

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00806495.4

**A61K 31/122**

A61P 43/00

A61P 1/16

A61P 25/28

A61P 3/10

A61P 35/00

A23L 1/30

[45] 授权公告日 2005 年 8 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 1213744C

[22] 申请日 2000.2.14 [21] 申请号 00806495.4

[30] 优先权

[32] 1999. 2. 19 [33] JP [31] 42236/1999

[32] 1999. 4. 15 [33] JP [31] 108499/1999

[32] 1999. 9. 17 [33] JP [31] 264539/1999

[86] 国际申请 PCT/JP2000/000787 2000.2.14

[87] 国际公布 WO2000/048586 日 2000.8.24

[85] 进入国家阶段日期 2001.10.19

[71] 专利权人 宝生物工程株式会社

地址 日本大津市

[72] 发明人 大野木宏 明山香织 富永隆生

西山英治 务华康 巽容子

佐川裕章 加藤郁之进

审查员 俞可嘉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 王景朝 杨丽琴

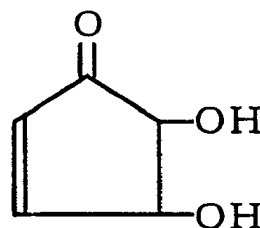
A23L 2/00

权利要求书 2 页 说明书 32 页 附图 5 页

[54] 发明名称 药物

[57] 摘要

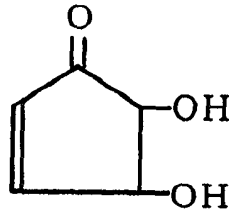
用于需要加强生长因子产生的疾病和/或需要加强白介素-12 产生的疾病的药物或预防剂, 其特征在于, 其中含有选自式(I)的 4, 5-二羟基-2-环戊烯-1-酮、4-羟基-2-环戊烯-1-酮及其衍生物的化合物作为活性成分。



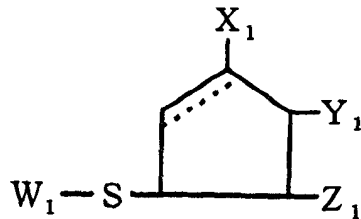
(I)

ISSN 1008-4274

1. 下述化合物在制备用于治疗或预防需要加强生长因子产生以进行治疗或预防的疾病和/或需要加强白介素-12 产生以进行治疗或预防的疾病的药物组合物中的用途, 其中, 所述化合物选自式 (I) 的 4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮、4-羟基-2-环戊烯-1-酮、式 (II) 的化合物和二丙酰基环戊烯酮;



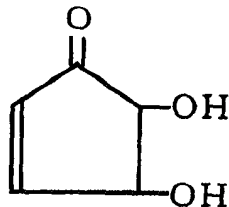
(I),



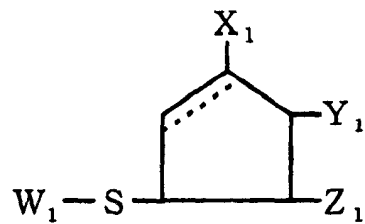
(II)

其中具有虚线表示的键的五元环是具有一个双键的环戊烯环;  $X_1$  是 OH,  $Y_1$  是=O 并且  $Z_1$  是 H;  $W_1$  是 SH 基团从含有 SH 基团的化合物中除去了的残基。

2. 下述化合物在制备用于加强生长因子产生和/或白介素-12 产生的组合物中的用途, 其中, 所述化合物选自式 (I) 的 4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮、4-羟基-2-环戊烯-1-酮、式 (II) 的化合物和二丙酰基环戊烯酮;



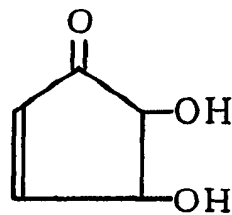
(I),



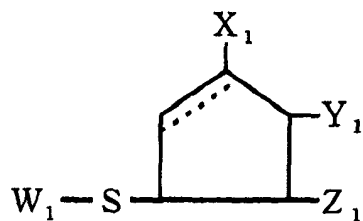
(I I)

其中具有虚线表示的键的五元环是具有一个双键的环戊烯环； $X_1$  是 OH， $Y_1$  是=O 并且  $Z_1$  是 H； $W_1$  是 SH 基团从含有 SH 基团的化合物中除去了的残基。

3. 下述化合物在制备用于加强生长因子产生和/或白介素-12 产生的食物或饮料中的用途，其中，所述化合物选自式 (I) 的 4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮、4-羟基-2-环戊烯-1-酮、式 (II) 的化合物和二乙酰基环戊烯酮；



(I) ,



(II)

其中具有虚线表示的键的五元环是具有一个双键的环戊烯环； $X_1$  是 OH， $Y_1$  是=O 并且  $Z_1$  是 H； $W_1$  是 SH 基团从含有 SH 基团的化合物中除去了的残基。

## 药物

### 技术领域

- 5 本发明涉及药物组合物、制剂、或食物或饮料，它们对于所治疗或预防的需要增强细胞生长因子产生的疾病有效。

### 背景技术

生长因子是一类以微少的量促进细胞生长/增殖的物质。它们控制细胞的增殖、伸长、增大、分化等。生长因子已知的生理学功能包括促进生长活性、胰岛素样活性、合成代谢、骨生成活性、促进细胞  
10 生长活性、神经营养因子样活性、红细胞生成素样活性、促进子宫内生长活性、增加肾血流/保护肾细胞活性、增强免疫活性。因此，预期它们可以改善对生长激素的反应迟钝、糖尿病和异化状况，并且可用于例如骨质疏松、需要组织修复以进行治疗或预防的疾病、神经变  
15 性疾病、贫血、子宫内生长不足、肾功能不全和免疫缺陷。

生长因子用于治疗疾病通常从外部给药。但是，很难获得大量的生长因子。此外，尽管可以通过基因工程方法获得肽能生长因子，但是这样的生长因子对于很多疾病也是低敏感性的。因此，需要施用大量的该生长因子。已知大量施用该生长因子会伴有各种副作用，包括  
20 发热和厌食。

在接受部分肝切除后，肝迅速再生至原来的大小。在肝再生中涉及的主要因子长期以来是未知的。肝细胞生长因子(HGF)是在患有暴发性肝炎的患者血浆中发现的，并从其中分离纯化出来[Gohda, E. 等, J. Clin. Invest., 88:414-419 (1988)]。此外，克隆了人 HGF  
25 的 cDNA，并且发现了 HGF 的主要结构[Miyakawa, K. 等, biochem. Biophys. Res. Commun., 163:967-973 (1989)]。再者，已经证明，使细胞能动性活化的分散因子(SF)以及肿瘤细胞毒性因子(TCF)是与 HGF 相同的物质[Weidner, K.M. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7001-7005 (1991); Shima, N. 等, Biochem. Biophys. Res.  
30 Commun., 180:1151-1158 (1991)]。

除了肝细胞之外，HGF 促进许多类型的上皮细胞生长，包括胆道上皮细胞、肾小管上皮细胞和室粘膜细胞(tunica mucosa ventriculi

cell)。此外，HGF 是多功能活性物质，它们具有广泛的生理学活性，包括使上述细胞能动性活化以及诱导形态形成例如血管形成和上皮细胞的腔形成。换句话说，HGF 促进所修复的损害器官的上皮细胞生长、活化能动性，以及诱导在各种器官中的形态形成例如血管形成等。

HGF 还具有使肝细胞增殖的活性、促进蛋白合成的活性、改善胆汁郁积的活性、预防药物对肾的损害等活性。根据这些因素，HGF 预期可用于严重肝炎、肝硬化和肝中胆汁郁积的治疗剂。然而，HGF 本身在实践中没有被用作治疗剂。曾尝试过一种引入 HGF 基因的基因治疗方法，但是在实际应用之前还有很长的路要走，这是因为其在不利的时间和部位发挥活性造成副作用。

在保持人的精神活动包括智力功能、记忆、情绪和行为方面，神经细胞起着主要作用。对各种类型神经细胞具有特异性的神经营养因子被认为是作为这些精神活动基础的神经细胞的分化、存活和功能表达所需的，尽管这些考虑仅仅是假定的。唯一弄清楚其存在和功能的因子是神经生长因子（下文缩写为 NGF）。由于 NGF 是前脑底部大量胆碱能神经细胞的神经营养因子，因此对其与阿尔茨海默氏痴呆的关系给予了关注 [Pharmacia, 22(2):147-151 (1986); Ronen Seishin Igaku, 3(6): 751-758 (1986)]。

阿尔茨海默氏痴呆是一种老年性痴呆疾病，并且是一种在临床上表现为发育性残疾、灶性症状、下肢强直性痉挛和癫痫发作等，并且其病理学观察包括老年斑和阿尔茨海默氏神经原纤维缠结。在当今的老龄社会中，阿尔茨海默氏痴呆有着增加的趋势，并且已经变为严重的公众所关系的问题。然而，尚未发现改善疾病状况或治疗该疾病的特殊的方法。

在阿尔茨海默氏痴呆患者的脑中观察到在位于 Meynert 基底核中心的前脑底部胆碱乙酰转移酶 (CAT) 活性显著退化和明显下降 [Annu. Rev. Neurosci., 3:77 (1980)]。在 1985 年，对大鼠脑进行的研究表明 NGF 在脑中的该部位作为神经营养因子起作用 [EMBO J., 4:1389 (1985)]。因此，对于 NGF 与该疾病之间的关系给予了关注。此外，在亨廷顿氏舞蹈病患者的纹状体中，除了  $\gamma$ -氨基丁酸能神经细胞之外，观察到胆碱能神经细胞的明显消除。因此发现 NGF 还作用于纹状

体中的内源性胆碱能神经细胞[Science, 234:1341(1986)]. 由此指出 NGF 可能与这些疾病有关。此外, 使用可作为各种神经疾病模型 5 的动物(例如大鼠)对 NGF 的作用进行了研究。已有报道, 如果在大鼠的神经细胞明显退化之前经大脑内施用 NGF, 则 CAT 活性的退化和下降可以得到预防[J. Neurosci., 6:2155 (1986); Brain Res., 293:305 (1985); Science, 235:214 (1986); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:9231 (1986)]. 还证明 NGF 是在受交感神经支配的外周组织和脑中生物合成的, 并且成纤维细胞或星形神经胶质细胞(它们是在 10 外周或脑组织中的间质细胞)在 NGF 的生物合成中起着重要作用[J. Biol. Chem., 259:1259 (1984); biochem. Biophys. Res. Commun., 136:57 (1986)]. 还表明, 由成纤维细胞或星形神经胶质细胞产生的 NGF 与已经深入研究的下颌下腺 NGF 具有同样的抗原性、分子量、等电点和生物活性。此外发现, 当各种神经递质加入成纤维细胞(L-M 细胞)或星形神经胶质细胞的培养物中时, 儿茶酚胺(去甲肾上腺素、 15 肾上腺素和多巴胺)具有促进 NGF 合成的作用[J. Biol. Chem., 201; 6039 (1986); FEBS Lett., 208:258 (1986)].

