驗計劃書」(秀潤社，田沼靖-監修，第 156 頁(1994)，藉由 MTT 法測定之吸光度，比較生細胞數。

此結果，化合物(2)、(7)、(9)、(11)、(14)、(17)、(19)及(21)對於人類前髓性白血病細胞 HL-60 細胞，顯示增殖抑制活性。另外，基於此結果算出顯示 50% 之增殖抑制 (IC₅₀)，表示於表 1。

表 1

	IC ₅₀ (μM)
化合物(2)	860
化合物(7)	104.18
化合物(9)	112.72
化合物(11)	145.55
化合物(14)	113.32
化合物(17)	204.62
化合物(19)	320
化合物(21)	160

實施例 4

將於含有 56°C 下處理 30 分之胎牛血清 (JRH 公司製) 10% 之 RPMI 1640 培養基 (拜歐為他卡 (バイオリイッタカ) 公司製) 37°C 下培養之 HL-60 (ATCC CCL-240) 以 RPMI 1640 培養基使懸浮成 2.5 x 10⁵ 個 / 4.5 毫升。

對此懸浮液 4.5 毫升，添加 10、50、100 mM 之化合物

五、發明說明 (39)

(2)，500、1000、1500 μ M之化合物(7)，750、1500、3000 μ M之化合物(9)，750、1500、3000 μ M之化合物(11)，750、1500、3000 μ M之化合物(14)水溶液500毫升，於37°C、5% CO₂存在下培養24小時。

於光學顯微鏡下觀察培養細胞，於添加化合物(2)成最後濃度5 mM，化合物(7)成最後濃度100 μ m，化合物(9)成最後濃度150 μ m，化合物(11)成最後濃度150 μ m，化合物(14)成最後濃度150 μ m以上之培養細胞中，分別確認核之凝縮、細胞之縮小，細胞凋亡小體之形成。又，於添加對照之生理食鹽水500毫升之培養細胞，無認定此等之現象。

接著，以與上述同樣之方法，使用培養24小時與48小時之細胞，以細胞工學別冊實驗計畫書細胞凋亡實驗計畫書(秀潤社)129-130頁記載之方法，進行使用FACSscan之細胞凋亡細胞之測定，以生物手冊up系列最新細胞凋亡實驗法(羊土社)61-63頁記載之方法，進行DNA之斷片化之解析。其結果，添加化合物(2)成最後濃度5 mM培養24小時，化合物(7)成最後濃度100 μ M，化合物(9)成最後濃度150 μ M，化合物(11)成最後濃度150 μ M，化合物(14)成最後濃度150 μ M以上之培養細胞中確認細胞凋亡，添加化合物(2)成最後濃度5 mM培養24小時，成最濃度1 mM培養48小時，化合物(7)成最後濃度100 μ M，化合物(9)成最後濃度150 μ M培養24小時，化合物(11)成最後濃度150 μ M，化合物(14)成最後濃度75 μ M以上之培養細胞

五、發明說明 (40)

中確認DNA之斷片化。又，於添加對照之生理食鹽水500毫升之培養細胞中，無認定此等現象。

實施例5

以與實施例4同樣之方法，將培養24、28小時之細胞採樣，以0.4%錐蟲藍染色後，以光學類微鏡觀察，進行無染色之生細胞與染成藍色之死細胞之細胞數之測定，整理存活率為50%之化合物(2)、(7)、(9)、(11)及(14)之濃度(存活率50 (mM))。其結果示於表2。

表2.

	24小時	48小時
化合物(2)	18130	3400
化合物(7)	122.96	101.19
化合物(9)	17247.65	189.06
化合物(11)	1264.18	152.43
化合物(14)	550.85	150.47

如以上，於24小時與48小時之存活率50有的化合物有大差異，有的化合物無大差異，此反映R基脫離於脫水半乳糖之3位與4位之間導入不飽和鍵之速度或吸收速度等活性表現為止之時間，如結果所示，藉由使R變化，亦可控制生理活性之表現時期。另外，於48小時之存活率50，可認為顯示最後之生理活性之強度，同樣地藉由變化R亦可控制生理活性之表現強度。

實施例6

將RAW 264.7細胞(ATCC TIB 71)懸浮於含有10%胎牛

五、發明說明 (41)

血清(紀夫可公司製)、不含酚紅,含有2 mM L-麩胺醯胺(生命技術東方公司(ライフテックオリエンタル社)製, Code. 25030-149)達耳貝可(ダルベッコ)改良易戈(イーグル)培養基(拜歐為他卡公司製, 12-917F)使成 3×10^5 個/毫升,於48孔洞微定量皿之孔洞中各加500微升,於5% CO₂存在下,於37°C培養12小時。

於各孔洞中加10微升之25微克/毫升脂多糖(LPS, 夕戈馬(シグマ)公司製, Code. L-2012)或10微升之2.5微克/毫升LPS與10微升之500 U/m干擾素 γ (IFN- γ , 可士莫拜歐(コスモバイオ)公司出售, Code. MG-IFN, Genzyme公司製),另外,作為檢品,添加10微升之1.25, 2.5, 5.0 mM之化合物(2), 1.25, 2.5, 5.0 mM之化合物(7), 1.25, 2.5, 5.0 mM之化合物(9), 0.625, 1.25, 2.5 mM之化合物(11), 1.25, 2.5, 5.0 mM之化合物(14), 1.25, 2.5, 5.0 mM之化合物(17), 1.25, 2.5, 5.0 mM之化合物(19), 1.25, 2.5, 5.0 mM之化合物(21)之水溶液,再培養12小時後,進行NO於培養基中被氧化生成之NO₂⁻濃度之測定。又,作為對照,設定無加LPS與IFN- γ 之區分及無加檢品之區分。

上述培養後,於100微升培養基中加100微升之4%格利斯(グリース)試劑(夕戈馬公司製, Code G4410),於室溫放15分後,測定於490 nm之吸光度。

自溶於上述培養基之已知濃度之NaNO₂製作之檢量線,計算培養基中之NO₂⁻濃度,測定全部以3份進行。

五、發明說明 (42)

此結果，化合物(2)以最後濃度 $25\mu\text{M}$ ，化合物(7)以最後濃度 $25\mu\text{M}$ ，化合物(9)以最後濃度 $50\mu\text{M}$ ，化合物(11)以最後濃度 $25\mu\text{M}$ ，化合物(14)以最後濃度 $25\mu\text{M}$ ，化合物(17)以最後濃度 $50\mu\text{M}$ ，化合物(19)以最後濃度 $25\mu\text{M}$ ，化合物(21)以最後濃度 $25\mu\text{M}$ ，抑制藉由LPS或LPS與IFN- γ 誘導NO之產生。

其結果示於圖13~20，亦即，圖13為添加化合物(2)，圖14為添加化合物(7)，圖15為添加化合物(9)，圖16為添加化合物(11)，圖17為添加化合物(14)，圖18為添加化合物(17)，圖19為添加化合物(19)，圖20為添加化合物(21)分別表培養時之培養基中之 NO_2^- 之濃度之圖。於圖13~20，橫軸表培養條件，縱表 NO_2^- 濃度(μM)。

實施例7

將RAW 264.7細胞懸浮於含有10%胎牛血清達耳貝可改良易戈培養基(拜歐為他卡公司製，Code. 12-604F)使成 3×10^5 個/毫升，於48孔洞微定量皿之孔洞中各加500微升，於5% CO_2 存在下， 37°C 下培養6小時。添加實施例1所製備之化合物(7)，(14)，(17)，使最後濃度分別為50、100、 $100\mu\text{M}$ ，再培養5小時。其後，各孔洞中添加50微克/毫升脂多糖(LPS，夕戈馬公司製，Code. L-2012)水溶液10微升，培養12小時後測定前列腺素 E_2 之量。又，作為對照設定無加LPS之區分及無加化合物(7)、(14)、(17)之區分。

上述之培養後，使用前列腺素 E_2 ELISA套組(尼歐健(不

五、發明說明 (43)

オジェン)公司製, Code. 404110)測定培養上清液中之前列腺素E₂量。測定全部以3份進行。

此結果, 化合物(7)、(14)、(17)之任一者皆抑制藉由LPS誘導前列腺素E₂之產生。將其結果示於圖21。亦即, 圖21為表示於各培養條件下培養時, 培養基中之前列腺素E₂濃度。於圖21, 橫軸表培養條件, 縱軸表前列腺素E₂濃度(毫微克/毫升)。

實施例8

將實施例1記載之化合物(7)懸浮於橄欖油(拿卡來鐵斯克公司製)使成1%, 製備化合物(7)之1%懸浮液。

將上述製備之化合物(7)之1%懸浮液以10或30毫升/公斤之投予量, 1日1次, 於15日間強制經口投予ddy小鼠(日本SLC; 雌, 7週齡)12次。又, 作為對照, 將自來水同樣地強制經口投予。又, 以各群3隻進行。其後, 將含有10%胎牛血清之RPMI 1640培養基(拜歐為他卡公司製, Code. 12-702F)4毫升注入腹腔內, 徹底按摩後拔出, 彙集3隻份得腹腔細胞。將腹腔細胞懸浮於含有10%胎牛血清之RPMI 1640培養基, 使成10⁶個/毫升, 於48孔洞微定量皿中各加500微升, 於5% CO₂存在下, 於37°C培養2小時, 其後, 除去培養上清液, 得接著性細胞, 作為腹腔巨噬細胞使用。於各孔洞中重新加含有10%胎牛血清、不含酚紅、含有2 mM l-麩胺醯胺之達耳貝可改良易戈培養基(拜歐為他卡公司製, Code. 12-917F)各500微升, 加10微升之5微克/毫升脂多糖(LPS, 夕戈馬公司製, Code. L-

五、發明說明 (44)

2012), 2000 單位/毫升干擾素 γ (IFN- γ , 可斯莫拜歐公司出售, Code. GZM-MG-IFN) 水溶液, 再培養12小時後, 以實施例6記載之方法進行NO藉由於培養基中氧化所產生之 NO_2^- 濃度之測定。又, 作為對照, 設定無加LPS, IFN- γ 水溶液之分區。又全部測定以3份進行。

此結果, 於藉由經口投以30毫升/公斤之化合物(7)予小鼠製備之腹腔巨噬細胞, 可確認顯著抑制NO產生, 瓊脂寡糖於自由飲水顯示強的抑制NO產生之作用。

其結果示於圖22。亦即, 圖22為於各培養條件培養時之培養基中 NO_2^- 濃度之圖, 橫軸表培養條件, 縱軸表 NO_2^- 濃度(μM)。

實施例9

將實施例1記載之化合物(7)懸浮於橄欖油(拿卡來鐵斯克公司製)使成1%, 製備化合物(7)之1%懸浮液。

將上述製備之化合物(7)之1%懸浮液以10或30毫升/公斤之投予量, 1日1次, 於15日間強制經口投予ddy小鼠(日本SLC; 雌, 7週齡)12次。又, 作為對照, 將自來水同樣地強制經口投予。又, 以各群3隻進行。其後, 將含有10%胎牛血清之RPMI 1640培養基(拜歐為他卡公司製, Code. 12-702F) 4毫升注入腹腔內, 徹底按摩後拔出, 彙集3隻份得腹腔細胞。將腹腔細胞懸浮於含有10%胎牛血清之RPMI 1640培養基, 使成 10^6 個/毫升, 於48孔洞微定量皿中各加500微升, 於5% CO_2 存在下, 於37 $^\circ\text{C}$ 培養2小時, 其後, 除去培養上清液, 得接著性細胞, 作為腹腔巨

五、發明說明 (45)

噬細胞使用。於各孔洞中重新加含有10%胎牛血清、不含酚紅、含有2 mM L-麩胺醯胺之達耳貝可改良易戈培養基(拜歐為他卡公司製, Code. 12-604F)各500微升, 加10微升之50微克/毫升脂多糖(LPS, 夕戈馬公司製, Code. L-2012), 2000單位/毫升干擾素 γ (IFN- γ , 可斯莫拜歐公司出售, Code. GZM-MG-IFN)水溶液, 再培養12小時後, 以實施例6記載之方法進行NO藉由於培養基中氧化所產生之NO₂⁻濃度之測定。又, 作為對照, 設定無加LPS, IFN- γ 水溶液之分區。又全部測定以3份進行。

上述培養後, 使用前列腺素E₂ ELISA套組(尼歐健公司製, Code. 404110)測定培養上清液中之前列腺素E₂量。又, 全部測定以3份進行。

此結果, 於藉由經口投以30毫升/公斤之化合物(7)予小鼠製備之腹腔巨噬細胞, 可確認顯著抑制PGE₂產生, 瓊脂寡糖於自由飲水顯示強的抑制PGE₂產生之作用。

其結果示於圖23。亦即, 圖23為表示於各培養條件培養時, 培養基中之PGE₂濃度之圖, 橫軸表培養條件, 縱軸表PGE₂濃度(毫微克/毫升)。

實施例10

將HL-60細胞(ATCC CCL-240)懸浮於含有含100 μ M羥基脲之10%胎牛血清(紀夫可公司製)之RPMI 1640培養基(拜歐為他卡公司製, 12-702F)中使成5 x 10⁵個/毫升, 將20毫升加於10公分培養皿, 於5% CO₂存在下。於37°C培養一夜, 使細胞停止於G1期。以離心回收此細胞, 再度懸

五、發明說明 (46)

