

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07D307/24
A61K 31/34



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98801958.2

[45] 授权公告日 2004 年 3 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1140520C

[22] 申请日 1998.1.19 [21] 申请号 98801958.2
[30] 优先权
[32] 1997.1.27 [33] JP [31] 25755/1997
[86] 国际申请 PCT/JP98/00190 1998.1.19
[87] 国际公布 WO98/32749 日 1998.7.30
[85] 进入国家阶段日期 1999.7.21
[71] 专利权人 宝酒造株式会社
地址 日本京都府
[72] 发明人 佐川裕章 奥田真治 村木信子
小山信人 猪饲胜重 加藤郁之进
审查员 曾武宗

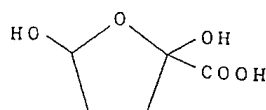
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 杨宏军

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 5 页

[54] 发明名称 四氢呋喃类

[57] 摘要

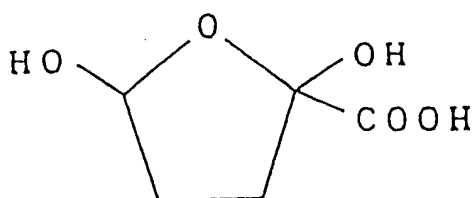
一种由下式【I】表示的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质或其盐。



【I】

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质或其盐，其结构式为：



【I】

2、一种由通式【I】表示的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质或其盐的制备方法，其特征在于包括对于从以下 (a) 和 (b) 中选出的至少一种化合物进行热处理的工序：

(a) 葡糖二酸或葡糖二酸衍生物，

(b) 含有葡糖二酸和/或葡糖二酸衍生物的化合物。

3、一种医药，其特征在于作为有效成份其中含有从通式【I】表示的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质或其盐中选出的化合物。

4、按照权利要求 3 所述的医药，是一种抗癌制剂。

四氢呋喃类

技术领域

本发明涉及作为医药有用的、具有抗癌作用等生理活性的新颖的四氢呋喃类，进而涉及该化合物的制备方法。

已有技术

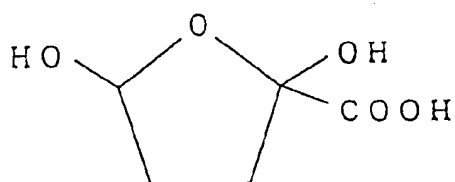
过去使用用于临床治疗的药物有多种，例如烷基化剂、代谢阻滞剂、植物生物碱等抗癌剂、抗生物物质、免疫调节剂等等，但是这些药物的治疗方法尚不能说已经完成。

发明要解决的课题

本发明目的在于提供开发具有抗癌作用等生理作用的、安全性高的新颖的化合物，该化合物的制备方法，以及含有该化合物的医药。

解决课题的手段

概括地讲，本发明中第一发明涉及下式【I】表示的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸 (2,5-dihydroxytetrahydro-2-furancarboxylic acid) 或其光学活性物质或其盐。



【I】

本发明中第二发明涉及由式【I】表示的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸或其光学活性物质或其盐的制备方法，其特征在于包括对从下述 (a) 和 (b) 中选出的至少一种化合物的加热处理工序：

(a) 葡糖二酸或葡糖二酸衍生物

(b) 含有葡糖二酸和/或葡糖二酸衍生物的化合物。

本发明中第三发明涉及一种医药，其特征在于作为有效成份含有

从式【I】表示的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸或其光学活性物质或其盐中选出的化合物。