根据上述发现, 预期 NGF 可用作预防神经疾病中退化的治疗药物, 所述神经疾病在 NGF 作为神经营养因子的部位退化。一旦由于脑 20 血管疾病、脑肿瘤、脑尖(apex of brain)、与头部伤害有关的退化疾病、麻醉中毒等造成脑神经细胞退化, 那么这些细胞将终生无法修复。结果是, 引起各种疾病例如智力功能低下和记忆障碍以及情绪障碍和行为异常。神经纤维具有可塑性。当它们受损时, 神经纤维从靠近受损部位的健康纤维发育, 形成新的突触以代替受损突触。预期 NGF 可用作在此期间促进神经功能修复和再生的治疗药物。

25 如果 NGF 用于治疗各种神经疾病, NGF 必须到达需要 NGF 的神经细胞的附近部位。而且, 对于中枢神经系统疾病, NGF 必须释放给受影响的脑细胞。然而, NGF 不可能通过血管系统进入脑中。这是因为脑的血管内皮细胞彼此粘着(称作血脑屏障), 以限制除水、气体和脂溶性物质之外的其他物质通过血液转运进入脑组织, 因此大分子如 30 蛋白质(包括 NGF)根本不能通过血脑屏障。因此, 如果采用现有的技术, 那么经外科手术方法将 NGF 直接对脑给药太危险了。

为了治疗或预防可施用生长因子的疾病, 可以采用在体内产生生

长因子的方法代替将其给药。由此，可以安全地治疗或预防疾病、而没有因生长因子给药造成的异常副作用。

例如，如果 NGF 可以在体内所需部位产生、而不是从外部给药，则可以有效地治疗或预防需要对其治疗或预防加强 HGF 表达的疾  
5 (包括肝炎、肝硬化和肝胆汁郁积)。

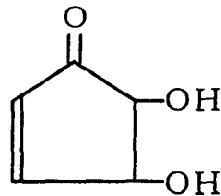
此外，产生 NGF 的物质向脑中 NGF 产生细胞的释放可以导致体外治疗药物体外应用所得到的成功的使用结果。

#### 发明目的

本发明的主要目的是提供高度安全的、由天然产物衍生的、能够  
10 加强生长因子产生和/或白介素-12 产生的化合物，提供用于治疗或预防需要加强生长因子产生以进行治疗或预防的疾病的药物组合物及食物和饮料。

#### 发明概述

本发明概括如下。本发明第一个方面涉及用于治疗或预防需要加  
15 强生长因子产生以进行治疗或预防的疾病和/或需要加强白介素-12 产生以进行治疗或预防的疾病的药物组合物，该药物组合物含有选自式(I)的 4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮：



(I) ,

20 4-羟基-2-环戊烯-1-酮及其衍生物的化合物作为活性成分。

本发明的第二方面涉及加强生长因子产生和/或白介素-12 产生的组合物，其中含有选自式(I)的 4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮、4-羟基-2-环戊烯-1-酮及其衍生物的化合物作为活性成分。

本发明第三方面涉及加强生长因子产生和/或白介素-12 产生的  
25 食物或饮料，其含有选自自由含式(I)的 4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮的物质、含 4-羟基-2-环戊烯-1-酮的物质、含 4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮衍生物的物质和含 4-羟基-2-环戊烯-1-酮衍生物的物质组成的

一组中的物质，通过稀释该物质产生的和/或通过向其中加入该物质产生的。

5 本发明人发现选自式(I)的4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮、4-羟基-2-环戊烯-1-酮及其衍生物的化合物具有加强生长因子产生的活性和/或加强白介素-12产生的活性，并因此这些化合物适用于加强生长因子产生和加强白介素-12产生。由此完成了本发明。

#### 附图的简要说明

图1说明了加热温度与4HCP产量之间的关系。

图2说明了加热时间与4HCP产量之间的关系。

10 图3说明了pH与4HCP产量之间的关系。

图4说明了加热温度与4ACP产量之间的关系。

图5说明了加热温度与4GCP产量之间的关系。

图6说明了加热时间与4ACP产量之间的关系。

图7说明了加热时间与4GCP产量之间的关系。

15 图8说明了pH与4ACP产量之间的关系。

图9说明了pH与4GCP产量之间的关系。

图10说明了加热时间与4,5-二羟基-2-戊烯醛产量之间的关系。

#### 发明详述

20 下面将对本发明作更具体的说明。

对于本发明所用的4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮(下文称作环戊烯酮)的制备方法没有特别限制。环戊烯酮可以通过化学合成方法产生[Carbohydrate Res., 247:217-222 (1993); Helvetica Chimica Acta, 55:2838-2844 (1972)]。再者，可以使用选自下列物质中的至少一种物质的热处理产物中产生的环戊烯酮及其纯化产物，所述物质是：糖醛酸、糖醛酸衍生物、含有糖醛酸和/或糖醛酸衍生物的糖、和含有含糖醛酸和/或糖醛酸衍生物的糖的物质。含有环戊烯酮的热处理产物及其部分纯化的或其纯化的产物可用于本发明。上述方法公开于W098/13328中，其中公开的内容结合在本发明中作为参考。

30 对于含有环戊烯酮的物质没有特别限制。尤其是，在本发明第三方面中，可以优选使用上述含有环戊烯酮的热处理产物及其部分纯化产物。

根据本发明,对于4,5-二羟基-2-环戊烯-1-酮(下文称作环戊烯酮衍生物)没有具体限定,只要它是环戊烯酮的衍生物并具有加强生长因子产生和/或白介素-12产生的能力。其实例包括式(II)-(V)的环戊烯酮衍生物。

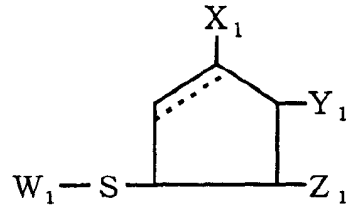
5 对于本发明所用4-羟基-2-环戊烯-1-酮(下文称作4HCP)的制备方法没有限制。4HCP可以通过化学合成方法产生。其已知的合成方法包括如下: Tanaka, T.等[Tetrahedron, 32:1713 (1976)], Nara, M.等[Tetrahedron, 36:3161 (1980)]和Gill, M.等[Aust. J. Chem., 34:2587 (1981)]。这些制备方法包括很多合成步骤,复杂,产率低,并且无效率。通过用氯化铯(III)和硼氢化钠使4-环戊烯-1,3-二酮  
10 的一步法还原,可以高产率地获得4HCP。

可以使用选自下列物质中的至少一种物质的热处理产物中产生的环戊烯酮及其纯化产物,所述物质是:戊糖、戊糖衍生物、含有戊糖的化合物和含有戊糖衍生物的化合物。这些含有4HCP的热处理产物及其部分纯化的或其纯化的产物可用于本发明。上述方法公开于  
15 W099/36383中,其中公开的内容结合在本发明中作为参考。

对于含有4HCP的物质没有特别限制。尤其是,在本发明第三方面中,可以优选使用上述含有4HCP的热处理产物及其部分纯化产物。

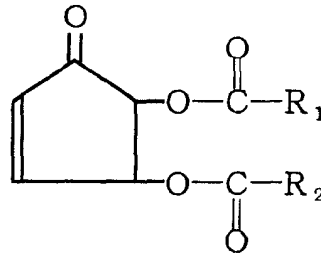
根据本发明,对于4HCP衍生物没有具体限定,只要它是4HCP的  
20 衍生物并具有加强生长因子产生和/或白介素-12产生的能力。其实例包括式(VI)和(VII)衍生物。再者,可以使用选自下列物质中的至少一种物质的热处理产物中产生的4-(9-腺嘌呤基)-2-环戊烯-1-酮(下文称作4ACP)和4-(9-鸟嘌呤基)-2-环戊烯-1-酮(下文称作4GCP)及其纯化产物,所述物质是:戊糖、戊糖衍生物、含有戊糖的化合物  
25 和含有戊糖衍生物的化合物。这些含有4ACP和/或4GCP的热处理产物及其部分纯化的或其纯化的产物可用于本发明。

这些含有环戊烯酮衍生物的物质和含有4HCP衍生物的物质也可用于本发明。还可以使用环戊烯酮、环戊烯酮衍生物、4HCP和4HCP衍生物及其盐的旋光异构体。



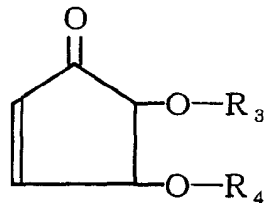
(I I)

- 其中在五元环上虚线表示的键是指该五元环可以是具有一个双键的环戊烯环或是饱和的环戊烷环；如果是环戊烯环，则  $X_1$  是 OH， $Y_1$  是 =O 并且  $Z_1$  是 H；另一方面，如果是环戊烷环，则  $X_1$  是 =O， $Y_1$  是 OH 并且  $Z_1$  是 OH； $W_1$  是一个残基，其中的 SH 基团从含有 SH 基团的化合物中除去了。



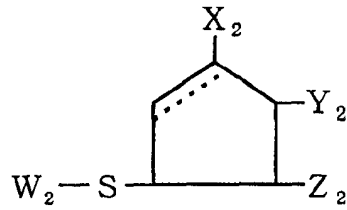
(I I I)

- 10 其中  $R_1$  和  $R_2$  可以彼此相同或不同，并且是氢或者脂族、芳族或芳脂族基团。



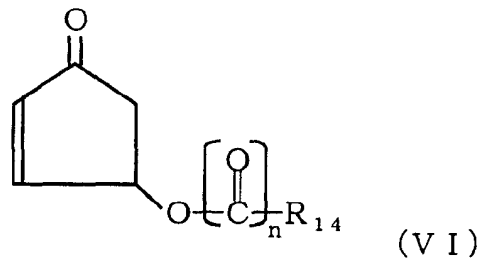
(I V)

- 15 其中  $R_3$  和  $R_4$  可以彼此相同或不同，并且是氢或者脂族、芳族或芳脂族基团，条件是  $R_3$  和  $R_4$  不同时为 H。



(V)

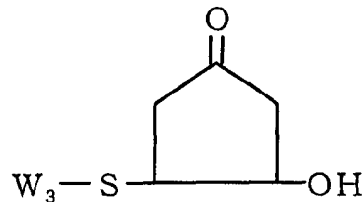
- 其中在五元环上虚线表示的键是指该五元环可以是具有一个双键的环戊烯环或是饱和的环戊烷环；如果是环戊烯环，则  $X_2$  是  $OR_5$ ， $Y_2$  是  $=O$  并且  $Z_2$  是  $H$ ；另一方面，如果是环戊烷环，则  $X_2$  是  $=O$ ， $Y_2$  是  $OR_6$  并且  $Z_2$  是  $OR_7$ ； $R_5$  是  $R_8$  或  $-(CO)-R_9$ ； $R_6$  是  $H$ 、 $R_{10}$  或  $-(CO)-R_{11}$ ；并且  $R_8$  是  $H$ 、 $R_{12}$  或  $-(CO)-R_{13}$ （其中  $R_8$ 、 $R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$  和  $R_{13}$  可以彼此相同或不同，并且是脂族、芳族或芳脂族基团，并且  $R_9$ 、 $R_{11}$  和  $R_{13}$  可以是  $H$ ），条件是  $R_6$  和  $R_7$  不同时为  $H$ ； $W_2$  是一个残基，其中的  $SH$  基团从含有  $SH$  基团的化合物中除去了。



(VI)

- 其中  $R_{14}$  是脂族、芳族或芳脂族基团，并且  $n$  是 0 或 1，条件是如果  $n$  是 0，则  $R_{14}$  不是  $H$ 。

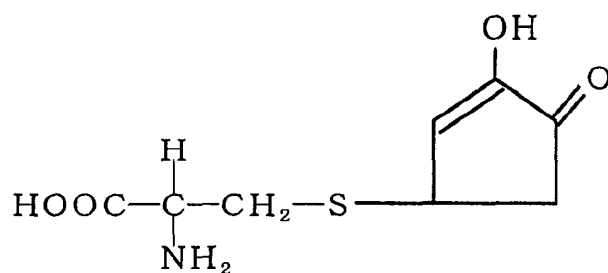
15



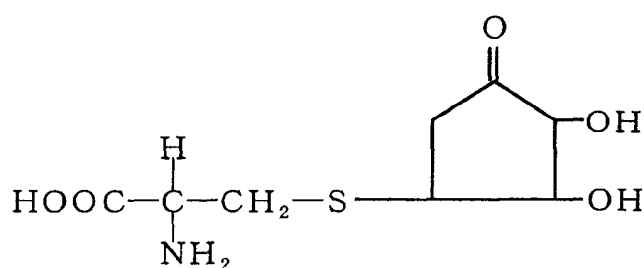
(VII)