浮於含有含 $100 \mu\text{M}$ 羰基脲之 10% 胎牛血清 (紀夫可公司製) 之 RPMI 1640 培養基使成 5×10^5 個 / 毫升，於 6 孔洞微量皿中之各孔洞各加 5 毫升。一方面，作為未經羰基脲處理之細胞，將 HL-60 細胞懸浮於含有 10% 胎牛血清 (紀夫可公司製) 之 RPMI 1640 培養基使成 1×10^5 個 / 毫升，於 6 孔洞之微量皿之各孔洞中各加 5 毫升。於經羰基脲處理之細胞分區之各別之孔洞中，加 30, 22.5, 5, 15, 7.5 mM 之 DGE 水溶液 50 微升，或 60, 45, 30, 15 mM 之化合物 (7) 二甲亞砷溶液 25 微升，100, 75, 50, 25 mM 之化合物 (17) 二甲亞砷溶液 25 微升，又於未經羰基脲處理之細胞分區之各別之孔洞中，加 8, 6, 4, 2 mM 之 DGE 水溶液 50 微升，30, 22.5, 15, 7.5 mM 之化合物 (7) 二甲亞砷溶液 25 微升，80, 60, 40, 20 mM 之化合物 (17) 二甲亞砷溶液 25 微升，再培養 48 小時。其後，回收培養液，藉離心收集細胞，懸浮於 5 毫升之新的含 10% 胎牛血清 (紀夫可公司製) 之 RPMI 1640 培養基，使用其中 100 微升藉由預混合 WST-1 增殖測定系統 (寶酒造公司製，MK400)，測定生細胞數。

此結果，對於經羰基脲處理之細胞之任一檢品，與未處理之細胞比較，50% 增殖抑制濃度 (IC_{50}) 皆高。其結果示於表 3。亦即，表 3 為將各檢出與其 IC_{50} (μM) 彙集之表。自此，可明白 DGE 及為其前驅體之化合物 (7) 及如化合物 (7) 之化合物 (稱為 R-AhGal 化合物)，對於停留於 G1 期之細胞毒性低。亦即，於生體，幾乎所有細胞停留於 G1 期之狀態，所以 DGE 及其前驅體之 R-AhGal 化合物，對於生

五、發明說明 (47)

體為毒性少之藥劑。

表 3

	經羥基脲處理之細胞 (μM)	未經羥基脲處理之細胞 (μM)
DGE	101.2	49.5
化合物(7)	150.6	79.1
化合物(17)	264.5	189.8

實施例 11

(1) 藉由氣相層析法檢出 DGE 之條件之確立

將 DGE (2 毫克) 及內部標準品之 2-脫氧-葡萄糖 (拿卡來鐵斯克: Code. 107-22) (2 毫克) 溶於 200 微升之水, 添加 3 當量之 NaBH_4 , 於室溫還原 4 小時。反應液以無水乙酸中和, 濃縮使乾後, 加吡啶 (1 毫升)、無水乙酸 (1 毫升) 及 4-二甲氨基吡啶, 一方面以超音波處理 1 小時進行乙醯化反應。反應液以氯仿 (2 毫升) 稀釋, 一面冰冷一面加飽和 NaHCO_3 溶液, 停止反應。有機層以冷水洗數次, 以無水 MgSO_4 乾燥後, 濃縮使乾。所得之反應物 (糖醇乙酸酯化物) 溶於丙酮, 藉氣相層析法以以下之條件分析。

機種 : shimadzu-17A (島津製作所)

管柱 : Ultra 2 Capillary Column (0.32mm x 25m) (Hewlett-Packard)

溫度 : 160 → 220°C、3°C/分

檢出 : FID

其結果, DGE 於 15.443 分, 2-脫氧-葡萄糖於 20.456 分

五、發明說明 (48)

檢出。

其結果示於圖 24。亦即圖 24 為表示氣相層析法之結果之圖。縱軸表檢出強度(mV)，橫軸表滯留時間(分)。

(2) 檢量線之作成

將內部標準品之 2-脫氧-葡萄糖(分別為 20、20、200、200、200 微克)混合於 DGE 之高純度純化品(0.5, 2.5, 12.5, 62.5, 312.5 微克)中，使溶於培養基(100 微升)後，使用 4.0 當量之 NaBH_4 (於預試驗，確認為 3.0~10 當量無差異)，於室溫還原 4 小時。其後，對各檢品進行同樣之操作，使糖醇乙酸酯化後，藉由氣相層析法，以與上述同樣之條件分析。自所得之氣相層析法之結果，藉由 DGE 與內部標準品之面積比，及對應之 DGE 與內部標準品之重量比作成檢量線。其結果示於圖 25。亦即，圖 25 為表示 DGE 與內部標準品之面積，與對應之 DGE 與內部標準品之重量比之檢量線之圖，縱軸表 DGE 與內部標準品之面積比，橫軸表 DGE 與內部標準品之重量比。

(3) 自各化合物定量培養基中產生之 DGE

將化合物(2)(◇)、(7)(X)、(11)(▲)、(14)(■)、(17)(●)、(19)(*)、(21)(|)、及瓊脂糖(◆)1~3 毫克分別溶於 1 毫升之培養基後，於 37℃ 培養後，經時地採取(4、8、12、24、48 小時)培養基各 200 微升。採取後，立刻進行與上述同樣之操作，所得之糖醇乙酸酯化物藉由氣相層析法以與上述同樣之條件分析。自所得之結果藉由 DGE 與內部標準品之面積比，自檢量線算出 DGE 之量。

五、發明說明 (49)

自此結果，由所得之各化合物對DGE之轉換率之時間經過示於圖26。亦即，圖26為表示各化合物對DGE之轉換率之時間經過之圖，縱軸表DGE之生成率(7%)，橫軸表培養時間(小時)。

實施例12

將RAW 264.7細胞(ATCC TIB 71)懸浮於含10%胎牛血(紀夫可公司製)之達耳貝可改良易戈培養基(拜歐為他卡公司製，12-604F)，使成 3×10^5 個/毫升，於48孔洞之微量皿之孔洞中各加0.5毫升，於5% CO₂氣體存在下，於37°C培養一夜。於各孔洞中各加5微升之10 mM化合物(14)水溶液或1微升之25 mM化合物(7)、50 mM化合物(17)二甲亞砷溶液，再培養5小時後，添加5微升之100微克/毫升脂多糖(LPS，夕戈馬公司製L-2012)水溶液培養18小時，回收培養上清液。培養上清液中之介白素(IL-10)之含量之酵素免疫三明治測定法(ELISA；Mouse IL-10 ELISA套組，原多健(エンドゼン)公司製)測定。又，作為對照，設定無加檢品、LPS水溶液之分區。又，全部測定以2份進行。

此結果，於添加化合物(14)、化合物(7)、化合物(17)之任一者之分區，皆可確認抑制LPS誘導IL-10產生。其結果示於圖27。亦即，圖27為表示於各培養條件下培養時，培養上清液中之IL-10之濃度之圖，橫軸表培養條件下，縱軸表IL-10濃度(微微克/毫升)。

又，對於此等化合物，對1,2-O-十四醯基佛波醇

五、發明說明 (50)

(phorbol) 13- 乙酸酯 (TPA) 誘導介白素 6 之影響進行實驗時，可確認抑制 TPA 誘導 IL-6 產生。

實施例 13

將 RAW 264.7 細胞 (ATCC TIB 71) 懸浮於含 10% 胎牛血 (紀夫可公司製) 之達耳貝可改良易戈培養基 (拜歐為他卡公司製, 12-604F), 使成 3×10^5 個 / 毫升, 於 48 孔洞之微量皿之孔洞中各加 0.5 毫升, 於 5% CO_2 氣體存在下, 於 37°C 培養一夜。於各孔洞中各加 50 微升之 10 mM 或 5 mM 化合物 (11)、化合物 (14) 水溶液或 5 微升之 50 mM 或 25 mM 化合物 (7) 或 5 微升之 100 mM 或 50 mM 化合物 (17) 二甲亞砷溶液, 培養 12 小時。又, 作為血紅素加氧酶誘導之陽性對照, 設定添加 5 微升之 mM 15-脫氧- Δ 12,14 前列腺素 J2 (克曼化學 (ケイマンケミカル) 公司製, 18750) 二甲亞砷溶液之分區, 又, 作為陰性對照, 設定添加水之分區。藉由刮板剝下細胞回收, 懸浮於含有 0.05 mM 胃蛋白抑制素 (夕戈馬公司製, P5318), 0.2 mM 甲 [乙] 亮-亮-精三肽 (夕戈馬公司製, L2884)、1 mM 氟化苯甲磺醯 (拿卡來鐵斯克公司製, 273-27)、10 mM 乙二胺四乙酸二氫鈉、0.1% Triton X-100 之 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5), 1 次冷凍融解後, 藉離心以上清液為蛋白質部分。蛋白質部分之蛋白質含量藉由 Micro BCA Protein Assay Reagent (寶酒造社販賣匹阿斯 (ピラス) 社製, P7411) 測定。將此製備之各蛋白質部分檢品與等量之 4% 十二硫酸鈉 (SDS)、2% 20 巰基乙醇、0.001% 溴酚藍、20% 甘油之 0.125M Tris-HCl 緩衝液

五、發明說明 (51)

(pH 6.8) 混合，於 100°C 處理 5 分後，將作為蛋白質量 10 微克負載於 12.5% SDS-聚丙稀醯胺凝膠上，於 20 mA 之定電流下電泳。電泳後，凝膠藉由含有 48 mM Tris，39 mM 甘胺酸、20% 甲醇、0.0375% SDS 之墨點法緩衝液，用トランスブロット SDセルセミドライブロットティング(半乾墨點)裝置(拜歐來德(バイオラッド)公司製)，依實驗計劃書，於 PVDF 膜(迷你孔(ミリポア)公司製，IPVH 000 10)以 15 V(伏特)之定電壓轉錄 25 分。轉錄後之 PVDF 膜於封阻溶液(ブロッケース)(大日本製藥社製，UK-B25)中於 4°C 下吸漬一夜。吸漬後之膜藉由含有 0.1% 吐恩(Tween) 20 之磷酸緩衝食鹽水，慢慢地振盪 15 分、3 次洗淨。其次，於含 200 毫微克/毫升抗血紅素加氧酶抗體(N-19；山塔克爾茲(サンタクルーズ)公司製，SC-7696)之 10% 封阻液、0.1% 吐恩 20 之磷酸緩衝食鹽水中，於室溫下慢慢振盪 1 小時下反應，藉由含 0.1% 吐恩之緩衝食鹽水緩慢振盪 15 分 3 次洗淨。其次，於含 0.1% 過氧化酶標記之兔抗山羊 IgG(H+L)抗體(載美德(ザイメッド)公司製，61-1620)之 10% 封阻液、0.1% 吐恩 20 之磷酸緩衝食鹽水中於室溫慢慢振盪 1 小時下反應，藉含 0.1% 吐恩 20 之磷酸緩衝食鹽水慢慢振盪 15 分 5 次洗淨。接著，使用西方染色(ウェスタブロットケミルミネッセンスリージェントプラス，第一化學社販賣 NEN ライフサイエンスプロダクツ公司製 NEL 103)，藉由所附之計劃書將 PVDF 膜染色，感光於 X 光底片(柯達公司製，CAT 165 1454)。感光後之底片藉 FPM 800(富士

五、發明說明 (52)

底片公司製)顯像。

其結果，於任一添加檢品之分區皆可確認來自血紅素加氧酶1蛋白質之環帶。又，環帶之強度依賴各檢品之濃度。此結果示於表4，於表中，依照血紅素加氧酶1蛋白質之環帶強度記為+之記號。亦即，完全見不到環帶者為-，依+-，+++之順序表環帶之強度變強。

表4

檢品	血紅素加氧酶1蛋白質 之環帶強度
水(陰性對照)	-
最後濃度100 μ M 化合物(11)	++
最後濃度50 μ M 化合物(11)	+
最後濃度100 μ M 化合物(14)	++
最後濃度50 μ M 化合物(14)	+
最後濃度50 μ M 化合物(7)	+
最後濃度25 μ M 化合物(7)	+
最後濃度100 μ M 化合物(17)	++
最後濃度50 μ M 化合物(17)	+
15-脫氧- Δ 12,14前列腺素J ₂ (陽性對照)	+

產業上之利用可能性

由本發明提供用作為細胞凋亡誘發劑、抑癌劑、活性氧產生抑制劑、過氧化脂質自由基產生抑制劑、NO產生抑制劑等之抗氧化、抗病原微生物劑、保鮮劑、抗受異原劑、血糖上升抑制劑、抗高脂血症劑之有效成分之以通式

五、發明說明 (53)

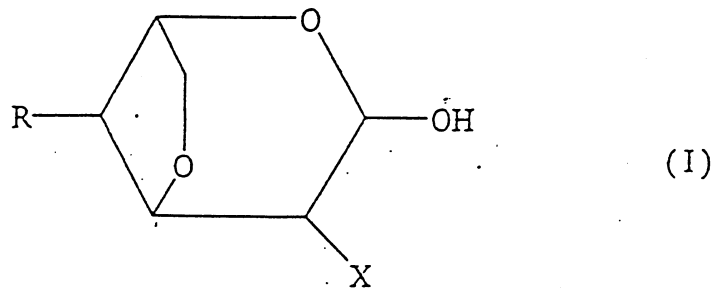
I表示之化合物及以該化合物為有效成分之對該化合物顯示感受性之疾病之治療或預防用醫藥。

該化合物用作細胞凋亡誘發用醫藥、抑癌用醫藥、活性氧產生抑制用醫藥、NO產生抑制用醫藥等之有效成分，又，含有該化合物、稀釋及/或添加所成之食品或飲料有用的作為具有細胞凋亡誘發作用、抑癌作用、活性氧產生抑制作用、NO產生抑制作用等之抗氧化作用、抗病原微生物抑制作用、抗變異原作用、血糖上升抑制作用、抗肥胖作用等之機能性食品或飲料，於癌患者及病毒性疾病患者之病變細胞誘發細胞凋亡，提供有效於此等疾病之預防、症狀改善之食品或飲料。尤其大腸癌、胃癌等消化器系之癌之情形，將本發明之上述化合物作為食品、飲料經口攝取，可引起癌細胞之細胞凋亡，所以本發明之食品或飲料具有優越之預防消化器系癌、改善症狀之效果。另外，藉由其活性氧產生抑制作用等之抗氧化作用上述之食品或飲料作為抗氧化壓力用食品或飲料亦為優越。又，藉由本發明提供含有以通式I表示之化合物之甘味料，作為低熱量甘味料，於食品、飲料之範圍有用。