在本发明中第三发明的优选实施方式中,所说的医药是抗癌剂。

附图的简要说明

附图 1 是表示葡糖二酸的酸性热处理产物吞噬诱导作用的曲线图。

附图 2 是表示 D-葡糖二酸 1,4-二内酯热处理产物吞噬诱导作用的曲线图。

附图 3 是 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸的质谱图。

附图 4 是 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸的紫外吸收光谱图。

附图 5 是 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸的 ^1H -核磁共振光谱图。

附图 6 是 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸的 ^{13}C -核磁共振光谱图。

发明的实施方式

以下具体说明本发明。

葡糖二酸 (Glucaric acid) 也叫糖二酸 (Saccharic acid), 用分子式 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_8$ (分子量 210.14) 表示, 是用硝酸等将 D-葡萄糖及含有该糖的低聚糖和多糖类氧化得到的二元羧酸, D-葡糖醛酸经溴水氧化也能得到。此外, 从橡胶树 (*Ficus elastica*) 的胶乳中也能以镁盐形式萃取出来。葡糖二酸衍生物的实例有葡糖二酸单内酯、葡糖二酸二内酯、葡糖二酸酯、葡糖二酸酰胺、盐类等, 热处理生成式【I】表示的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸的全部物质也包括在本发明之中。本发明的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸在 2-位和 5-位上虽然包含两个不对称碳原子, 但是本发明的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸包含全部四种异构体, 即 (2S, 5S) 体、(2S, 5R) 体、(2R, 5S) 体和 (2R, 5R) 体。所说的葡糖二酸内酯, 有 1,4-单内酯、3,6-单内酯、1,4-3,6-双内酯, 可以使用这些内酯。

所说的葡糖二酸酯, 例如有甲酯、乙酯等, 可以用葡糖二酸制备。酰胺化物也可以利用酰胺化法制备, 也可以分别制备含有葡糖二酸衍生物的化合物, 例如含有葡糖二酸内酯的化合物、含有葡糖二酸酯的

化合物、含有葡萄糖二酸酰胺的化合物。

本发明中所说的葡萄糖二酸或葡萄糖二酸衍生物，以及所说的含有葡萄糖二酸和/或葡萄糖二酸衍生物的化合物，只要在其热处理产物中生成式【I】表示的2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸即可，并无特别限定。

本发明中的热处理方法，可以举出将从葡萄糖二酸或葡萄糖二酸衍生物，以及含有葡萄糖二酸和/或葡萄糖二酸衍生物的化合物中选出的化合物，例如在酸性~中性条件下，于室温~400℃热处理数秒~数日，优选在50~200℃热处理数秒~24小时的方法。利用这种方法可以得到含有2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸的热处理产物。

热处理时pH和原料浓度，只要是处于热处理能够生成2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸的范围内就没有特别限制，可以根据操作性和收率设定。

本发明的热处理，可以采用湿法或干法，但是从本发明2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸的生成效率来看，优选湿法加热。所说的湿法加热，可以采用水蒸汽加热、加压水蒸汽加热、加压加热等任何湿法加热。所说的干法加热，可以采用干燥热风直接加热法，以及经隔壁用热源加热的间接加热法等。所说的直接加热法有空气流干热法和喷雾干热法等，而所说的间接加热法可以采用转鼓干热法等。

在热处理产物中生成具有吞噬诱导作用、癌细胞增殖抑制作用、抗菌作用等性质的物质，可以根据要达到的目的，通过改变pH、时间、温度、原料浓度等热处理条件。制备含有所需物质并具有吞噬诱导作用、癌细胞增殖抑制作用、抗菌作用等性质的热处理产物。

本发明的2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸或其光学活性物质或其盐，具有很强的癌细胞增殖抑制活性，可以以这种活性为指标从热处理产物中分离、精制2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸或其光学活性物质。作为分离、精制的手段，可以采用化学法、物理法等公知的精制方法，将凝胶过滤法、分子量分馏膜分馏法、溶剂萃取法、分馏法、使用离子交换树脂的各种色谱法等传统公知的精制方法加以组合，可以分离、精制反应生成物中的2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸或其光

学活性物质。

例如，使葡萄糖二酸在 121℃ 下反应 4 小时，在反应液中生成【I】表示的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸或其光学活性物质，通过对含有这种衍生物的反应生成物进行反向柱色谱处理，可以分离、精制 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸或其光学活性物质。