- 其中  $W_3$  是一个残基，其中的  $SH$  基团从含有  $SH$  基团的化合物中除去



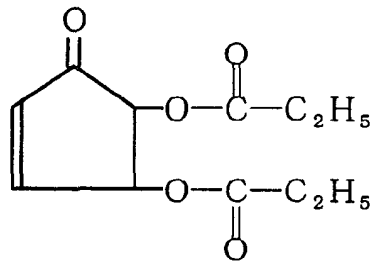


(X)

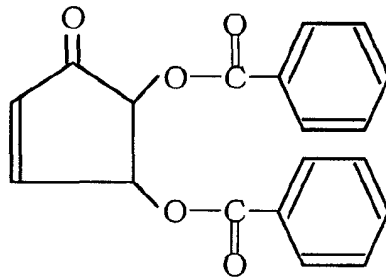


(XI)

式(III)的环戊烯酮衍生物详细描述于 WO 98/40346 和 PCT/JP99/04323 中。通过将环戊烯酮同时或依次与具有脂族、芳族或芳脂族基团的羧酸和/或其活性衍生物反应，可以制得该衍生物。这些环戊烯酮衍生物的实例包括二乙酰基环戊烯酮、二苯甲酰基环戊烯酮、二乙酰基环戊烯酮、二肉豆蔻酰基环戊烯酮、二辛酰基环戊烯酮、二-3-辛烯酰基环戊烯酮、二丁酰基环戊烯酮、二癸酰基环戊烯酮、二戊酰基环戊烯酮、二丙酰基环戊烯酮、二-2-己酰基环戊烯酮、二异丁酰基环戊烯酮、二甲氧基乙酰基环戊烯酮、甲氧基富马酰基环戊烯酮、甲氧基马来酰基环戊烯酮。式(XII)表示二丙酰基环戊烯酮结构。式(XIII)表示二苯甲酰基环戊烯酮结构。

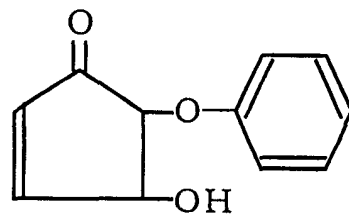


(XII)

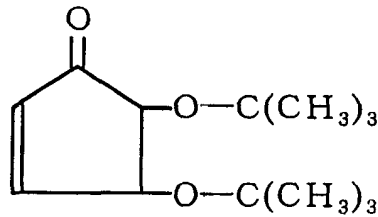


(XIII)

式(IV)环戊烯酮衍生物详细描述于W0 99/00349中。通过将环戊烯酮同时或依次与具有脂族、芳族或芳脂族基团的醇和/或其活性衍生物反应，可以制得该衍生物。这些环戊烯酮衍生物的实例包括 4-苄基环戊烯酮醚、5-苄基环戊烯酮醚、4,5-苄基环戊烯酮醚、4-叔丁基环戊烯酮醚、5-叔丁基环戊烯酮醚、4,5-二叔丁基环戊烯酮醚。式(XIV)和(XV)分别表示 5-苄基环戊烯酮醚和 4,5-二叔丁基环戊烯酮醚。

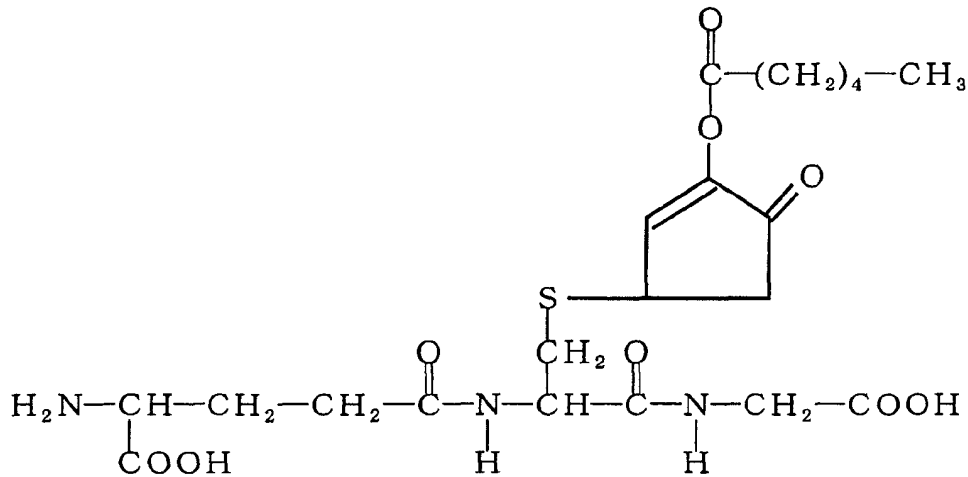


(XIV)

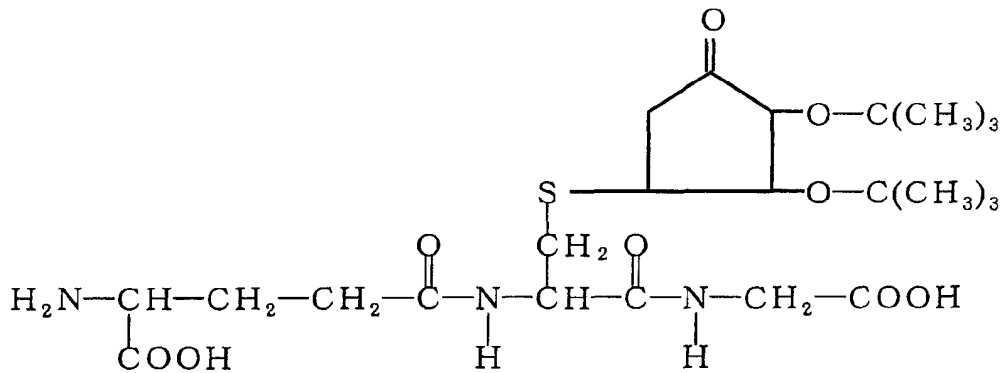


(XV)

式(V)环戊烯酮衍生物详细描述于PCT/JP99/04324中。通过将式(III)或(IV)化合物与含有SH基团的化合物如半胱氨酸或谷胱甘肽反应，可以制得含有环戊烯酮衍生物的物质。该环戊烯酮衍生物的实例包括式(XVI)和(XVII)化合物。



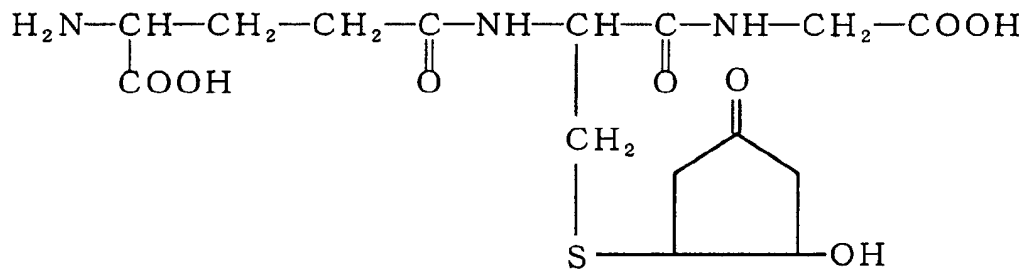
(XVI)



(XVII)

通过将 4HCP 与具有脂族、芳族或芳脂族基团的羧酸和/或其活性衍生物反应，或者通过将 4HCP 与具有脂族、芳族或芳脂族基团的醇和/或其活性衍生物反应，可以制得式(VI)的 4HCP 衍生物。

如 WO 99/36383 所述，通过将 4HCP 与含有 SH 基团的化合物如半胱氨酸或谷胱甘肽反应，可以制得式(VII)的 4HCP 衍生物。而且，通过向含有 4HCP 的物质中加入含有 SH 基团的化合物，可以得到含有 4HCP 衍生物的物质。该衍生物的实例包括式(XVIII)化合物。



(XVII I)

在本发明中，对于需要加强产生的生长因子没有特别限制，只要其具有促进细胞生长的活性。其实例包括 HGF、NGF、表皮生长因子、奶衍生的生长因子、成纤维细胞生长因子、脑产生的成纤维细胞生长因子、酸性成纤维细胞生长因子、血小板产生的生长因子、血小板碱性蛋白、结缔组织活化肽、胰岛素样生长因子、集落刺激因子、促红细胞生成素、血小板生成素、T 细胞生长因子、白介素（例如白介素-2、3、4、5、7、9、11 或 15）、B 细胞生长因子、软骨产生的因子、软骨产生的生长因子、骨产生的生长因子、骨骼生长因子、内皮细胞生长因子、内皮细胞产生的生长因子、眼产生的生长因子、睾丸产生的生长因子、塞尔托利氏细胞产生的生长因子、促乳素因子、脊髓产生的生长因子、巨噬细胞产生的生长因子、再制 (recycled) 中胚层生长因子、转化生长因子- $\alpha$ 、转化生长因子- $\beta$ 、结合肝素的 EGF 样生长因子、双向调节因子、SDGF、 $\beta$ -动物纤维素 (betacellulin)、epiregulin、神经调节蛋白 1、2 和 3、血管内皮生长因子、神经营养蛋白、BDNF、NT-3、NT-4、NT-5、NT-6、NT-7、神经胶质细胞系产生的神经营养因子、干细胞因子、midkine、pleiotrophin、ephrin、angiopoietin、活化素、肿瘤坏死因子和干扰素。

HGF 具有增殖肝细胞的活性、促进蛋白合成的活性、改善胆汁郁积的活性、防止药物损伤肾的活性等。HGF 的 mRNA 在脑、肾和肺等中合成。HGF 具有增殖肝细胞、肾小管细胞和表皮细胞等的活性。所以，HGF 是中胚层细胞生长因子。因此，通过加强肝细胞生长因子的产生，可以治疗或预防肝炎、严重性肝炎、肝硬化、肝中胆汁郁积、慢性肾

炎、肺炎和创伤。

NGF 是内源性生长因子，它保持神经细胞的存活和功能，或者根据 NGF 的浓度梯度延长神经细胞。所以，通过加强 NGF 产生，可以治疗或预防那些需要使神经功能修复/再生以进行治疗或预防的疾病，  
5 例如老年性痴呆如阿尔茨海默氏症、外周神经病、脑血管疾病、脑肿瘤、脑尖、与头部损伤有关的退化疾病和麻醉剂中毒等。

胰岛素样生长因子对各种细胞具有不同的生理学活性。它可以通过加强胰岛素样生长因子的产生来治疗或预防 II 型糖尿病（非胰岛素依赖型糖尿病）和生长减少（矮小）。再者，胰岛素样生长因子促进坐骨神经减少中的坐骨神经再生。因此，它可以用于治疗或预防肌  
10 萎缩侧索硬化等。

环戊烯酮、环戊烯酮衍生物、4HCP 和 4HCP 衍生物能够加强白介素-12 的产生。因此，提供了加强白介素-12 产生的组合物，其中含有选自环戊烯酮、环戊烯酮衍生物、4HCP 和 4HCP 衍生物的化合物作  
15 为活性成分。所述组合物可以以常规方法配制，并且用作治疗或预防需加强白介素-12 产生以进行治疗或预防的疾病的药物组合物。

当 T 细胞 (Th1) 受到抗原呈递细胞 (APCs) 等通过 T 细胞受体 (TCR) 刺激时产生干扰素  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )。干扰素  $\gamma$  的产生还由白介素-12 (IL-12) 诱导，后者是由 APCs 产生的。因此，IFN $\gamma$  的产生是由 IL-12 产生加  
20 强诱导的。所诱导的 IFN $\gamma$  活化细胞免疫性（包括细胞毒性 T 细胞、NK 细胞和巨噬细胞等）以抵抗病毒感染、真菌感染、癌性疾病等，从而加强生物防御的能力。另一方面认为，抑制会引起变应性疾病的 Th2 的活化作用可以有效地治疗或预防哮喘、枯草热和特应性皮炎等。