又，以通式I表示之化合物於生體內轉變為以通式IV表示之化合物，以通式IV表示之化合物，特別有用於組織特異性藥物輸送系統之構築。

四、中文發明摘要(發明之名稱：含有3,6-脫水半乳糖或其硫酸化物之治療劑)

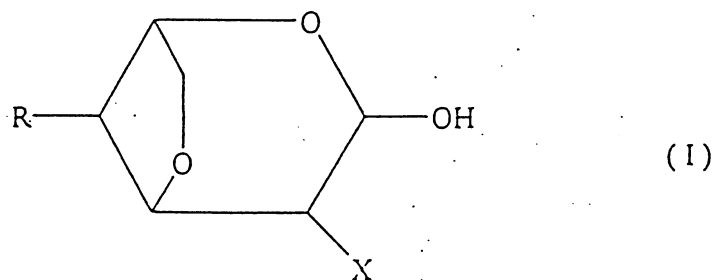
本申請案係有關以通式I：



(式中，X為OH或OSO₃H，R為OH以外之取代基，該取代基為藉由其之除去，可於3,6-脫水半乳糖或其之硫酸化物之3位與4位導入不飽和鍵之取代基及/或顯示組織特異性親和性之取代基)之化合物。

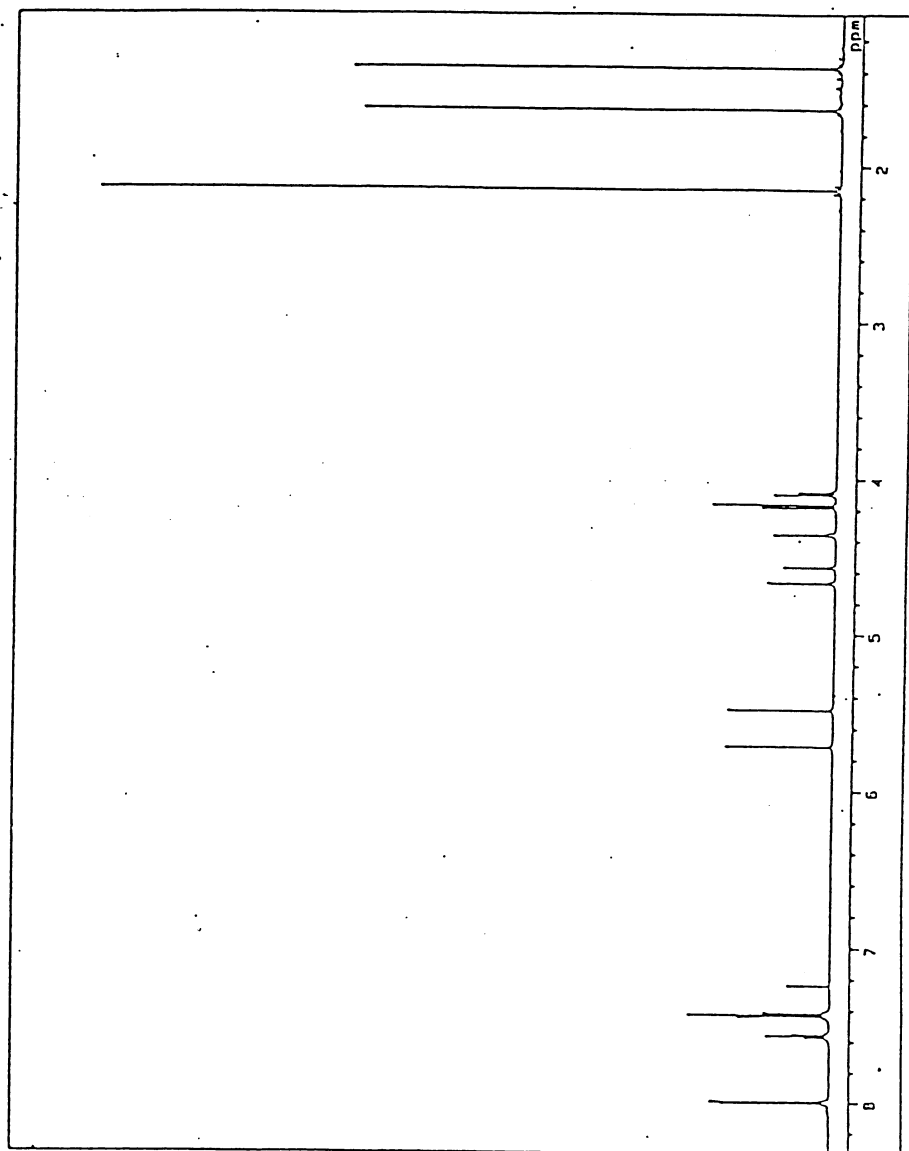
日文發明摘要(發明之名稱：3,6-アンヒドロガラクトース又はその硫酸化体を含む治療剤)

一般式I：



(式中、XはOHまたはOSO₃Hであり、RはOH以外の置換基で、当該置換基はそれが離脱することにより、3,6-アンヒドロガラクトースまたはその硫酸化体の3位と4位に不飽和結合を導入できる置換基および/または組織特異的親和性を示す置換基である)

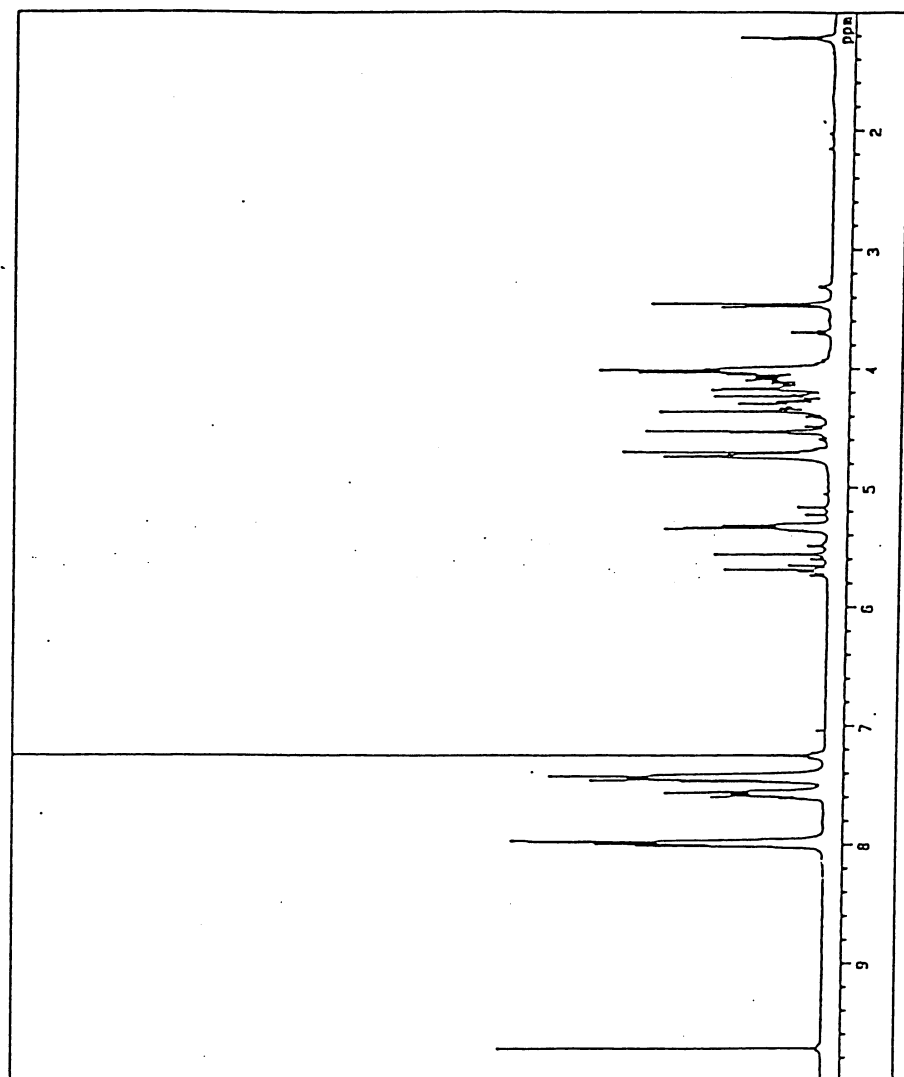
で表される化合物、



化學位移值 (ppm)