再者，环戊烯酮、环戊烯酮衍生物、4HCP 和 4HCP 衍生物具有增  
25 加/强化肌肉的活性。因此，提供了增加/强化肌肉的组合物，其中含有这些化合物或含这些化合物的物质中的一种作为活性成分。对于含这些化合物的物质没有特别限制。例如可以使用含有大量 4HCP 的 DNA 热处理产物。该热处理产物是通过加热 DNA 获得的，它是含有戊糖的化合物。

30 根据功能和用量，通过评价挤压坐骨神经使肌肉收缩的恢复程度，可以测定增加/强化肌肉的活性。已有报道，在该模型实验中，损害因神经的再生而大大恢复。据报道，在胎鸡感觉神经节或脊髓组

织培养的实验中，维生素 B1 和维生素 B12 显著地促进神经纤维的延长，并且在坐骨神经挤压模型中还具有明显的恢复肌肉（例如比目鱼肌）量的作用（Folia pharmacol. Japon. 74:721-734 (1978)）。

对于 DNA 的热处理产物尚未见在上述模型实验中有效的报道。其加强胰岛素样生长因子、HGF 或 NGF 产生的作用，或者增加肌肉或使肌肉功能恢复的作用未见报道。本发明人发现，DNA 的热处理产物加强胰岛素样生长因子、HGF 和 NGF 的产生。因此，它不仅仅可用于治疗或预防肌萎缩性侧索硬化，还可用于治疗或预防需要胰岛素样生长因子以进行治疗或预防的生长缺陷、骨质疏松、糖尿病和肾功能不全。

选自环戊烯酮、环戊烯酮衍生物、4HCP 和 4HCP 衍生物的化合物能够加强生长因子产生和/或白介素-12 产生。因此，可以使用这些化合物中的一种作为活性成分，制备用于治疗或预防需要加强生长因子产生以进行其治疗或预防的疾病和/或需要加强白介素-12 产生以进行其治疗或预防的疾病的药物组合物。还可以使用该化合物作为活性成分制备用于增加/强化肌肉的组合物。

可以使用选自环戊烯酮、环戊烯酮衍生物、4HCP 和 4HCP 衍生物的化合物作为其活性成分，并将其与已知药物载体一起配制用于治疗或预防的药物组合物。该组合物通常与可药用液体或固体载体，并且任选地与溶剂、分散剂、乳化剂、缓冲剂、稳定剂、赋形剂、粘合剂、崩解剂和润滑剂等混合进行配制。该制剂可以是固体制剂例如片剂、粒剂、粉末、撒布粉和胶囊的形式，或者是液体制剂例如普通(normal)溶液、悬浮液和乳液的形式。此外，可以将其配制成干制剂，该制剂可以在使用前，通过加入合适的载体配制成液体制剂。

用于治疗或预防的药物组合物可以以口服制剂或非肠道制剂如注射制剂和滴剂的形式给药。

可以根据上述具体的给药途径和剂型对药物载体进行选择。对于口服制剂，例如使用淀粉、乳糖、蔗糖、甘露糖醇、羧甲基纤维素、玉米淀粉和无机盐等。在口服制剂中还可以包括粘合剂、崩解剂、表面活性剂、润滑剂、助流剂、调味剂(tasting agent)、着色剂和矫味剂(flavoring agent)等。

按照常规方法，通过将作为治疗或预防用药物组合物活性成分的

选自环戊烯酮、环戊烯酮衍生物、4HCP 和 4HCP 衍生物的化合物溶解或悬浮在稀释剂中，可以制备非肠道制剂。稀释剂包括注射蒸馏水、生理盐水、葡萄糖水溶液、注射植物油、芝麻油、花生油、豆油、玉米油、丙二醇和聚乙二醇。任选地，可以向该溶液或悬浮液中加入杀

5 菌剂、稳定剂、渗透调节剂和光滑剂等。

本发明的治疗或预防用药物组合物经适于组合物剂型的合适途径给药。给药途径不限于具体的一种。该组合物可以经内部或外部（或局部）或经注射给药。注射制剂可以通过例如静脉内、肌内、皮下、真皮内等给药。外用制剂包括栓剂。

10 治疗或预防用药物组合物的剂量根据具体的剂型、给药途径和目的以及所治疗患者的年龄、体重和状况适当地确定和改变。通常，对于成人来说，包含在制剂中的活性成分的日剂量是  $10\mu\text{g} - 200\text{mg}/\text{kg}$ 。当然，剂量可以根据各种因素变化。因此，在某些情况下，低于上述的剂量可能是有效的，而在其他情况下，可能需要高于上述的剂量。

15 本发明药物组合物本身可以经口服给药，或者可以将其加入所选择的食物和饮料中每日摄取。

本发明的含有选自环戊烯酮、环戊烯酮衍生物、4HCP 和 4HCP 衍生物的化合物作为活性成分的加强生长因子产生或白介素-12 产生的组合物可以按照与上述治疗或预防用药物组合物所述方法类似的方法制备和给药。该加强生长因子产生或白介素-12 产生的组合物可用于加强生长因子产生的方法中，并适用于研究生长因子的功能，以及

20 用于筛选与生长因子有关的药物。

对于本发明加强生长因子产生的组合物没有特别限制。其实例包括加强 HGF 产生的组合物、加强 NGF 产生的组合物和加强 h-IGF 产生的组合物，该组合物可分别用作治疗或预防需要加强 HGF 产生的疾病的药物组合物、治疗或预防需要加强 NGF 产生的疾病的药物组合物、以及治疗或预防需要加强 h-IGF 产生的疾病的药物组合物以进行其治疗或预防。

25

选自环戊烯酮、环戊烯酮衍生物、4HCP 和 4HCP 衍生物的化合物用作本发明加强 HGF 产生组合物的活性成分。尽管不是用于限制本发明，但优选使用具有环戊烯环的化合物。而且，本发明加强 HGF 产生的组合物可以含有诱导 HGF 基因转录以加强 HGF 产生的物质，该物质

30

选自细胞因子和前列腺素包括 IL-1、前列腺素 E<sub>1</sub> 和前列腺素 E<sub>2</sub>。如果本发明加强 HGF 产生的组合物用于诱导 HGF 基因转录，则优选该组合物含有具有促进 HGF 基因的 mRNA 转译步骤或下游步骤以加强 HGF 产生的活性的物质。因此，提供了加强 HGF 产生的组合物，该组合物使 HGF 的产生协同地加强。对用于产生协同作用的物质没有特别限制，只要其具有促进 HGF 基因的 mRNA 转译步骤或下游步骤以加强 HGF 产生的活性。其实例包括硫酸化多糖例如肝素、硫酸乙酰肝素和墨角藻聚糖及其降解产物。具有加强 HGF 产生活性的源自姜的姜烯酚或姜醇或源自姜黄的姜黄素等，或者含有这些物质的原料，可以包括在本发明的加强 HGF 产生的组合物中。再者，本发明加强生长因子产生和/或加强白介素-12 产生的组合物可以加入所选择的食物和饮料中每日摄取。

本发明的含有选自环戊烯酮、环戊烯酮衍生物、4HCP 和 4HCP 衍生物的化合物作为活性成分的增加/强化肌肉的组合物可以按照与上述治疗或预防用药物组合物所述方法类似的方法制备和给药。

对于本发明加强生长因子产生和/或白介素-12 产生的食物或饮料的生产方法没有特别限制，其含有选自由含环戊烯酮的物质、含环戊烯酮衍生物的物质、含 4HCP 的物质和含 4HCP 衍生物的物质组成的一组中的物质作为活性成分，通过稀释该物质而产生和/或通过向其中加入该物质而产生。可以使用任何包括烹调、加工和其他生产食物和饮料常用的方法在内的方法，只要所得食物或饮料含有有效量的具有生理学活性的选自下列的物质：含环戊烯酮的物质、含环戊烯酮衍生物的物质、含 4HCP 的物质和含 4HCP 衍生物的物质。该食物或饮料可以作为具有加强生长因子产生和/或白介素-12 产生活性的功能食物或饮料食用。

而且，对于增加/强化肌肉的食物或饮料的生产方法没有特别限制，所述食物或饮料含有选自由含环戊烯酮的物质、含环戊烯酮衍生物的物质、含 4HCP 的物质和含 4HCP 衍生物的物质组成的一组中的物质作为活性成分，通过稀释该物质而产生和/或通过向其中加入该物质而产生。可以使用任何包括烹调、加工和其他生产食物和饮料常用的方法在内的方法，只要所得食物或饮料含有有效量的具有生理学活性的选自下列的物质：含环戊烯酮的物质、含环戊烯酮衍生物的物质

质、含 4HCP 的物质和含 4HCP 衍生物的物质。该食物或饮料可以作为具有增加/强化肌肉活性的功能食物或饮料食用。

当用于本发明的环戊烯酮、环戊烯酮衍生物、4HCP 或 4HCP 衍生物以生理有效量给药时，未观察到毒性。而且，对于含有这些物质的原料也没有观察到毒性。

例如，当以 100 mg/kg 的剂量给小鼠口服单次剂量的环戊烯酮、GM、4HCP、二丙酰基环戊烯酮、二己酰基环戊烯酮、二-2-己烯酰基环戊烯酮、二异丁基环戊烯酮、二苯甲酰基环戊烯酮、4-叔丁基环戊烯酮醚或 4,5-二叔丁基环戊烯酮醚或其旋光异构体或其盐时，没有观察到一例死亡。

#### 实施例

通过以下实施例将对本发明作更详细地说明。但是，本发明并不限于这些实施例。实施例中所用的“%”是指“重量%”。

#### 参考实施例 1

(1) 将 10 克 D-葡糖醛酸 (D-glucuroic acid) (Sigma, G 5269) 溶解在 1 升水中。该溶液在 121℃ 加热 4 小时，然后减压浓缩至约 10 毫升。向其中加入 40 毫升上层乙酸丁酯：乙酸：水 = 3：2：2 的混合物，并混合。将该混合物离心得到上清液。将所得上清液减压浓缩至约 10 毫升。

将提取液上硅胶色谱柱 BW-300SP (2 × 28 cm; Fuji Silysia)，并用上层乙酸丁酯：乙酸：水 = 3：2：2 混合物作为洗脱剂，以 5 毫升/分钟的流速洗脱，同时用压缩机施以 0.2 kg/cm<sup>2</sup> 的压力。进行分级，每一馏分中含 10 毫升洗脱液。用薄层色谱对每一馏分的一部分进行分析。第 61 至 80 号馏分含有高纯度的环戊烯酮。收集这些馏分，减压浓缩，然后用 40 毫升氯仿萃取。减压浓缩提取液，得到 100 毫克环戊烯酮。

使用 PALPAK S 型柱 (Takara Shuzo)，经正相 HPLC 分离该馏分。经 215 nm 紫外吸光度监测发现纯度为 98%。

(2) 将 30 毫克环戊烯酮、16 毫克二甲氨基吡啶 (DMAP)、66 毫克三乙胺和 86 毫克丙酸酐 (Tokyo Kasei kogyo, P0513) 溶解在 5.9 毫升二氯甲烷中。该混合物反应 1 小时，同时在冰中冷却。然后，将反应混合物在硅胶薄层色谱上展开，用氯仿：甲醇 = 200：1 作为展开剂。

刮下薄层  $R_f = 0.5 - 0.6$  部分的硅胶，并用氯仿萃取，得到 31 毫克二丙酰基环戊烯酮。

所得二丙酰基环戊烯酮的核磁共振结构分析的结果如下所示。

$^1\text{H-NMR}$

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

5

(3) 将  $100\mu\text{l}$  1M 环戊烯酮水溶液和  $500\mu\text{l}$  200 mM 谷胱甘肽水溶液（还原形式：由 Nacalai Tesque 出售：170-10）（pH 3.0）混合在一起。该混合物在  $60^\circ\text{C}$  反应 5 小时。反应混合物经  $0.5\mu\text{m}$  Cosmonice Filter (Nacalai Tesque) 过滤，并在下列条件下经 HPLC 分离。

10

柱：TSKgel ODS-80Ts ( $5\mu\text{m}$ ),  $20\text{mm} \times 25$  cm (Tosoh);

流动相：A: 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液;

B: 0.1% TFA/50% 乙腈水溶液;

流速：7.5 毫升/分钟;

15

梯度：流动相 A (10 分钟)  $\rightarrow$  流动相 A 至 A: B = 1: 1 (55 分钟)  
 $\rightarrow$  流动相 A: B = 1: 1 至流动相 B (15 分钟);

检测：在 220nm 的吸光度。

将  $200\mu\text{l}$  反应混合物进行 HPLC。收集保留时间为 35.7 分钟和 36.1 分钟的峰，减压浓缩至干，得到 5.5 毫克无水固体。

20

对无水固体的结构进行分析。测量核磁共振 (NMR) 图谱和质谱 (MS)。结果如下所示。



FAB-MS

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

用甘油作基质。

UV  $\lambda_{\max}$  251 nm (水)

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

1203

5 按照漫反射率方法进行测量。

上述结果表明无水固体是 GM, 即 2-羟基-4-谷胱甘肽-S-基-2-环戊烯-1-酮。

(4) 5% (w/v) DNA · Na 水溶液 (Nichiro) 的 pH 为 6.5。通过加入稀盐酸将溶液的 pH 调节至 5.5, 在 50、60、70、80、90、100、110  
10 或 120 °C 将该混合物按加热块加热 3 小时。

加热的混合物的上清液中 4HCP 的浓度经薄层色谱法测量。

简单地说, 将各 1  $\mu\text{l}$  加热混合物的上清液与 2、4、6、8、10 和 12 mM 4HCP 水溶液在硅胶板上点样以进行薄层色谱 (MERCK), 并用氯仿: 甲醇 = 4: 1 混合物展开。在用苔黑酚-硫酸试剂显示红色后, 用  
15 Photo/Analyst Archiver (Fotodyne inc.) 读取板的图象, 用 1-Dbasic (Advanced American Biotechnology software) 以数字表示每一印迹的强度, 以使用 4HCP 的校准曲线测定每一样品中的浓度。

结果示于图 1 中。图 1 说明了加热温度与 4HCP 产量之间的关系。在该图中, 纵轴表示 4HCP 的产量 (mM), 横轴表示加热温度 (°C)。  
20 如该图所示, 4HCP 的产量随加热温度的升高而增加。

(5) 通过加入稀盐酸将 5% (w/v) DNA · Na 水溶液 (Nichiro) 的 pH 调节至 5.5 后, 该混合物用高压釜在 120 °C 加热 0、1、3、5 或 9 小时。

按照参考实施例 1-(4) 所述方法测量加热混合物的上清液中 4HCP 的浓度。

25 结果示于图 2 中。图 2 说明了加热时间与 4HCP 产量之间的关系。在该图中, 纵轴表示 4HCP 的产量 (mM), 横轴表示加热时间 (小时)。如该图所示, 在加热 3 小时时, 4HCP 的产量达到峰值。

(6) 通过加入稀盐酸将 5% (w/v) DNA · Na 水溶液 (Nichiro) 的 pH

调节至 4.0、5.0、5.5 或 6.0, 或者通过加入稀 NaOH 将 5% (w/v) DNA · Na 水溶液(Nichiro)的 pH 调节至 7.0 后, 该混合物用高压釜在 120℃ 加热 3 小时。

按照参考实施例 1-(4) 所述方法测量加热混合物的上清液中 4HCP 5 的浓度。

结果示于图 3 中。图 3 说明了 pH 与 4HCP 产量之间的关系。在该图中, 纵轴表示 4HCP 的产量(mM), 横轴表示 pH。如该图所示, 在约 pH 5 时, 4HCP 的产量增加到峰值。

(7) 通过加入稀盐酸将 5% (w/v) DNA · Na 水溶液(Nichiro)的 pH 10 调节至 5.5 后, 在 50、60、70、80、90、100、110 或 120℃ 将该混合物按加热块加热 3 小时。

在下列条件下, 经反相 HPLC 分析加热混合物的上清液。

柱: YMCpack ODS-AM ( $\phi$  4.6 mm  $\times$  25 cm, YMC);

流动相: 3% 乙腈水溶液, 0.8 毫升/分钟;

15 检测: 210 nm。

测定在 25 分钟洗脱的 4GCP 的峰面积和在 33 分钟洗脱的 4ACP 的峰面积。然后, 使用每一化合物各自的校准曲线测定每一样品中各化合物的浓度。

结果示于图 4 和 5 中。图 4 说明了加热温度与 4ACP 产量之间的关系。在该图中, 纵轴表示 4ACP 的产量(mM), 横轴表示加热温度(℃)。图 5 说明了加热温度与 4GCP 产量之间的关系。在该图中, 纵轴表示 4GCP 的产量(mM), 横轴表示加热温度(℃)。

如图 4 和 5 所示, 当在 100℃ 或高于 100℃ 加热 3 小时时观察 4ACP 和 4GCP 的产生, 并且在较高的温度下加热得到较大的产量。

25 (8) 通过加入稀盐酸将 5% (w/v) DNA · Na 水溶液(Nichiro)的 pH 调节至 5.5 后, 该混合物用高压釜在 120℃ 加热 0、1、3、5 或 9 小时。

按照参考实施例 1-(7) 所述方法测量加热混合物的上清液中 4ACP 和 4GCP 的浓度。

结果示于图 6 和 7 中。图 6 说明了加热时间与 4ACP 产量之间的关系。在该图中, 纵轴表示 4ACP 的产量(mM), 横轴表示加热时间(小时)。图 7 说明了加热时间与 4GCP 产量之间的关系。在该图中, 纵轴表示 4GCP 的产量(mM), 横轴表示加热时间(小时)。

如图 6 和 7 所示, 在 3 小时时, 4ACP 和 4GCP 的量达到其峰值, 并且随后下降。

(9) 通过加入稀盐酸将 5% (w/v) DNA · Na 水溶液 (Nichiro) 的 pH 调节至 4.0、5.0、5.5 或 6.0, 或者通过加入稀 NaOH 将 5% (w/v) DNA · Na 水溶液 (Nichiro) 的 pH 调节至 7.0 后, 该混合物用高压釜在 120℃ 加热 3 小时。

按照参考实施例 1-(7) 所述方法测量加热混合物的上清液中 4ACP 和 4GCP 的浓度。

结果示于图 8 和 9 中。图 8 说明了 pH 与 4ACP 产量之间的关系。在该图中, 纵轴表示 4ACP 的产量 (mM), 横轴表示 pH。图 9 说明了 pH 与 4GCP 产量之间的关系。在该图中, 纵轴表示 4GCP 的产量 (mM), 横轴表示 pH。

如图 8 和 9 所示, 在约 pH 5 时, 4ACP 和 4GCP 的量均增加到峰值。

(10) 将 0.1M 2-去氧-D-核糖水溶液 (Sigma) 在 121℃ 加热 0.5、1、2、4 或 15 小时。

在下列条件下, 经反相 HPLC 分析加热溶液的上清液。

柱: YMCpack ODS-AM ( $\varnothing$  4.6 mm × 25 cm, YMC);

流动相: A: 0.1% TFA 水溶液;

B: 0.1% TFA/80% 乙腈水溶液;

流速: 0.8 毫升/分钟;

洗脱: 流动相 A (5 分钟) → 流动相 A 至流动相 B 线性梯度 (20 分钟) → 流动相 B;

检测: 215nm。

测定在 7 分钟洗脱的 4,5-二羟基-2-戊烯醛的峰面积以使用校准曲线测定每一样品中的浓度。

结果示于图 10 中。图 10 说明了加热时间与 4,5-二羟基-2-戊烯醛产量之间的关系。在该图中, 纵轴表示 4,5-二羟基-2-戊烯醛的产量 (mM), 横轴表示加热时间 (小时)。如图 10 所示, 在加热 5 小时后, 4,5-二羟基-2-戊烯醛的产量达到平顶。

实施例 1

将大鼠成纤维细胞 L-M 细胞 (ATCC CCL-1.2) 以  $1.0 \times 10^5$  个细胞/

毫升的浓度悬浮在含 0.5% Bacto Peptone (Gibco) 的 M199 培养基 (Gibco) 中。在 24 孔板的每一孔中接种 1 毫升该悬浮液。将细胞进行无菌培养。培养 2 天后，取出培养基，并用含 0.5% 牛血清白蛋白 (Sigma) 的 M199 培养基代替。然后，向其中加入环戊烯酮 (终浓度为 1-25  $\mu\text{M}$ )、4HCP (Aldrich) (终浓度为 12.5  $\mu\text{M}$ ) 或二丙酰基环戊烯酮 (终浓度为 3.1-9.4  $\mu\text{M}$ )。然后将该板孵育 24 小时。

孵育完成后，通过酶免疫分析法 (NGF Emax Immuno Assay System: Promega) 测量培养基中神经生长因子的浓度。结果是，环戊烯酮、4HCP 和二丙酰基环戊烯酮以浓度依赖的方式加强了 L-M 细胞产生神经生长因子。结果示于表 1-4 中。

表 1: 环戊烯酮加强神经生长因子的产生

环戊烯酮浓度 ( $\mu\text{M}$ )	神经生长因子浓度 (ng/ml)
0	0.570
1	0.700
2.5	0.740
5	0.870
7.5	0.900
10	1.080
12.5	1.340
15	1.550
17.5	2.150
20	1.900
25	1.540

表 2: 4HCP 加强神经生长因子的产生

4HCP 浓度 ( $\mu\text{M}$ )	神经生长因子浓度 (ng/ml)
0	0.138
12.5	0.327

表 3: 二丙酰基环戊烯酮加强神经生长因子的产生

二丙酰基环戊烯酮浓度 ( $\mu\text{M}$ )	神经生长因子浓度 (ng/ml)
0	0.132
3.1	0.164
6.3	0.259
9.4	0.257

表 4: 环戊烯酮加强神经生长因子的产生 (时间过程)

环戊烯酮 浓度 ( $\mu\text{M}$ )	培养时间 (小时)					
	0	3	6	12	24	48
	神经生长因子浓度 (ng/ml)					
0	0.000	0.028	0.233	0.575	0.658	0.736
15	0.000	0.050	0.359	0.686	1.186	1.236
17.5	0.000	0.054	0.205	0.635	1.535	1.492
20	0.000	0.082	0.179	0.581	1.681	1.874

5

此外, 其他环戊烯酮衍生物也加强 L-M 细胞产生神经生长因子。

#### 实施例 2

将 MRC-5 细胞 (CCL-171, Dainippon Pharmaceutical) 以  $1 \times 10^5$  个细胞/毫升的浓度悬浮在含 10% 胎牛血清的 DME 培养基 (Bio Whittaker) 中。在 48 孔培养板的每一孔中加入 500  $\mu\text{l}$  该悬浮液。在 37 $^{\circ}\text{C}$  和 5%  $\text{CO}_2$  存在下培养 24 小时后, 用含 1% 胎牛血清的 DME 培养基置换培养基。然后, 向其中加入一个样品。将该板再培养 24 小时。然后收集培养基, 并使用 Quantikine 人肝细胞生长因子 (HGF) ELISA 试剂盒 (Funakoshi) 测量培养基中 HGF 的量。以阴性对照为 100% 表达 HGF 的产量。在这种情况下, 阴性对照 HGF 的产量为 7.2 ng/ml。加入环戊烯酮 (终浓度为 20、40 或 160  $\mu\text{M}$ )、GM (终浓度为 20、40、80 或 160  $\mu\text{M}$ ) 或二丙酰基环戊烯酮 (终浓度为 32 或 64  $\mu\text{M}$ ) 作为样品。作为阴性对照, 加入同样体积的蒸馏水作为样品。作为阳性对照, 加入终浓度为 0.01、0.1、1 或 10  $\mu\text{M}$  的前列腺素  $\text{E}_1$ 。