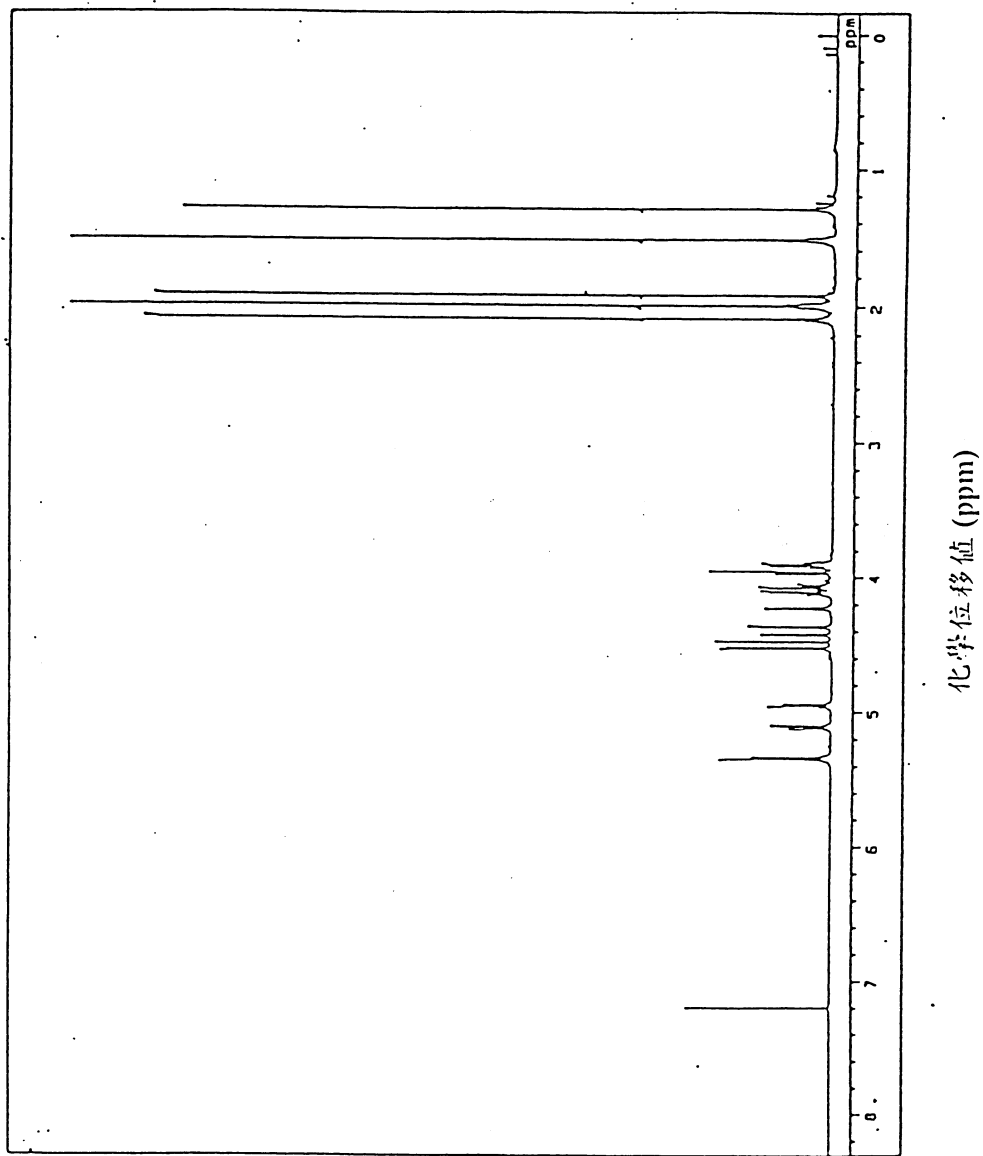
信號之強度

圖 1



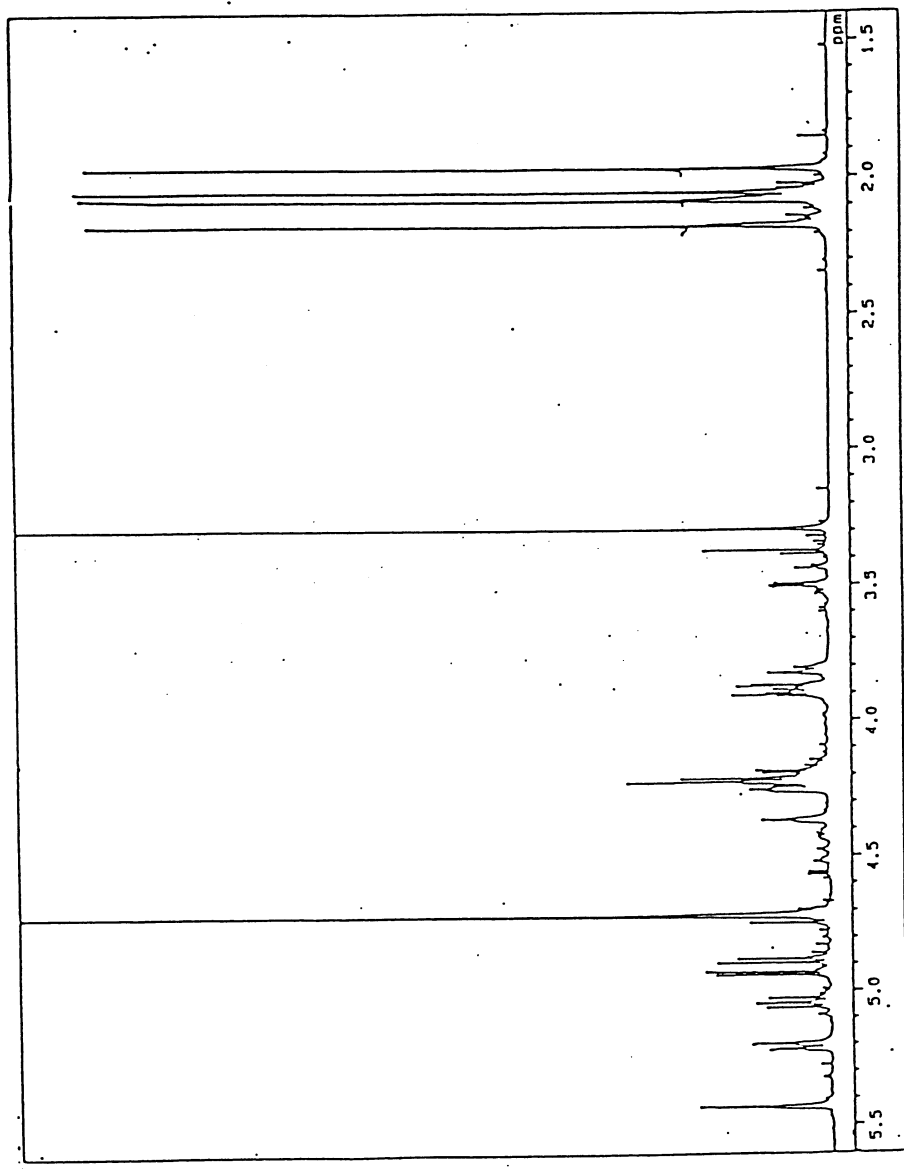
信號之強度

圖 2



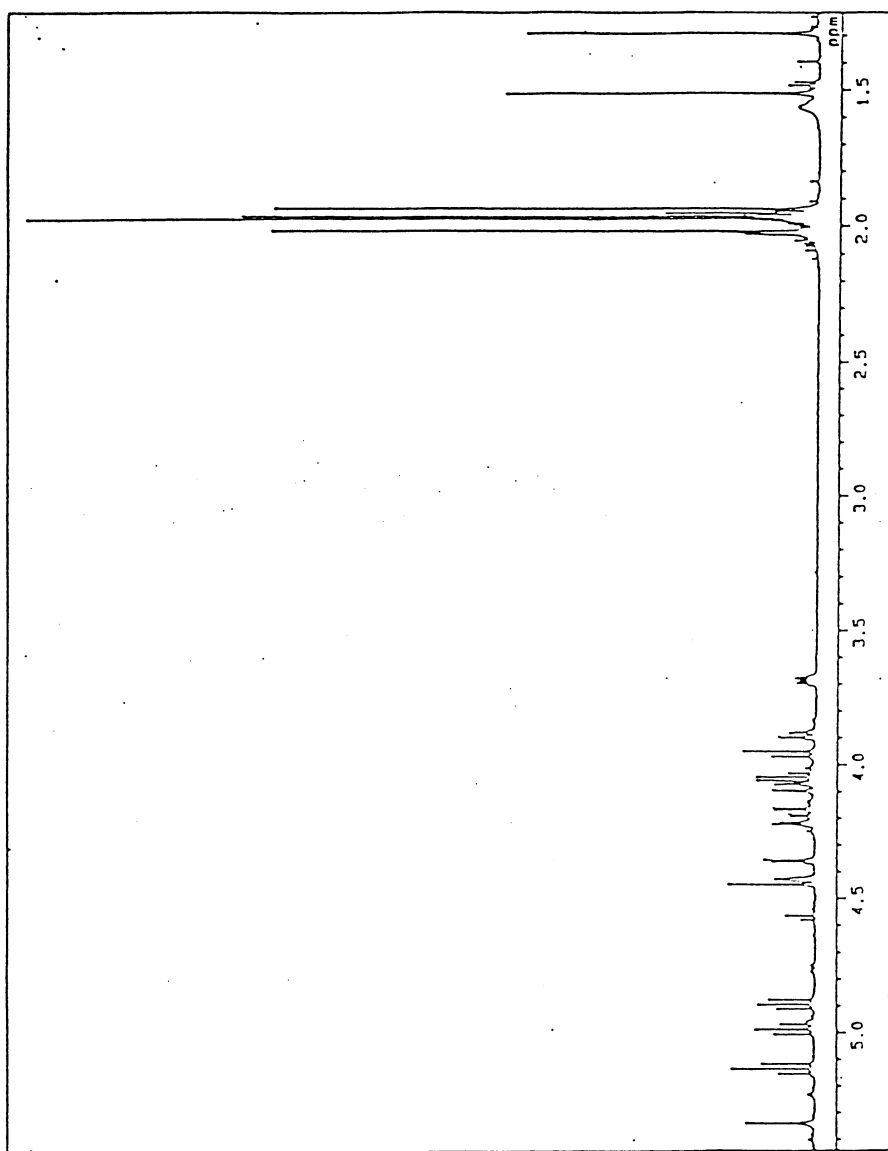
信號之強度

圖 3



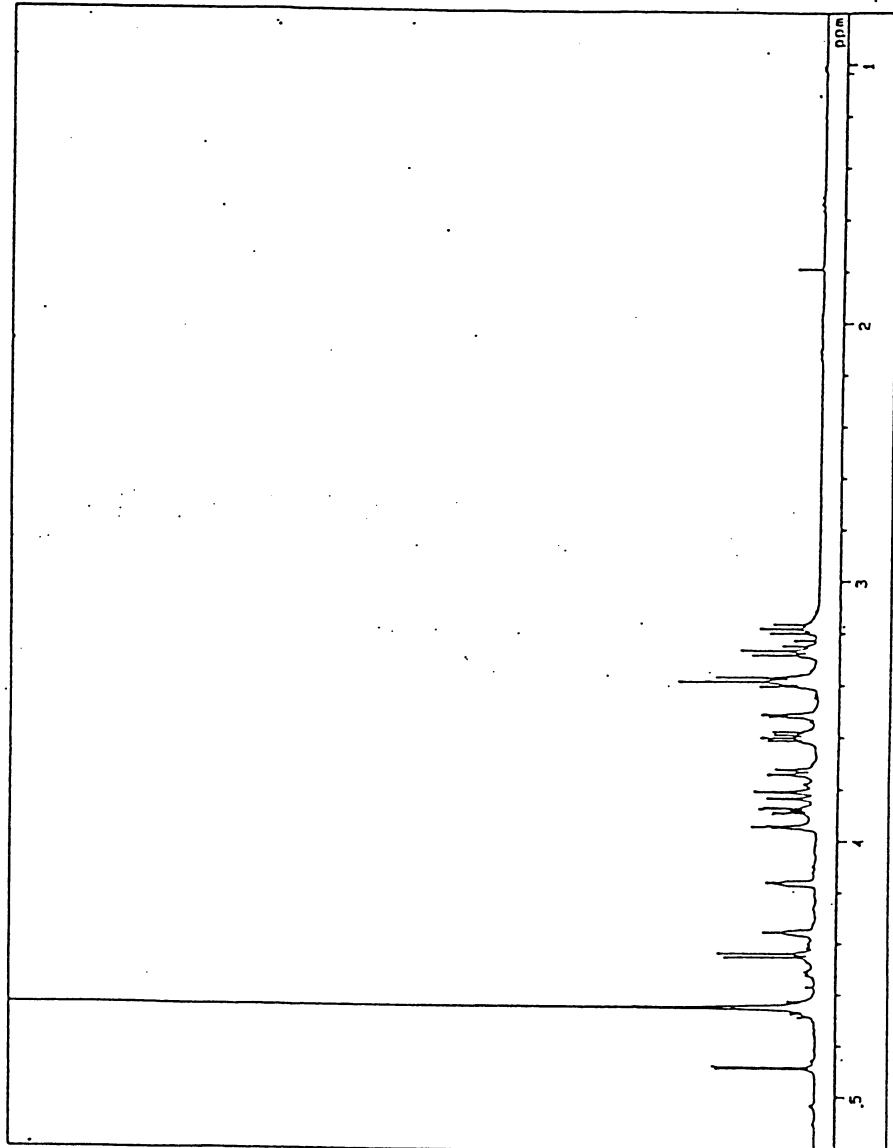