20 结果是, 与向其中加入蒸馏水的阴性对照相比, 在每种情况下, 向其中加入环戊烯酮或其衍生物的细胞产生的 HGF 的量显著增加。此外, 与加入前列腺素  $\text{E}_1$  的阳性对照相比, HGF 的产量明显增加。由此表明环戊烯酮及其衍生物具有比前列腺素强的加强 HGF 产生的活性, 已证实后者能加强 HGF 产生。加入环戊烯酮、GM 和二丙酰基环戊烯酮得到的结果分别示于表 5、6 和 7 中。

25

表 5

环戊烯酮浓度( $\mu\text{M}$ )	HGF 产量的增加(%)
0	100
20	144
40	218
160	238

表 6

GM 浓度( $\mu\text{M}$ )	HGF 产量的增加(%)
0	100
20	154
40	179
80	243
160	319

5

表 7

二丙酰基环戊烯酮浓度( $\mu\text{M}$ )	HGF 产量的增加(%)
0	100
32	120
64	144

### 实施例 3

(1) 在  $37^{\circ}\text{C}$  和  $5\% \text{CO}_2$  存在下, 在培养容器中, 将人新生包皮表皮 Hs68 细胞(ATCC CRL-1635)在含  $10\%$  胎牛血清(FBS; Gibco BRL)的 D-MEM 培养基(Bio Whittaker)中培养至饱和。然后使用胰蛋白酶-EDTA 溶液(Bio Whittaker), 将细胞以  $3 \times 10^5/\text{ml}$  的浓度悬浮在培养基中。在 96 孔微滴板的每一孔中加入  $200\mu\text{l}$  该悬浮液。培养 5 天后, 当培养容器中的细胞几乎饱和时, 弃去培养基, 并向其中加入含浓度为  $40$ 、 $100$  或  $200 \mu\text{M}$  4HCP 的培养基。以 24 小时的间隔回收培养物上清液, 直至 96 小时。使用人胰岛素样生长因子-1 (h-IGF-1) 的 ELISA 试剂盒(Diagnostic System Labo)测定 4HCP 对加强 h-IGF-1 在 Hs68 细胞中产生的作用。结果示于表 8 中。

表 8

4HCP 浓度 ( $\mu\text{M}$ )	培养时间 (小时)			
	24	48	72	96
	加强 h-IGF-1 产生的活性 (ng/ml)			
0	0	0	0	0
40	0	0	0	0
100	39.9	10.0	9.6	4.4
200	37.9	10.4	9.9	4.2

5

如表 8 所示, 当以 100  $\mu\text{M}$  或更高的浓度加入 4HCP 时, 在 24 小时时, 加强 h-IGF 在 Hs68 细胞中产生的活性变得最大, 之后随时间减小。

10 (2) 在 37 $^{\circ}\text{C}$  和 5%  $\text{CO}_2$  存在下, 在培养容器中, 将 Hs68 细胞在含 10% 胎牛血清的 D-MEM 培养基中培养至饱和。然后使用胰蛋白酶-EDTA 溶液, 将细胞以  $3 \times 10^5/\text{ml}$  的浓度悬浮在培养基中。在 96 孔微滴板的每一孔中加入 200 $\mu\text{l}$  该悬浮液。培养 5-7 天后, 当培养容器中的细胞几乎饱和时, 弃去培养基, 并向其中加入含浓度为 0、2.5、5、10 或 20  $\mu\text{M}$  环戊烯酮或 GM 的培养基。

15 在 1、3、6、12、24 或 48 小时回收培养物上清液。使用 h-IGF-1 的 ELISA 试剂盒测定环戊烯酮或 GM 对 h-IGF-1 在 Hs68 细胞中产生的作用 (增强表达)。

20 结果是, 当以 10-20  $\mu\text{M}$  的浓度加入 GM 时, 在加入 3 小时后, 观察到 h-IGF 在 Hs68 细胞中产生。在加入后 6 小时 h-IGF-1 的产量约为不添加 GM 对照的两倍量。

再者, 当以 10-20  $\mu\text{M}$  的浓度加入环戊烯酮时, 在加入后 1-6 小时, 观察到 h-IGF-1 产生。

25 (3) 在 37 $^{\circ}\text{C}$  和 5%  $\text{CO}_2$  存在下, 在培养容器中, 将 Hs68 细胞在含 10% 胎牛血清的 D-MEM 培养基中培养至饱和。然后使用胰蛋白酶-EDTA 溶液, 将细胞以  $3 \times 10^5/\text{ml}$  的浓度悬浮在培养基中。在 96 孔微滴板的每一孔中加入 200 $\mu\text{l}$  该悬浮液。培养 5-7 天后, 当培养容器中的细胞几乎饱和时, 弃去培养基, 并向其中加入含浓度为 0、25、50、100 或 200  $\mu\text{M}$  4HCP、式 (XVIII) 化合物 (4HCP-GSH) 或谷胱甘肽 (GSH) 的培养基。在 1、3、6、12、24 或 48 小时回收培养物上清液。

使用 h-IGF-1 的 ELISA 试剂盒测定对 h-IGF-1 在 Hs68 细胞中产生的作用（增强表达）。

结果是，当以 25 - 200  $\mu\text{M}$  的浓度加入 4HCP 时，在 1 小时时，观察到 h-IGF 在 Hs68 细胞中的产生达到最大值，之后随时间下降。在 48 小时时，观察到用浓度为 100  $\mu\text{M}$  或更高浓度的 4HCP 处理的细胞有 h-IGF-1 表达。证实浓度为 100 - 200  $\mu\text{M}$  的式 (XVIII) 化合物具有浓度依赖方式的加强 h-IGF-1 的活性。结果示于图 9 和 10 中。当培养 10 - 30 分钟时，观察到 h-IGF-1 产生明显加强。另一方面，对于只加入谷胱甘肽的培养基，没有观察到 h-IGF-1 活性的明显加强。

10 表 9: 4HCP 加强 h-IGF-1 产生的活性 (ng/ml)

4HCP 的加入量 ( $\mu\text{M}$ )	培养时间 (小时)					
	1	3	6	12	24	48
	加强 IGF-1 产生的活性 (ng/ml)					
0	7.2	8.9	6.3	0	0	0
25	30.6	29.5	9.6	0	0	0
50	49.5	42.1	27.8	0	0	0
100	52.8	47.2	31	22.1	25.6	32
200	59.2	51.7	44.4	42.1	50.3	50.2

15 表 10: 4HCP-GSH 加强 h-IGF-1 产生的活性 (ng/ml)

4HCP-GSH 的加入量 ( $\mu\text{M}$ )	培养时间 (小时)					
	1	3	6	12	24	48
	加强 IGF-1 产生的活性 (ng/ml)					
0	7.2	8.9	6.3	0	0	0
100	8.4	12	10.6	6.1	6.7	1.4
200	33.3	37.9	24.7	20.4	20.9	27.8

#### 20 实施例 4

通过挤压 5 周龄雄性 Wistar 大鼠的坐骨神经，准备后肢肌肉萎缩的模型。按挤压后 2 周，测量后肢 *astrocnemius* 肌肉减少的重量，并以挤压肢体肌肉重量与正常肢体肌肉重量的比例表示。

25 通过加入稀盐酸将 10% (w/v) DNA · Na 水溶液 (Nichiro) 的 pH 调节至 5，用高压釜在 120 $^{\circ}\text{C}$  加热 3 小时，以制备 DNA 的热处理产物。

用水制备 DNA 热处理产物的 10 倍稀释液（约 11 mg/kg/天的

4HCP) 和 100 倍稀释液 (约 1 mg/kg/天的 4HCP), 并从挤压前 3 天开始作为饮用水给大鼠饮用 (N=9-10)。给对照组饮用自来水 (N=10)。

结果示于表 11 中。表 11 中的数目表示平均值±标准偏差。表中的\*是指与对照组相比具有明显差异, 显著性水平为 5%或更低。

- 5 在对照组中, 因挤压造成显著的肌肉萎缩, 并且在挤压后 2 周, 几乎没有观察到恢复。另一方面, 对于给予 DNA 热处理产物作为饮用水的组, 以剂量依赖的方式促进肌肉重量的恢复。对于给予 DNA 热处理产物 10 倍稀释液作为饮用水的对照组, 观察到肌肉萎缩状况的改善, 这是因为显著的增加/强化肌肉作用。

10 表 11

	肌肉重量 (%)
	平均值±标准偏差
对照 (N=10)	49.0±2.58
DNA 热处理产物的 100 倍稀释液 (N=9)	49.8±1.16
DNA 热处理产物的 10 倍稀释液 (N=10)	58.2±2.64*

\*: p<0.05 vs. 对照组

#### 实施例 5

##### (1) 注射制剂

将环戊烯酮或 GM 以 1% 的浓度加入盐水中以制备注射制剂。

##### 15 (2) 片剂

制备每片含 100 毫克二丙酰基环戊烯酮或 4HCP 和适量微晶纤维素的片剂, 并用糖包衣。

#### 参考实施例 6

- 20 使用初步饲养 1 周的购自 Japan SLC 的 ddY 小鼠 (雌性, 5 周龄, 体重约 25 克) 进行实验。给小鼠腹膜内接种  $1 \times 10^6$  个 Ehrlich 癌细胞。在接种后 1 天腹膜内给予 10mg/kg 环戊烯酮。在接种癌细胞后 8 或 12 天, 将小鼠断颈处死并放血。将 2 毫升含有 1% 牛血清白蛋白 (Sigma) 的 PBS (-) (Nissui Pharmaceutical) 腹膜内注入小鼠体内, 这与对照小鼠保留的腹水体积相同, 广泛按摩后回收。对于对照
- 25 组, 直接回收腹水。回收的腹水和腹腔灌洗液以 2000rpm 的转速离心 5 分钟, 以收集上清液。使用测量小鼠白介素-12 的 ELISA 试剂盒 (Endogen) 对上清液进行白介素-12 含量的定量测定。

在接种癌细胞后 8 和 12 天各小鼠腹膜内白介素-12 的量示于表 12 中。在接种癌细胞后 8 天对照组所有 3 只小鼠均低于检测限。另一方面，在给予环戊烯酮组的每只小鼠中观察到环戊烯酮加强白介素-12 产生的活性，表明 T 细胞和 NK/LAK 细胞在局部被活化。再者，在 5 接种癌细胞后 12 天，在给予环戊烯酮组小鼠的腹腔中仍然观察到白介素，表明具有因免疫刺激导致的抗肿瘤作用。环戊烯酮衍生物也显示出加强白介素-12 产生的活性。

表 12

		腹膜内白介素-12 的量 (pg/ml)					
		对照组			给予环戊烯酮的组		
8 天后	ND	ND	ND	11.0	100.0	25.0	
12 天后		均死亡			43.0	97.2	66.4