信號之強度

圖 4



信號之強度

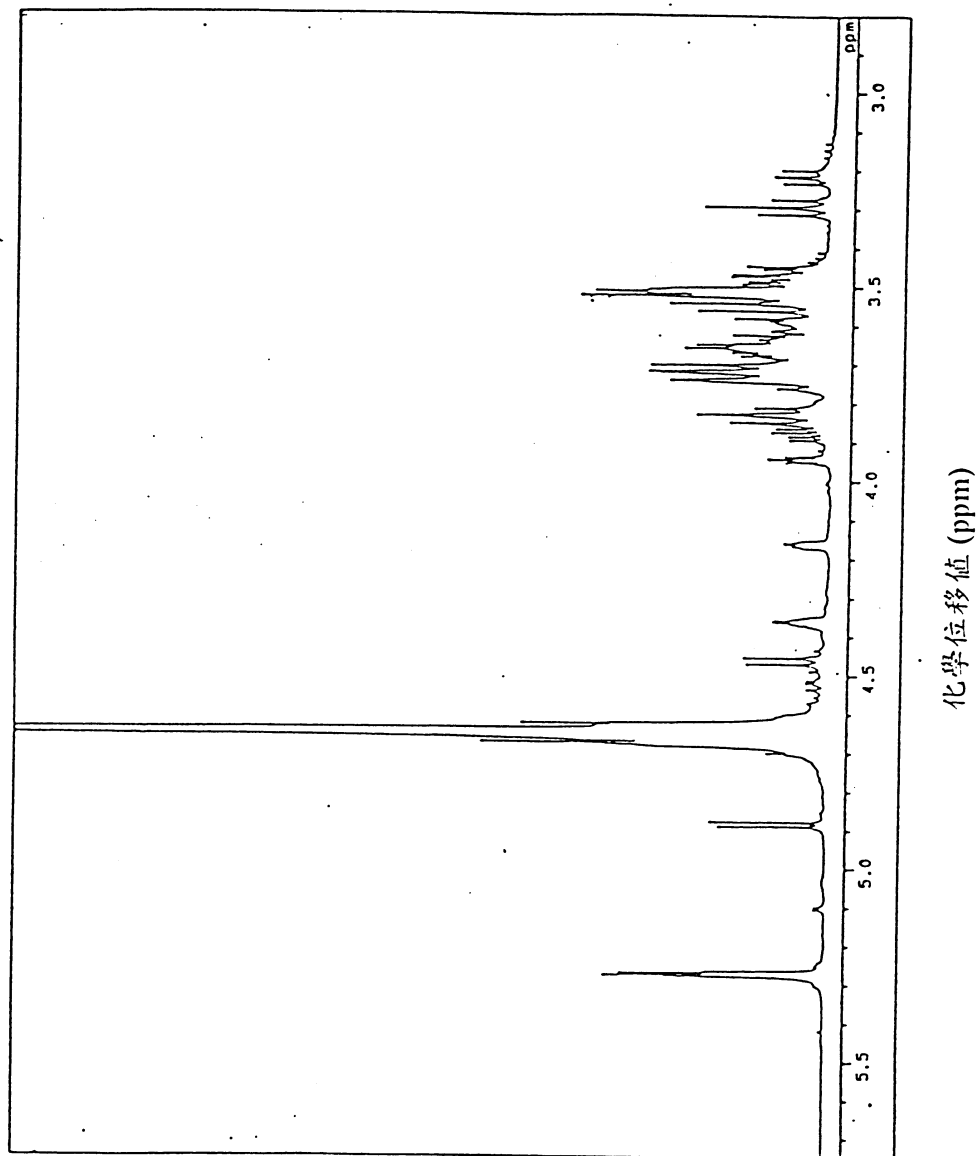
圖5



信號之強度

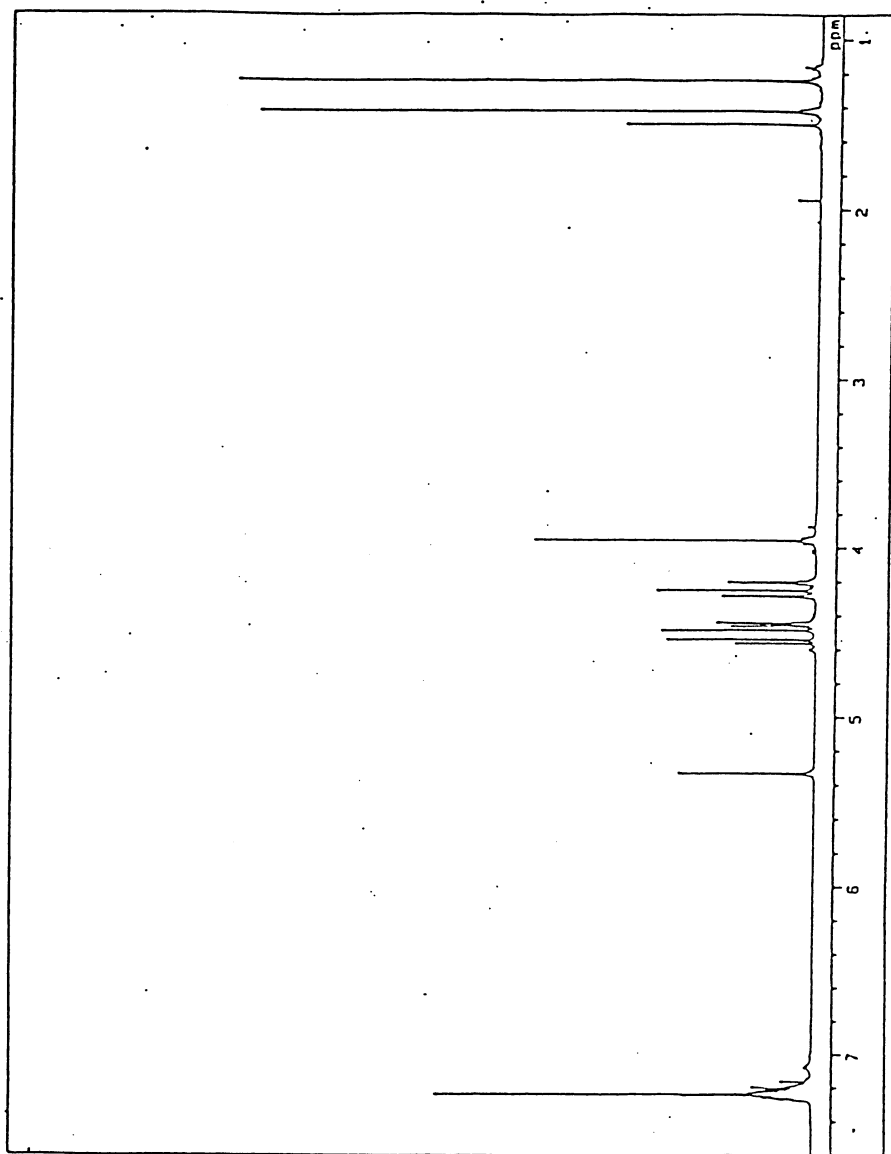
圖6

I290144



信號之強度

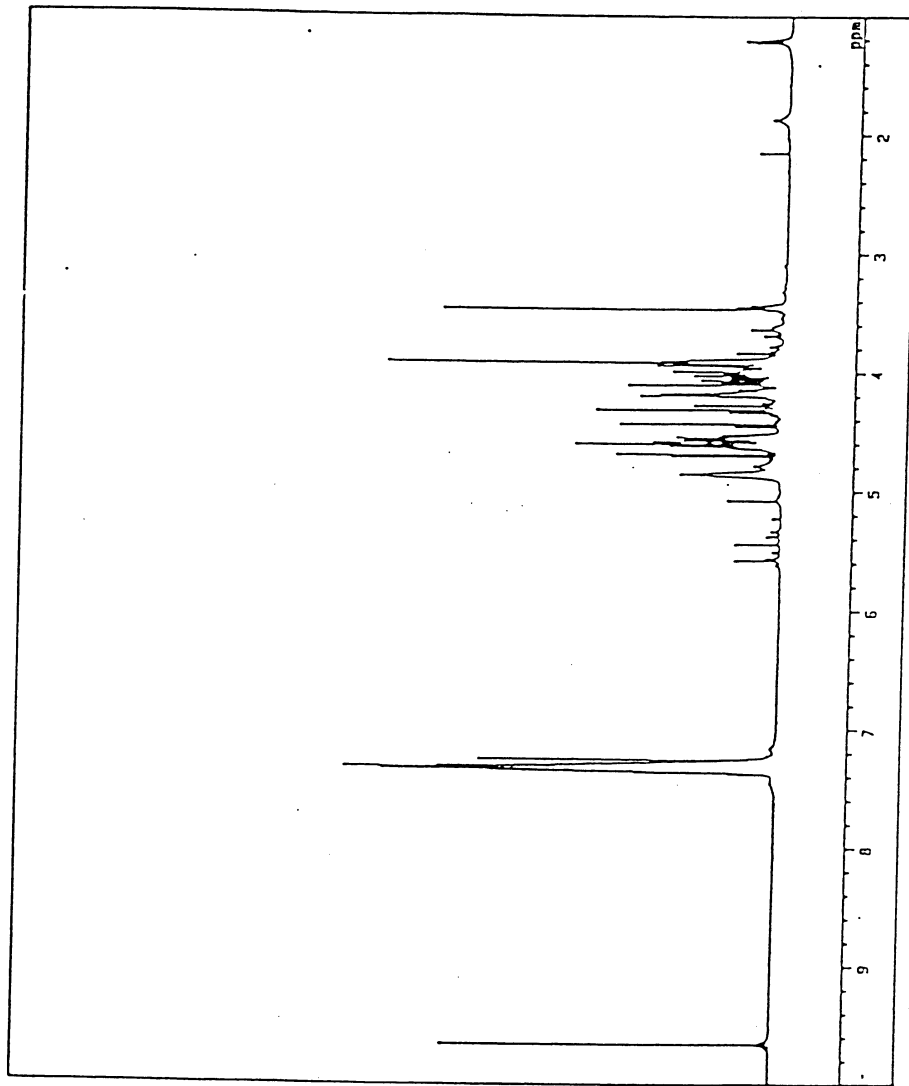
圖 7



化學位移值 (ppm)