ND: 未被检测。

#### 10 工业实用性

本发明提供了药物组合物，其中含有具有加强生长因子产生和/或白介素-12 产生活性的化合物作为活性成分，所述药物组合物对于需要加强生长因子产生以进行其治疗或预防的疾病和/或需要加强白介素-12 产生以进行其治疗或预防的疾病有效。该药物组合物在体内 15 具有加强 HGF 产生、NGF 产生、h-IGF 产生或白介素-12 产生等的活性。因此，该药物组合物适于用作治疗或预防需要加强这种生长因子产生以进行其治疗或预防的疾病和/或需要加强白介素-12 产生以进行其治疗或预防的疾病的药物组合物，所述疾病包括肝炎、阿尔茨海默氏症、糖尿病和癌症。

20 再者，现在可以用能加强生长因子产生和/或白介素-12 产生的物质生产食物或饮料，所述物质选自含环戊烯酮的物质、含环戊烯酮衍生物的物质、含 4HCP 的物质和含 4HCP 衍生物的物质。因此，当食物或饮料以常规途径摄取时，需要加强生长因子产生以进行其治疗或预防的疾病和/或需要加强白介素-12 产生以进行其治疗或预防的疾病的 25 状况可以得到改善。

因此，含有选自含环戊烯酮的物质、含环戊烯酮衍生物的物质、含 4HCP 的物质和含 4HCP 衍生物的物质作为活性成分的功能食物或饮料，由于其加强生长因子产生和/或白介素-12 产生的活性，因此适用

于保持生命体的体内平衡。

本发明还提供了用于加强生长因子产生和/或白介素-12 产生的组合物。该组合物适用于研究生长因子的功能，以及筛选与生长因子有关的疾病的药物。

- 5 再者，本发明提供了增加/强化肌肉的组合物。该组合物适用于治疗因神经压迫（neurothlipsis）引起的疾病。

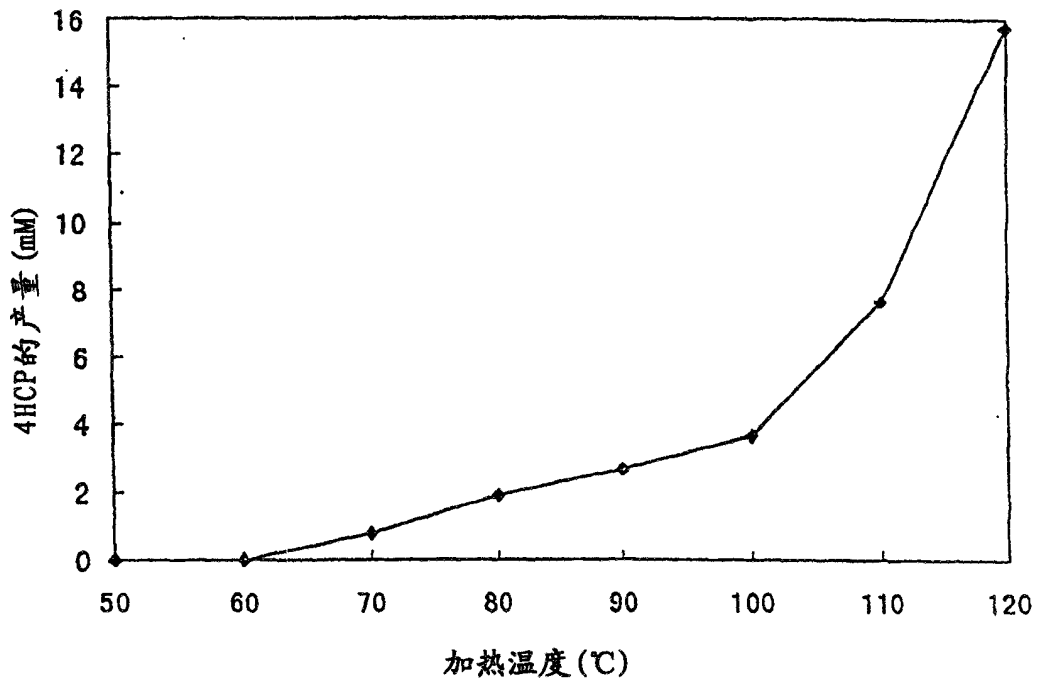


图 1

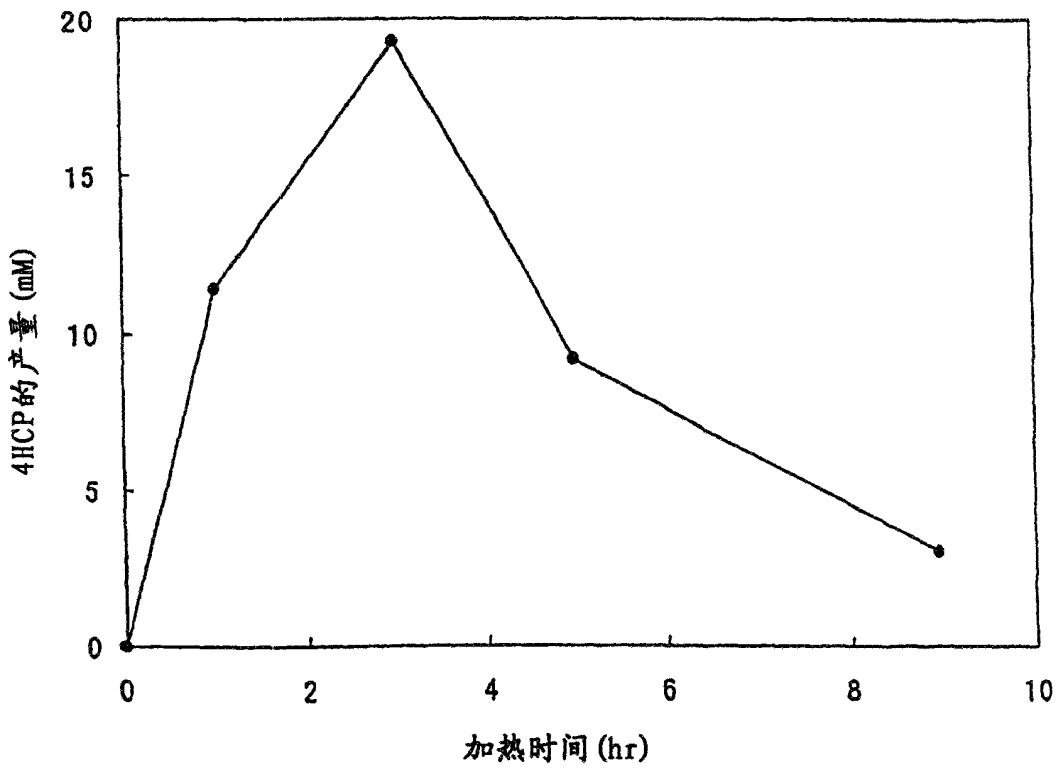


图 2

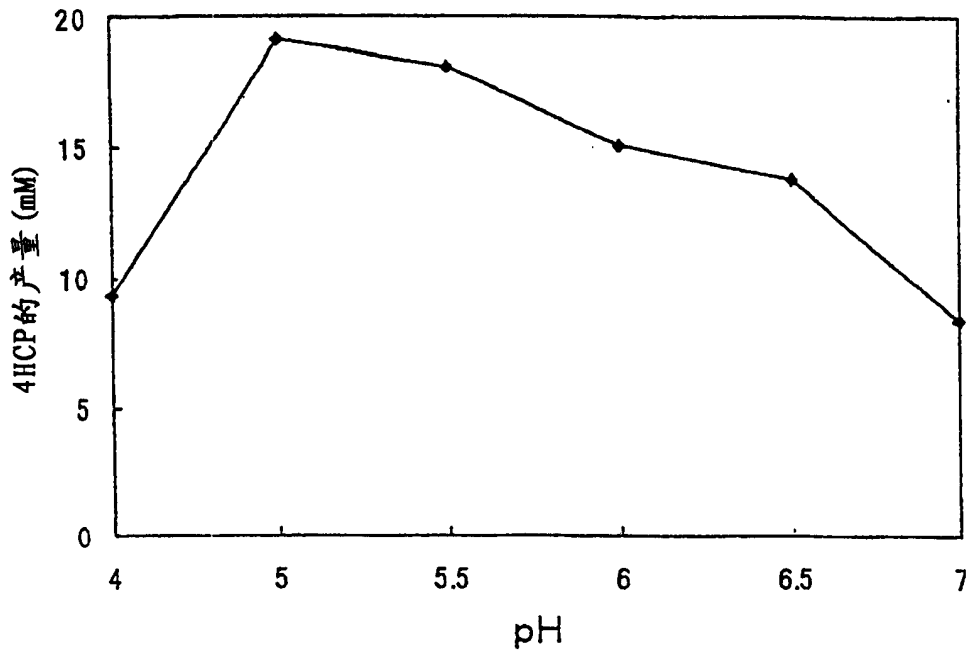


图 3

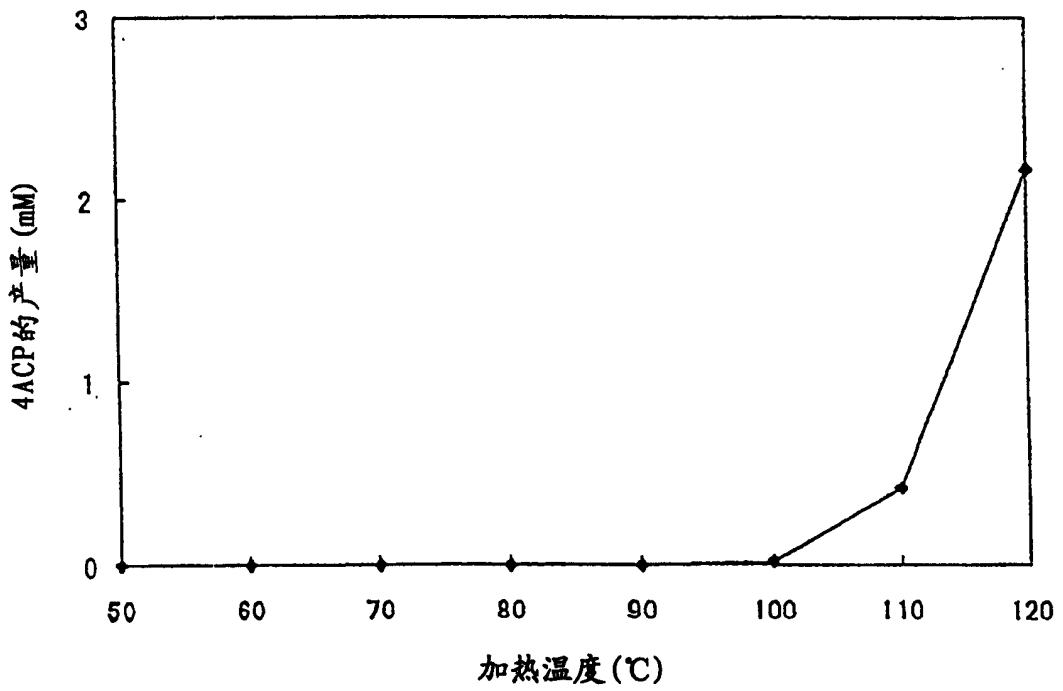


图 4

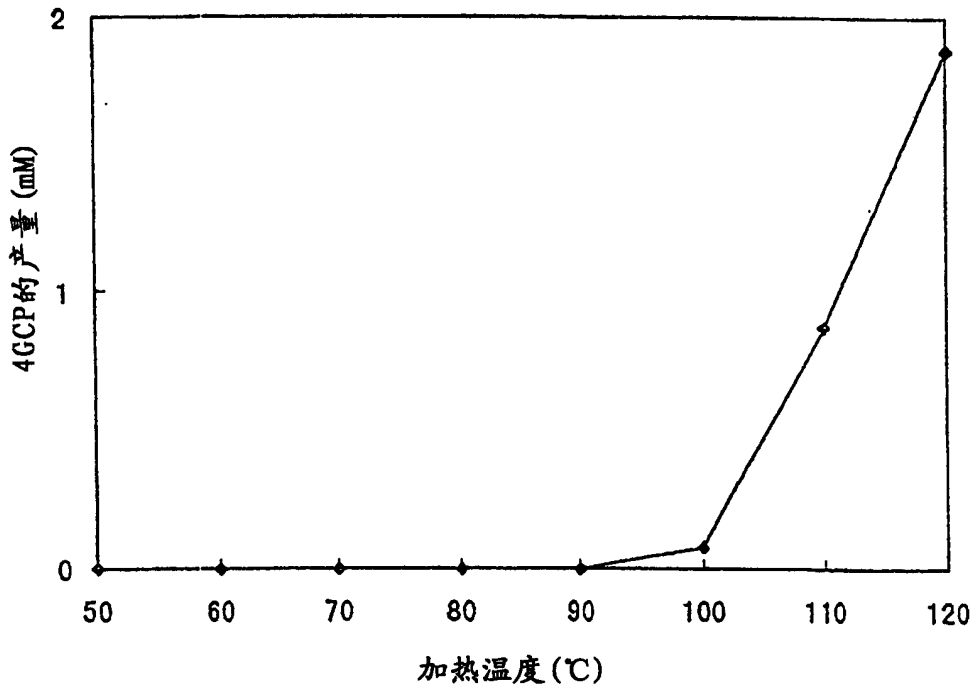


图 5

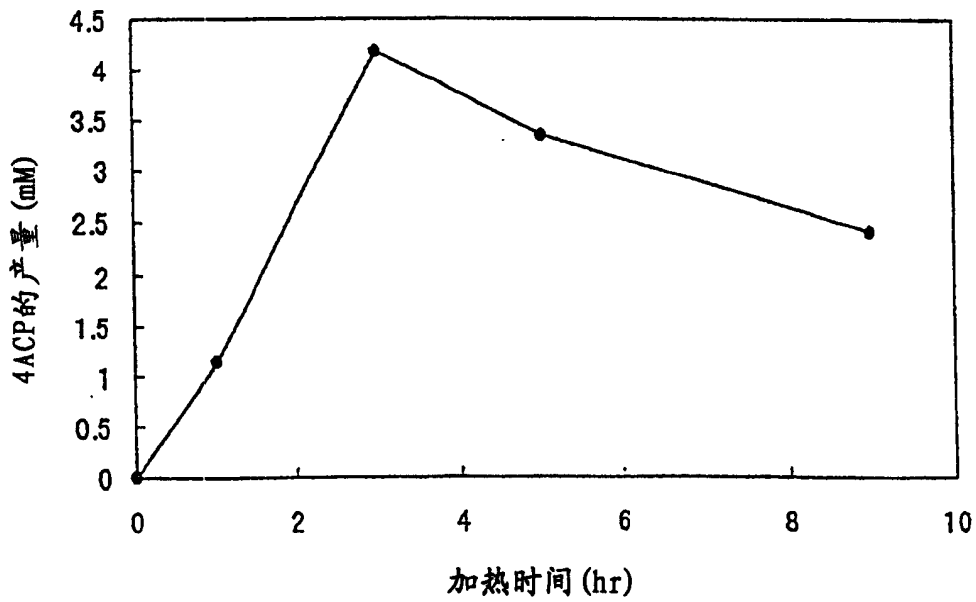


图 6

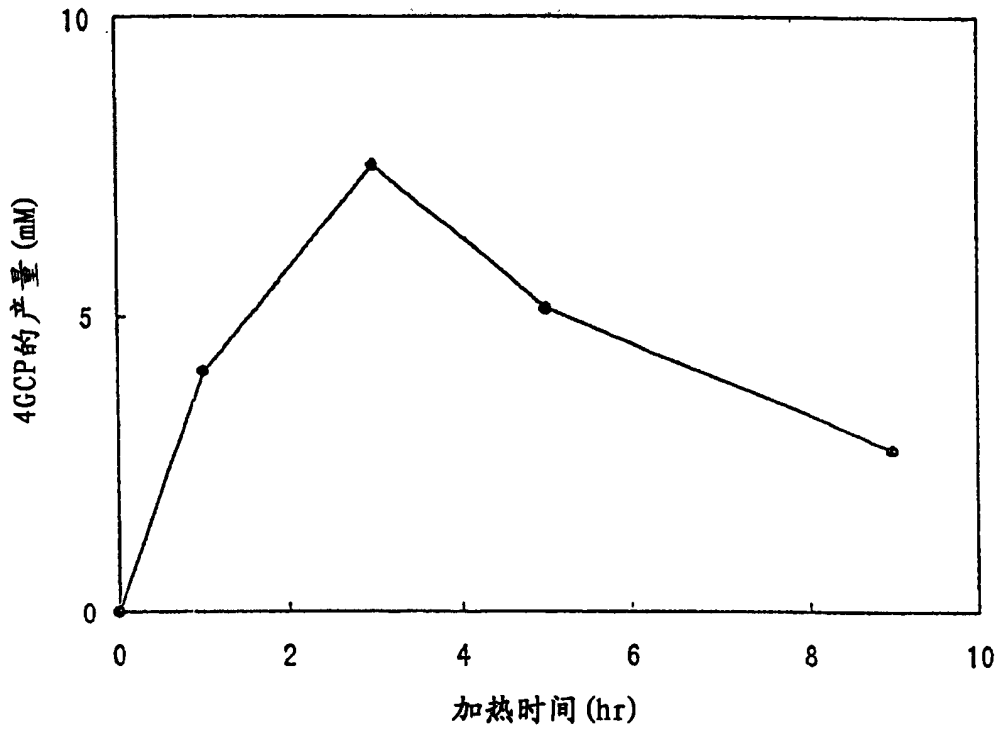


图 7

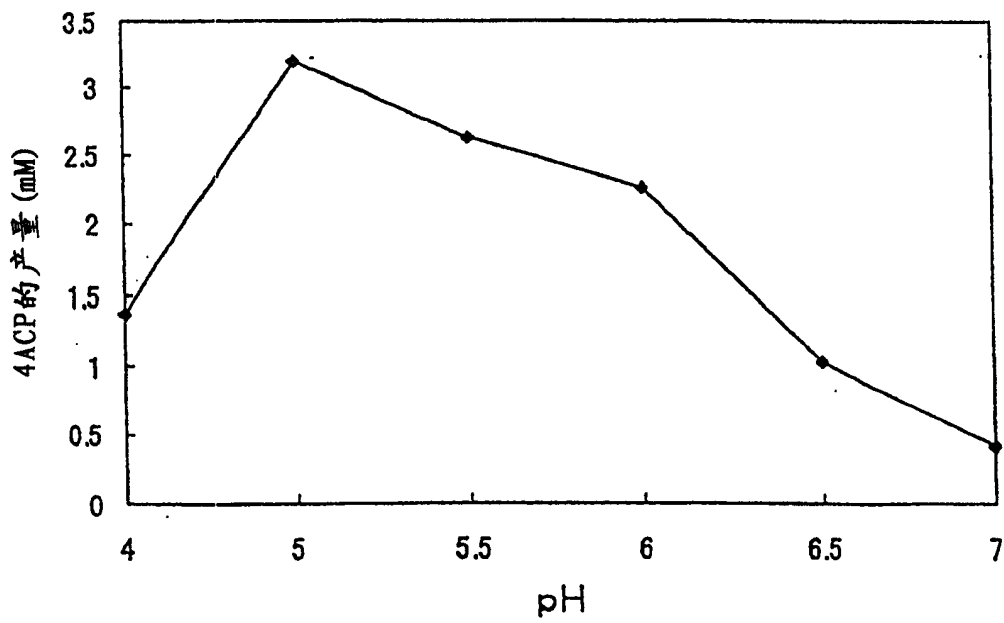


图 8

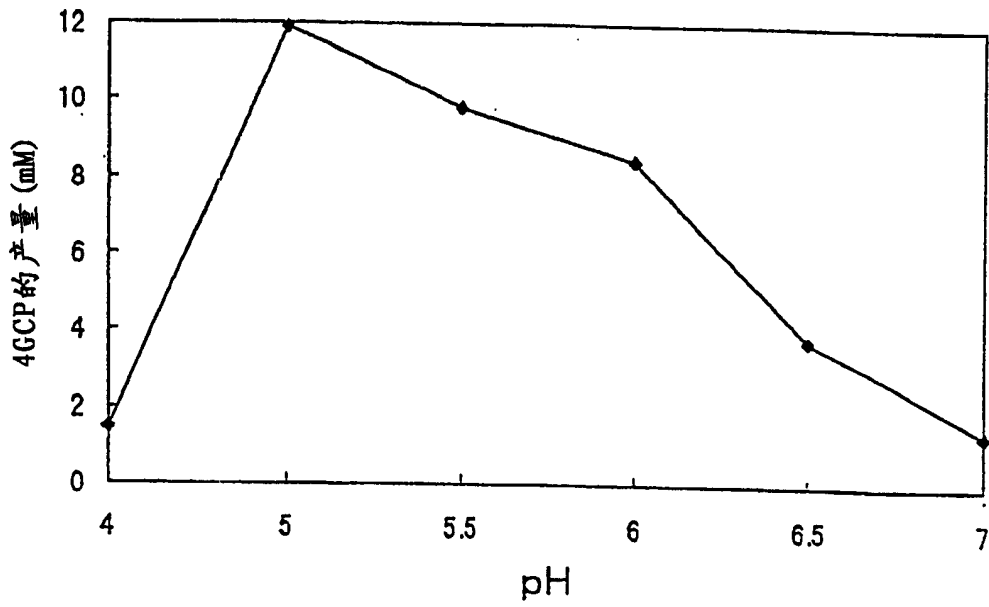


图 9

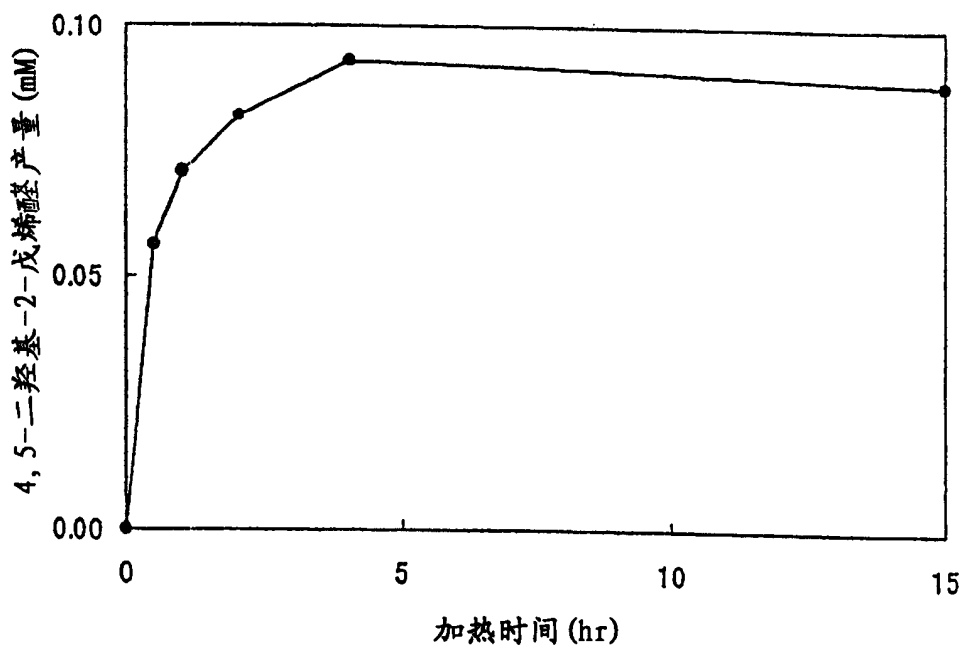


图 10