信號之強度

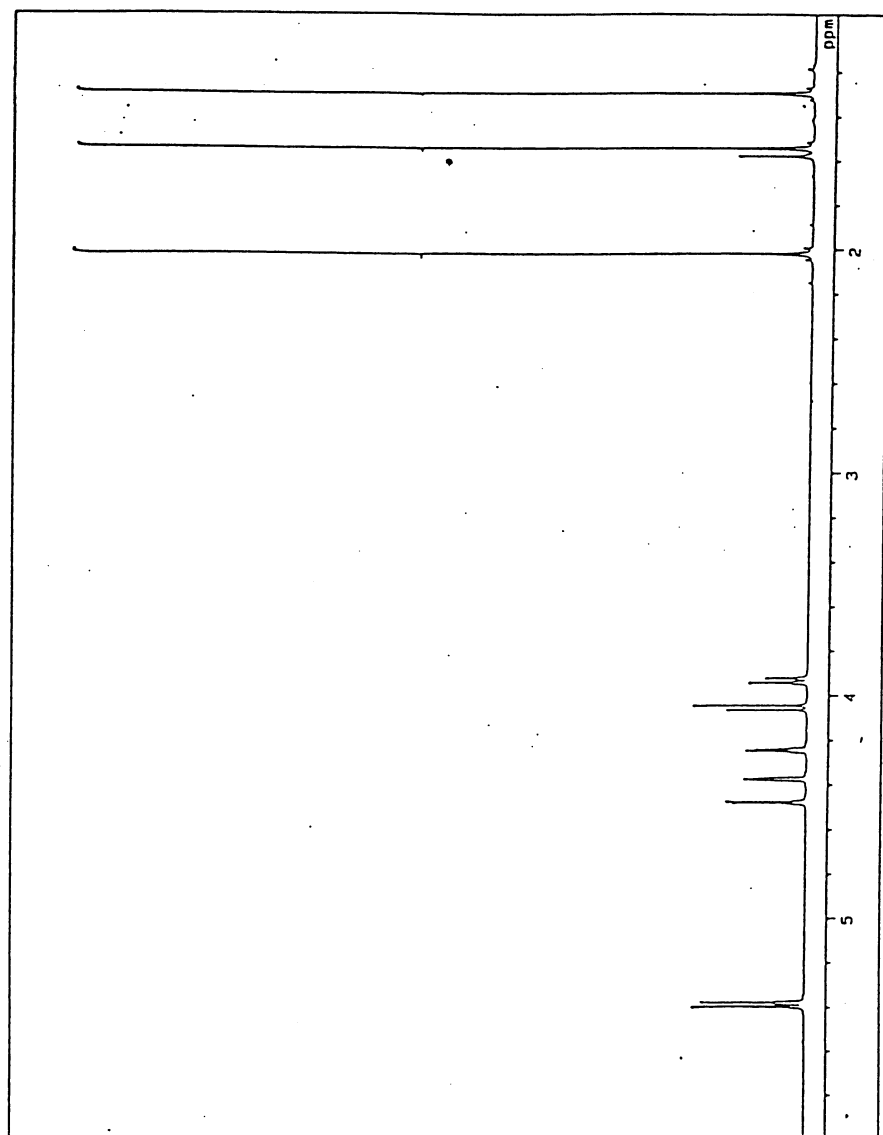
圖 8



信號之強度

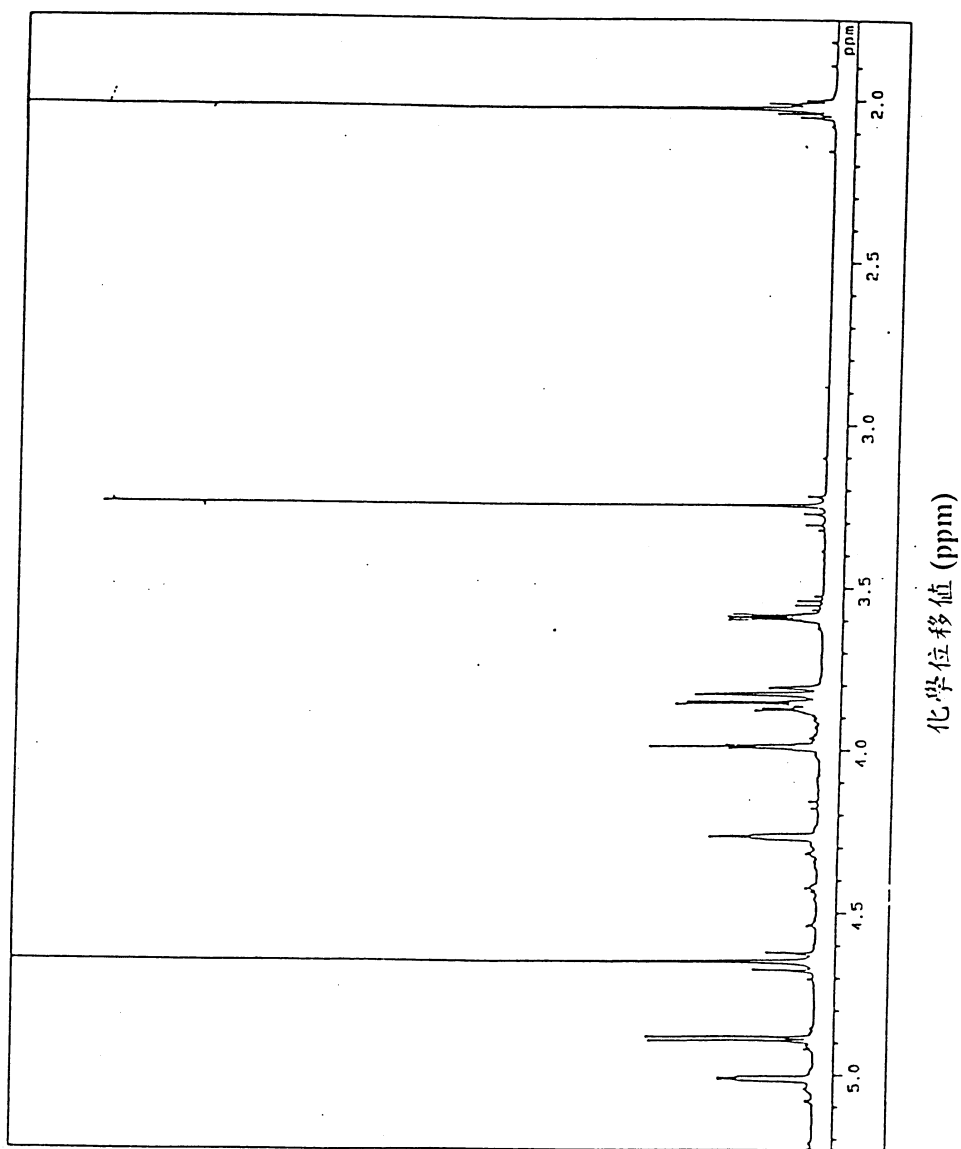
圖9

I290144



信號之強度

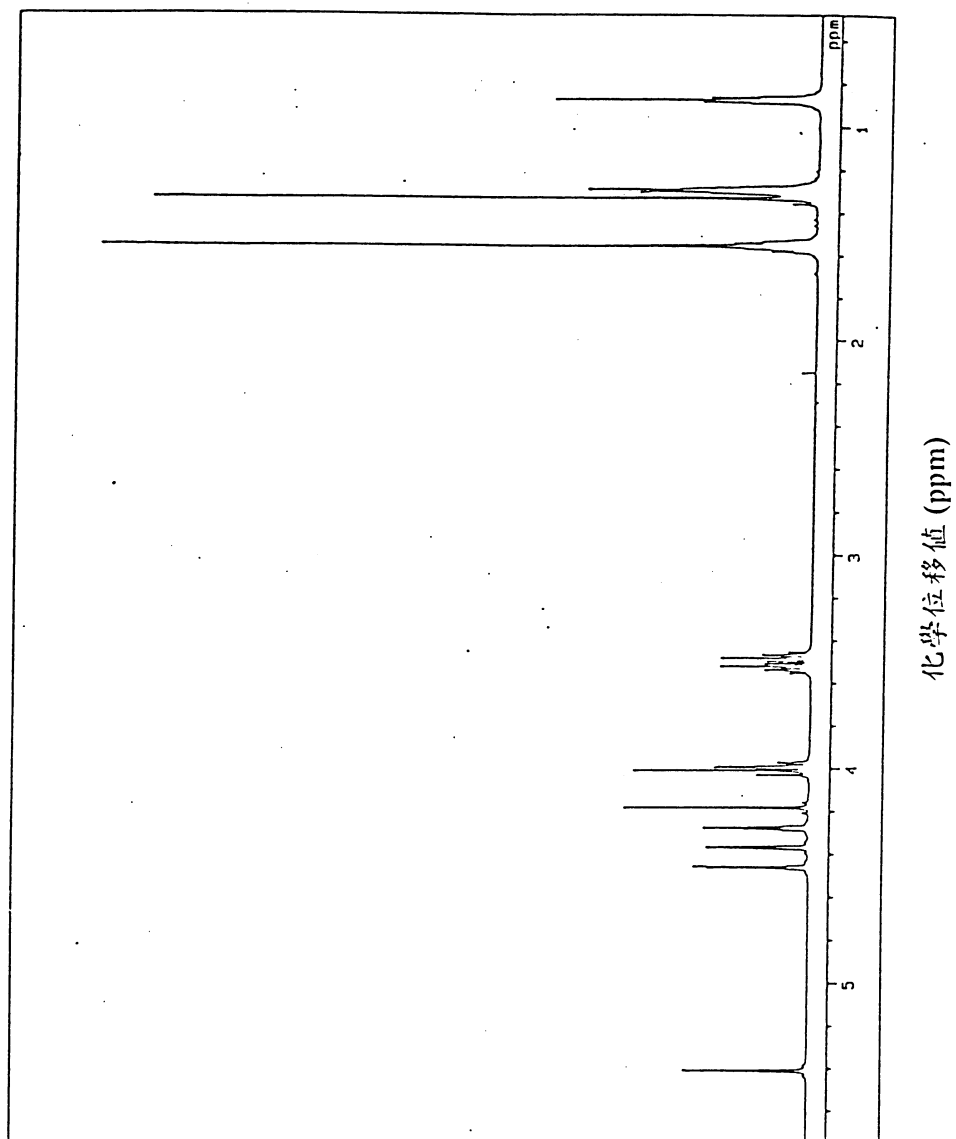
圖 10



信號之強度

圖 11

I290144



信號之強度

圖 12

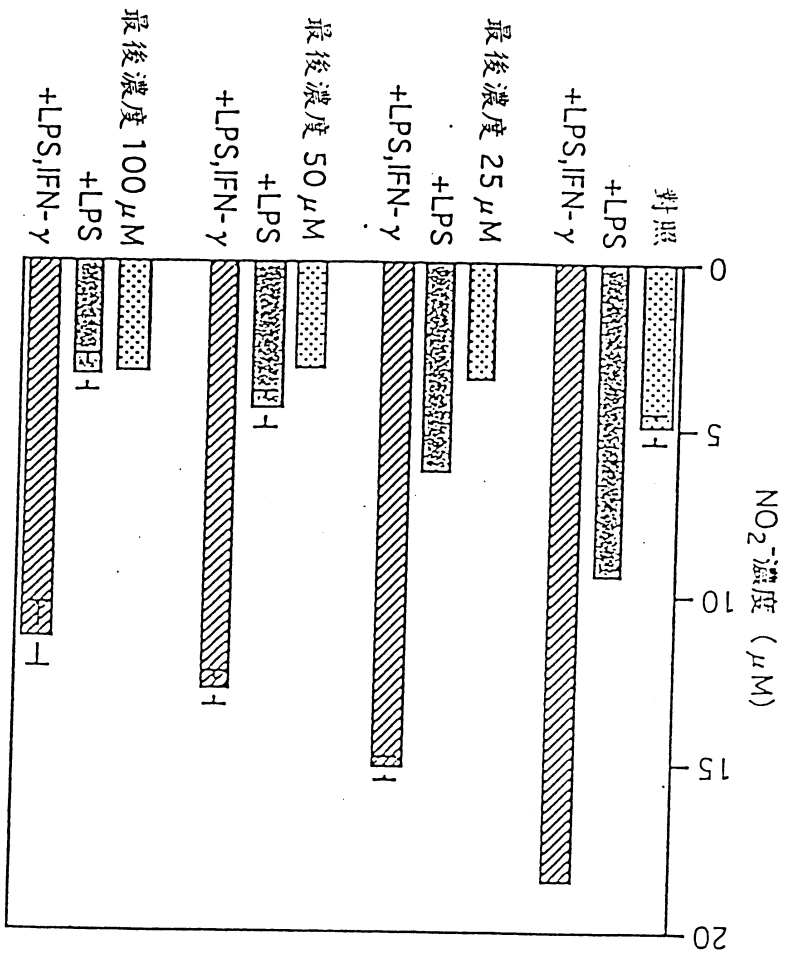


圖 13

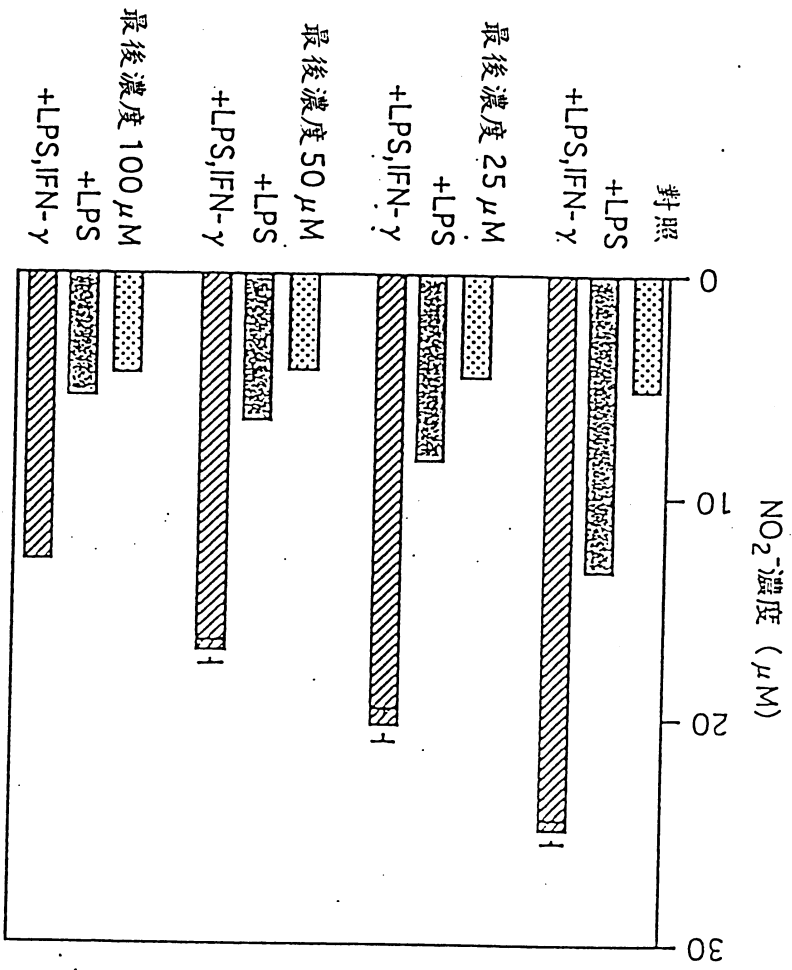


圖 14

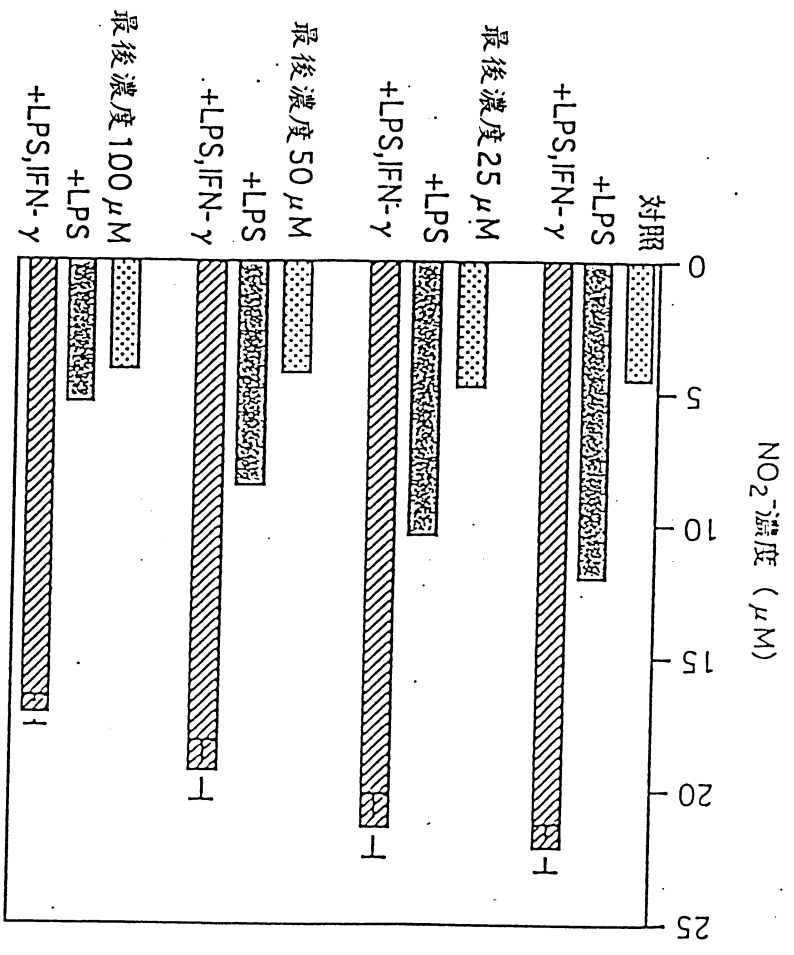


圖 15

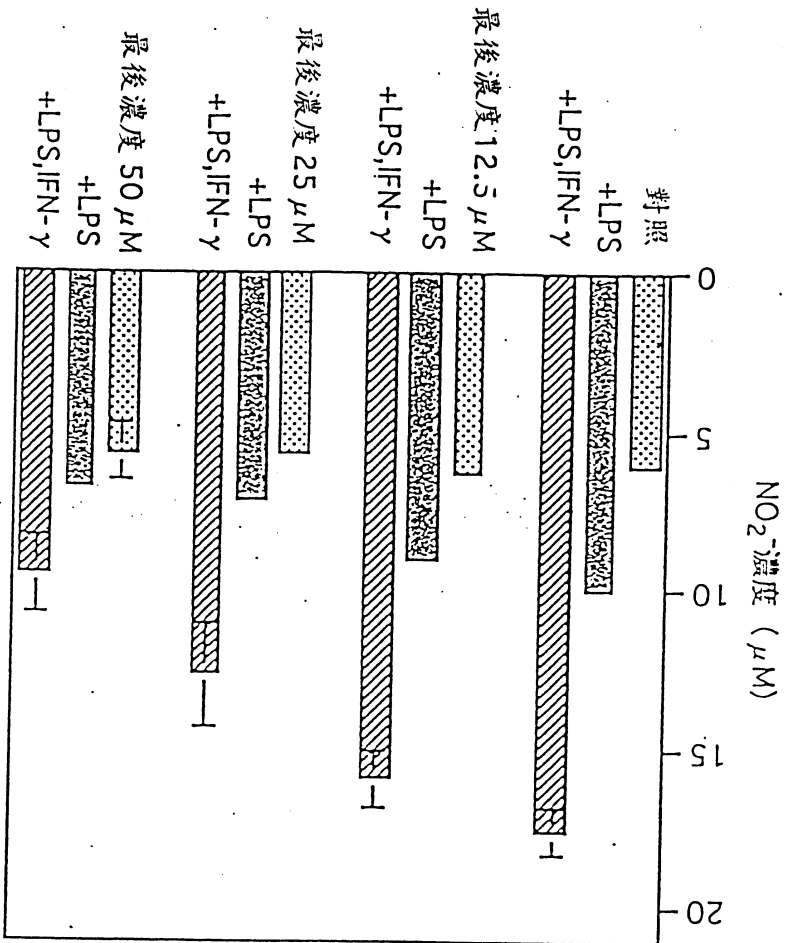


圖 16

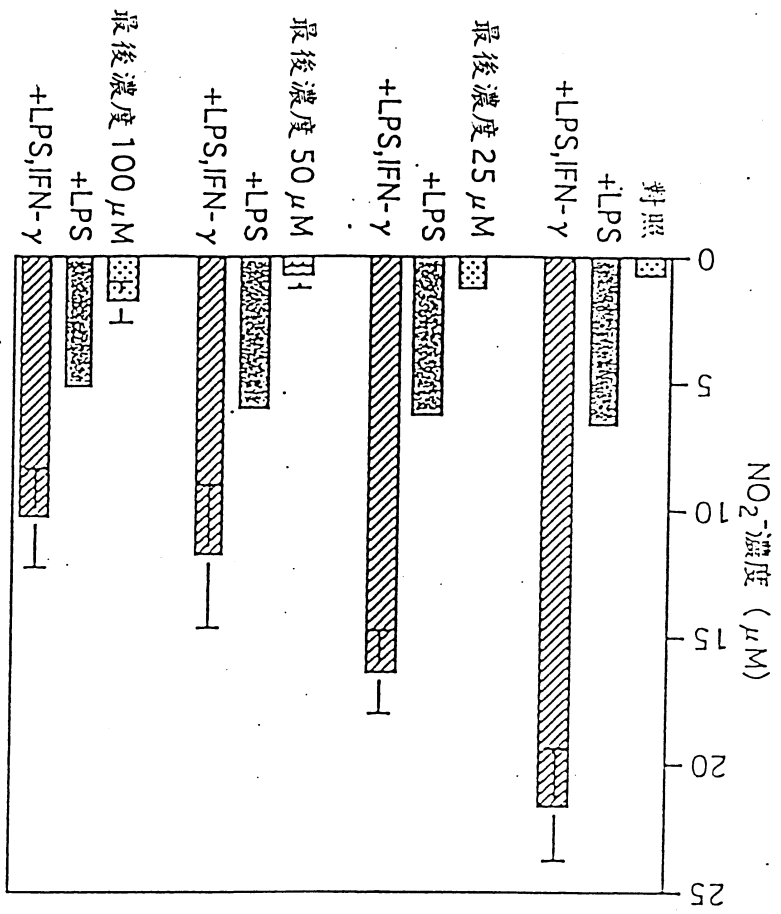


圖 17

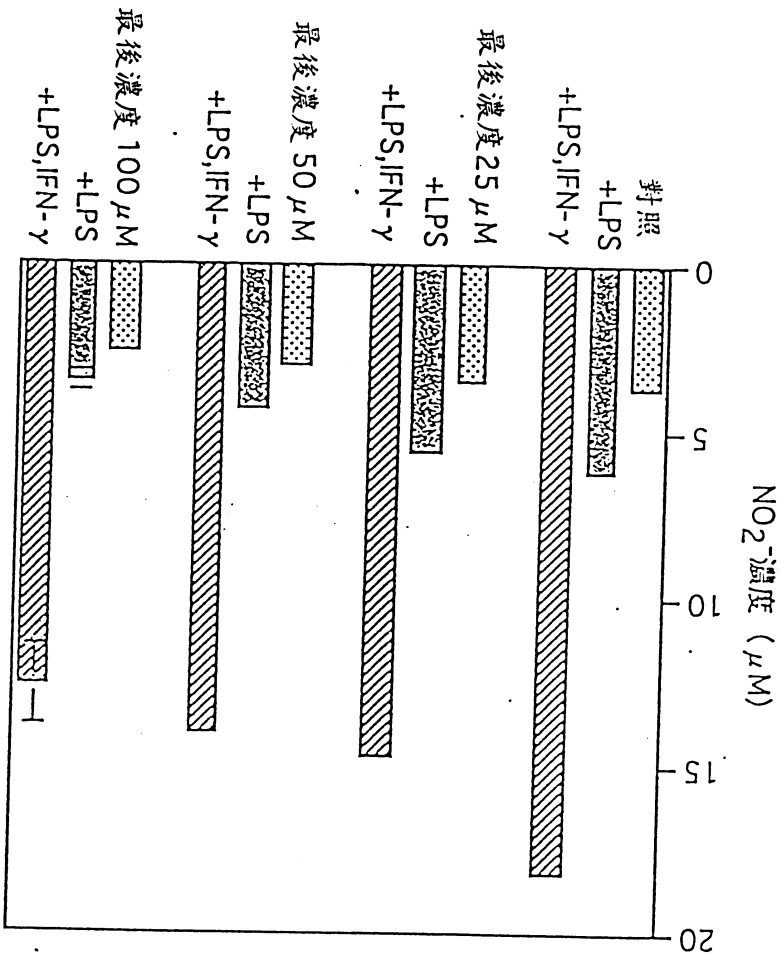


圖 18

化合物19

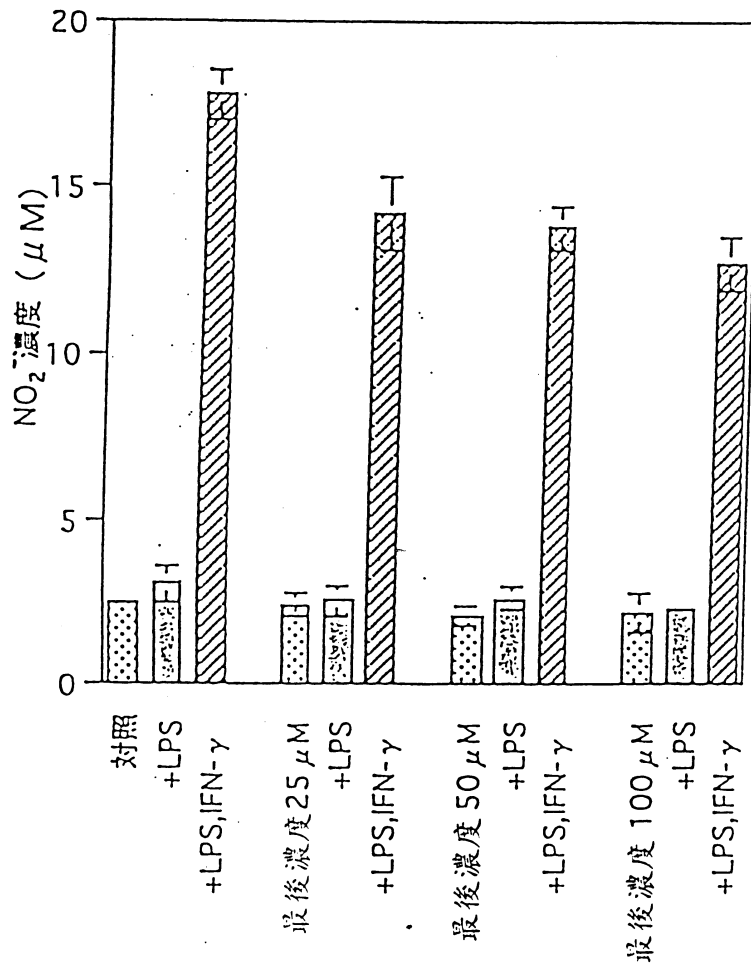


圖 19

化合物21

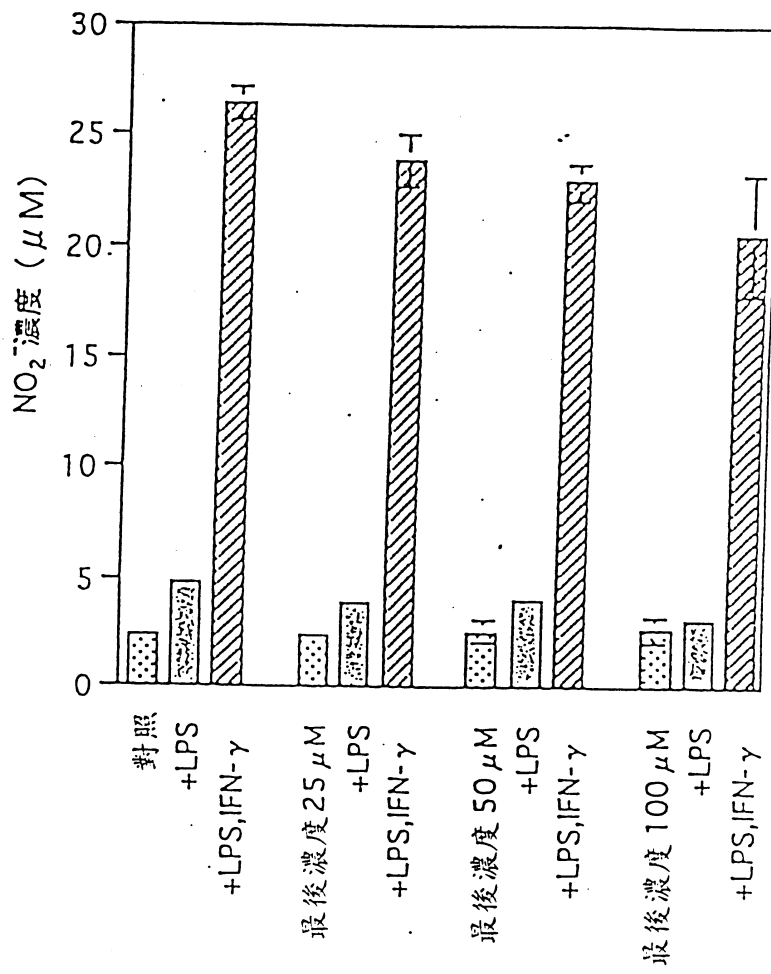


圖 20

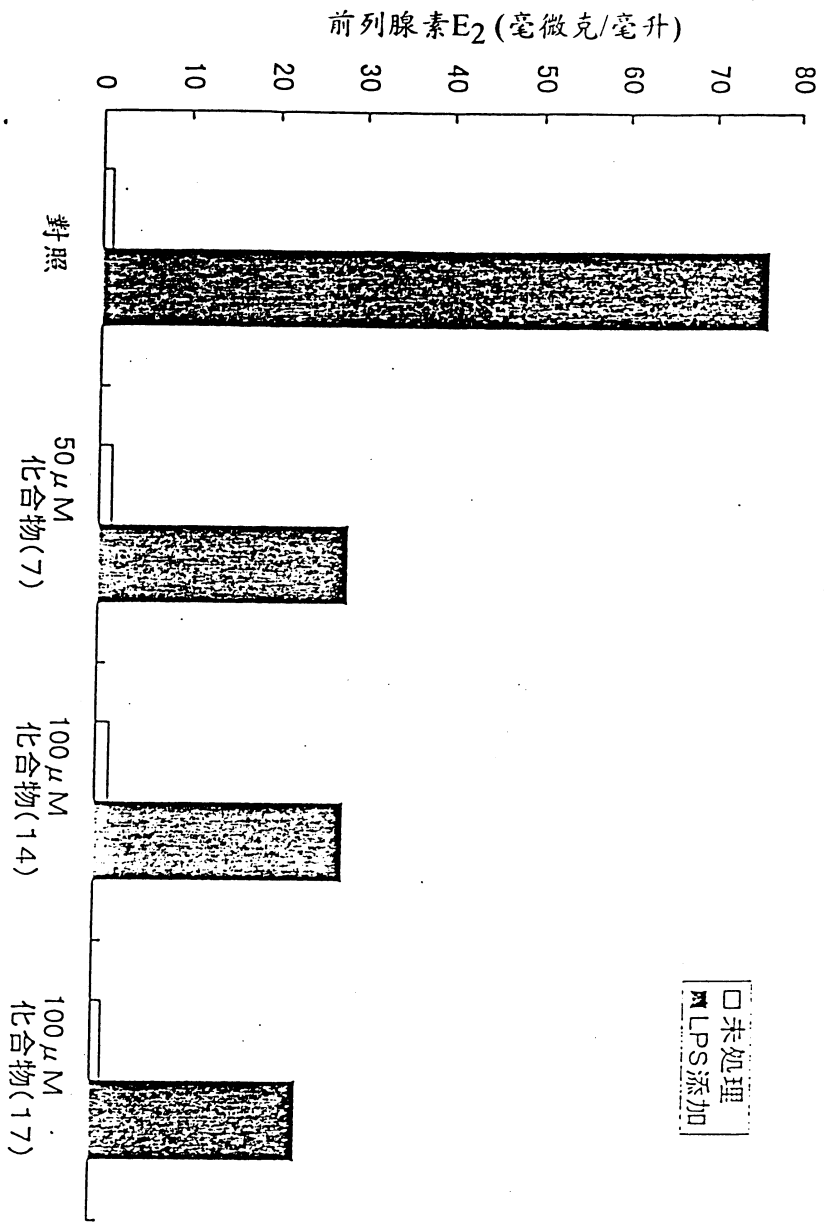


圖 21

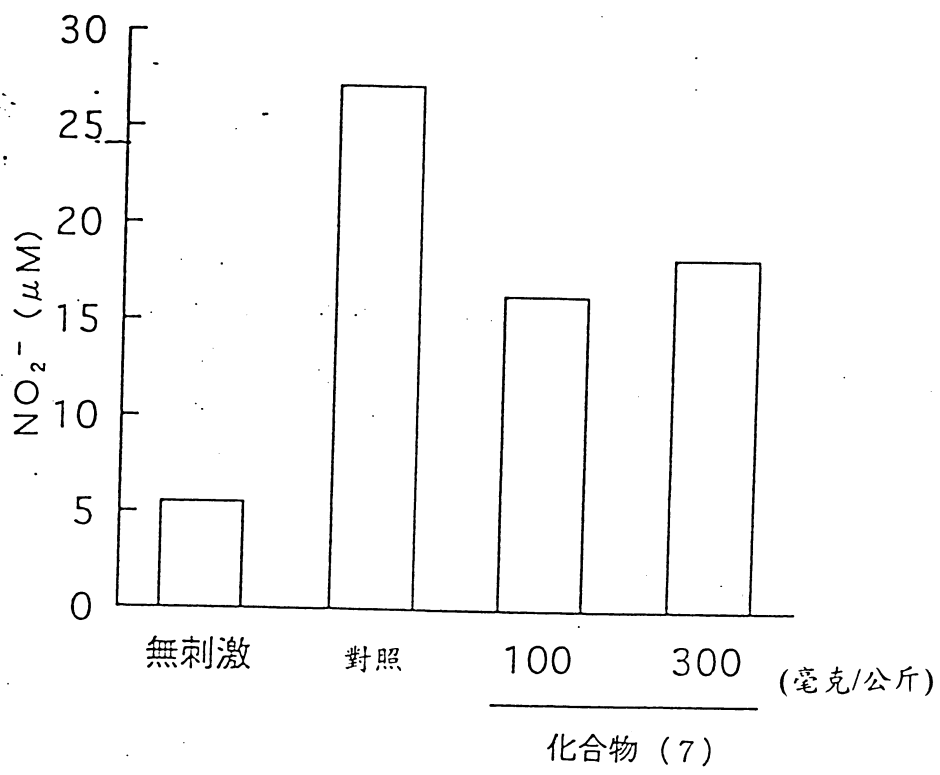


圖 22

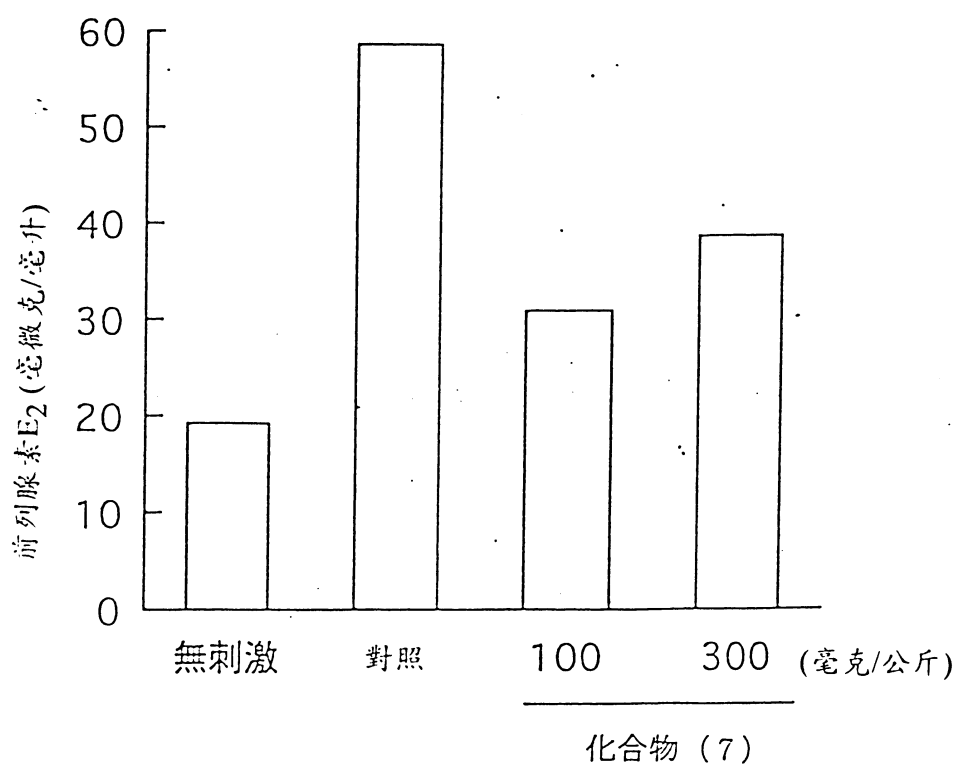


圖 23

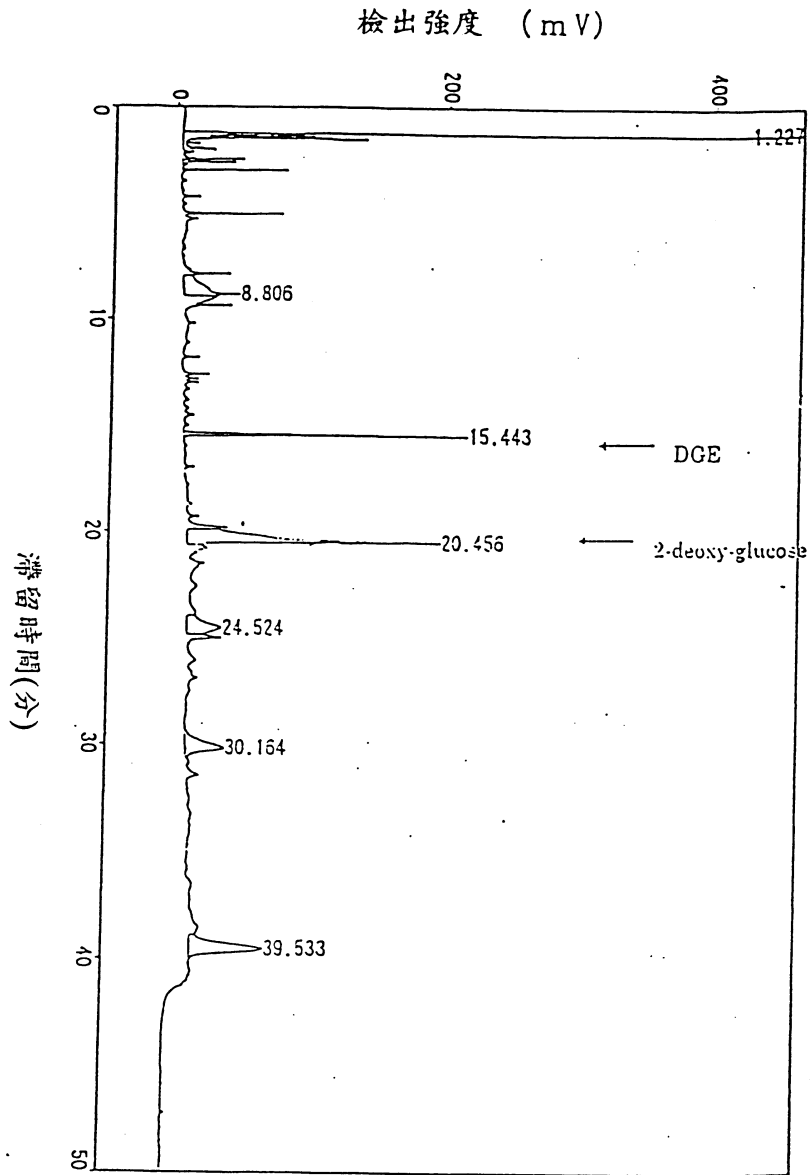


圖 24

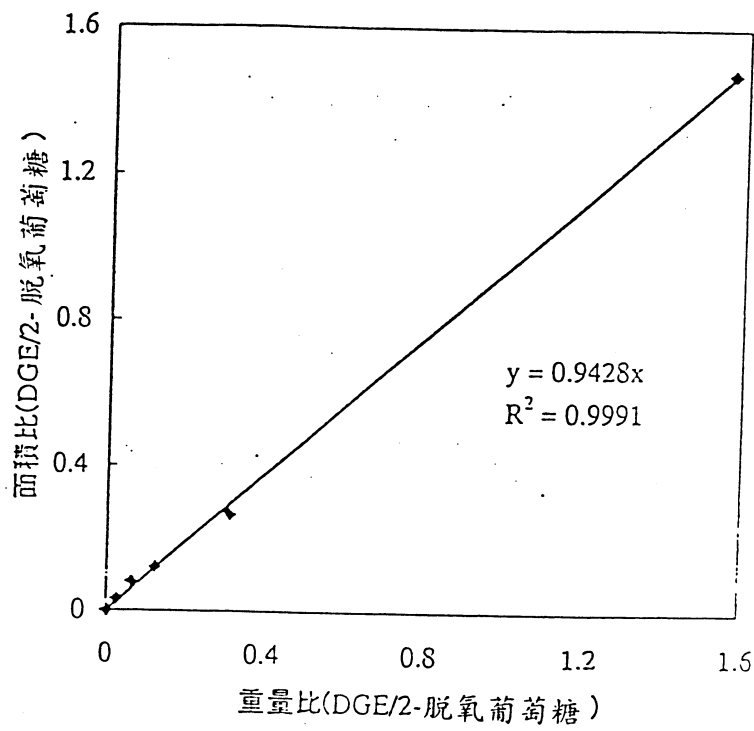


圖 25

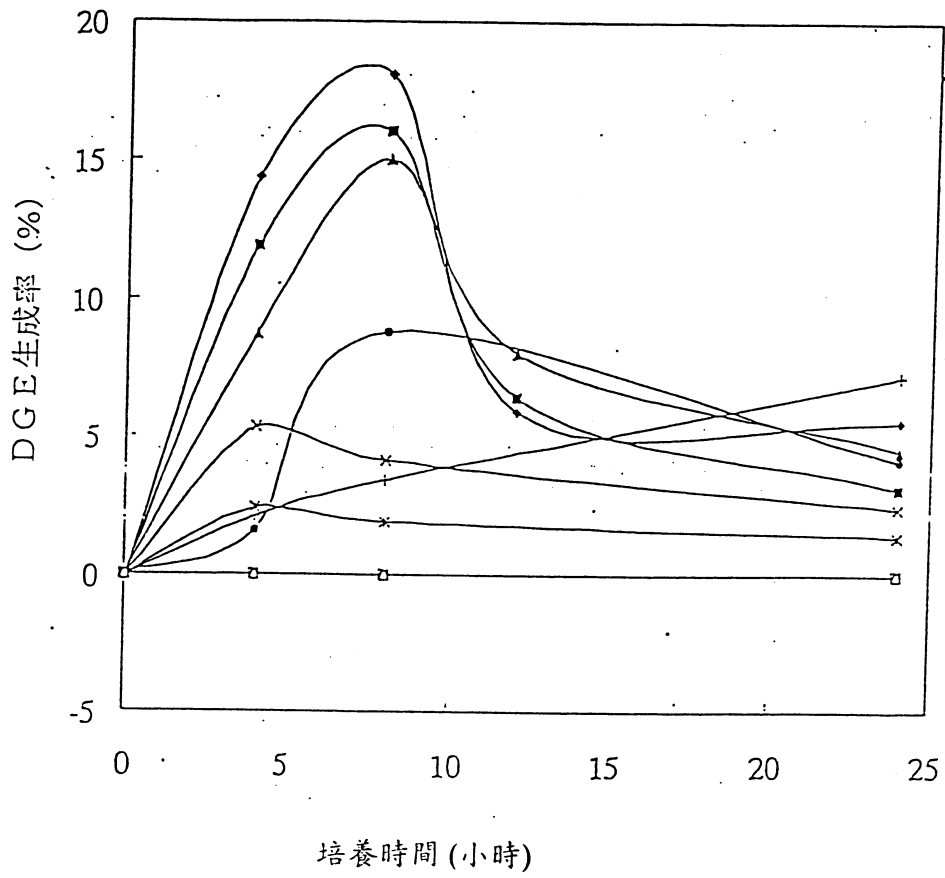


圖 26

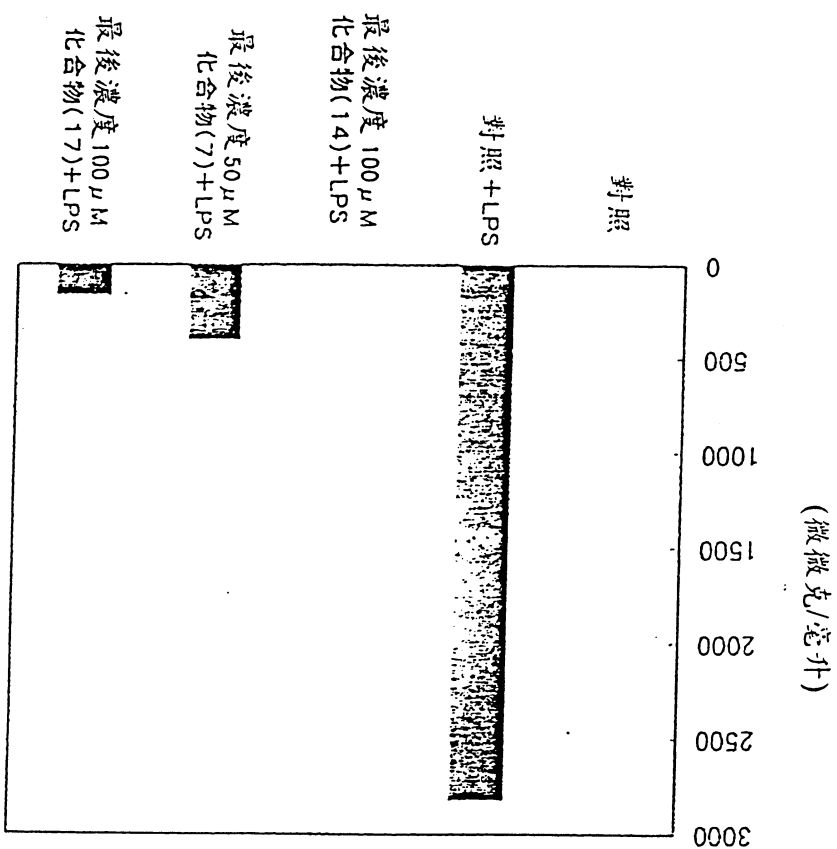
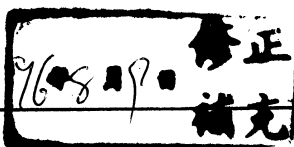
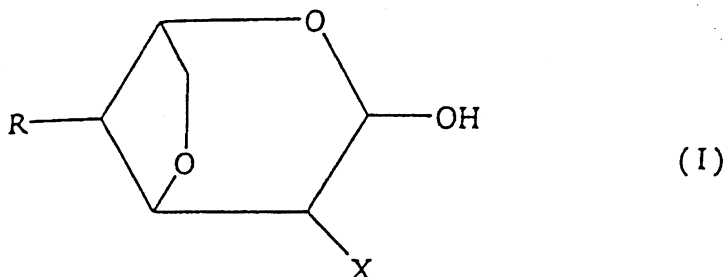


圖 27

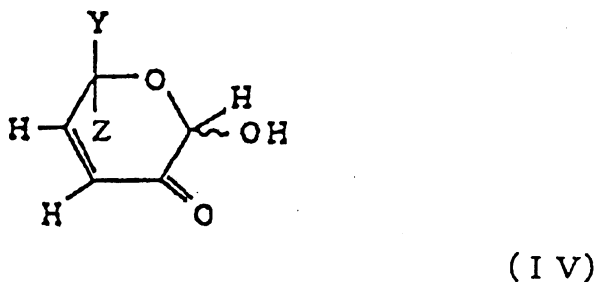


六、申請專利範圍

1. 一種通式(I)之化合物：



其中，X為OH或OSO₃H，R為選自飽和烴、芳烴及糖之取代基，其中R與3,6-脫水半乳糖或其硫酸化物之4-位置之鍵結方式亦可為酯鍵或醚鍵，其係於生成通式IV：



(式IV中Y、Z為H或CH₂OH，惟當Z為CH₂OH時，Y為H，而當Z為H時，Y為CH₂OH)
之化合物的反應中，作為離去基作用，其係可將不飽和鍵導入3,6-脫水半乳糖或其硫酸化物之3-位置及4-位置間之取代基。

2. 如請求項1之化合物，其係使用於含有、稀釋及/或添加通式(I)之化合物所成之食品。

六、申請專利範圍

3. 如請求項1之化合物，其係使用於含有、稀釋及/或添加通式(I)之化合物所成之飲料。
4. 一種用於治療需要誘發細胞凋亡之疾病之醫藥組合物，其係含有通式(I)之化合物作為有效成份。
5. 一種用於治療需要抑制癌細胞增殖之疾病之醫藥組合物，其係含有通式(I)之化合物作為有效成份。
6. 一種用於治療需要抑制一氧化氮產生之疾病之醫藥組合物，其係含有通式(I)之化合物作為有效成份。
7. 一種用於治療需要抑制前列腺素E₂合成之疾病之醫藥組合物，其係含有通式(I)之化合物作為有效成份。
8. 一種用於治療需要抑制介白素產生之疾病之醫藥組合物，其係含有通式(I)之化合物作為有效成份。
9. 一種用於治療需要誘導血紅素加氧酶產生之疾病之醫藥組合物，其係含有通式(I)之化合物作為有效成份。
10. 一種將如請求項1之化合物用於製造下列治療劑之用途，其中該治療係選自由細胞凋亡誘發劑、制癌劑、抗氧化劑、一氧化氮產生抑制劑、抗糖尿病劑、免疫調節劑、前列腺素E₂合成制劑、細胞素產生調節劑、介白素產生抑制劑、抗炎症劑、血紅素加氧酶產生誘導劑及抗風濕劑所組成之群者。
11. 如請求項1之化合物，其係用於製備治療下列疾病用之醫藥組合物：選自由需誘發細胞凋亡之疾病、癌、需抗氧化之疾病、需抑制一氧化氮產生之疾病、糖尿病、需進行免疫調節之疾病、需抑制前列腺素E₂合成之疾病、

六、申請專利範圍

需調節細胞素產生之疾病、需抑制介白素產生之疾病、
炎症、需誘導血紅素加氧酶產生之疾病及風濕症所組成
之群者。

裝

訂

線