此外，通过使 α -酮戊二酸半醛 (α -ketoglutarate semialdehyde) 水解，也可以得到本发明的化合物。而 α -酮戊二酸半醛是用公知方法 [Journal of Bacteriology, 116, 1464~1354 (1973)] 得到的。

被分离的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸经过光学离析，可以得到 (-) 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸和 (+) 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸。

所说的光学活性物质的分离，可以利用外消旋混合物的机械离析法、选择性结晶法、非对映体盐或包藏化合物的结晶离析法、酶或微生物动力学离析法、色谱法等离析方法进行。

利用色谱离析时，可以使用气相色谱、液相色谱、薄层色谱法，对其中每种方法可以使用适当的手性固定相。

利用液相色谱进行离析时，可以采用使用手性固定相的方法、使用手性洗脱液的方法和以非对映体形式分离法等。

作为手性固定相，可以使用酰胺型固定相、尿素型固定相、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、聚甲基丙烯酸酯固定相、聚甲基丙烯酰胺固定相等。

作为洗脱液，可以使用己烷类、醇类、水（缓冲液）等，并可以与上述固定相适当组合使用。

对于本发明的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸或其光学活性物质或其盐而言，医药上容许的盐，例如可以举出碱金属盐、碱土金属盐、有机盐等盐类，可以用公知方法进行转化。

本发明的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸或其光学活性物质或其盐，具有癌细胞增殖抑制作用、吞噬诱导作用、抗菌作用等药理作

用, 将从本发明的 2, 5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质及其盐中选出的化合物作为有效成份, 可以制备用于预防或治疗例如对癌症、感染症等的治疗用医药。

也就是说, 本发明的 2, 5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸或其光学活性物质或其盐, 对于例如人前骨髓性白血病细胞 HL-60、人急性淋巴芽球性白血病细胞 MOLT-3、肺癌细胞 A-549、SV-40 转移肺癌细胞 WI-38VA13、肝癌细胞 Hep G2、结肠癌细胞 HCT 116、人结肠癌细胞 SW480、人结肠癌细胞 Wi Dr、胃癌细胞 AGS 和骨髓瘤等癌细胞具有细胞增殖抑制作用, 可以制备以从例如本发明的 2, 5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质或其盐中选出的化合物为有效成份的抗癌制剂。

将从发明的 2, 5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质或其盐中选出的化合物作为有效成份, 使之与公知的药用载体组合, 可以制备抗癌剂、吞噬作用诱导剂、抗菌剂等药剂。药剂, 例如抗癌剂的制备, 一般而言是将从 2, 5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质或其盐中选出的化合物, 与药学上允许的液态或固态载体混合, 根据需要再加入溶剂、分散剂、乳化剂、缓冲剂、稳定剂赋形剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂等, 可以制成锭剂、粒剂、散剂、粉剂、胶囊剂等固体剂型, 以及通常液剂、悬浊剂、乳剂等液体剂型。而且, 在使用之前利用加入适当载体的方法, 可以制成能够变成液体的干燥品。

药用载体可以根据上述的给药方式和剂型适当选择。经口给药的情况下可以采用淀粉、乳糖、白糖、甘露糖醇、羧甲基纤维素、玉米淀粉、无机盐等。而且在制备口服制剂时, 还可以加入粘合剂、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。

此外, 非口服剂型的情况下, 按照惯常方法将从本发明的 2, 5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质或其盐中选出的作为有效成份的化合物, 溶解或悬浮在作为稀释剂使用的注射用蒸馏水、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、聚乙二醇等之中，必要时向其中加入杀菌剂、稳定剂、等渗剂和止痛剂等。

本发明的制剂，按照与制剂形态相应的适当给药途径给药。关于给药方式并没有特别限制，可以内用、外用和注射。注射剂，例如可以经静脉、肌肉、皮下和皮内给药等，外用剂包括栓剂。

抗癌剂的给药量，根据其制剂形态、给药方法、用药目的以及用药患者的年龄、体重、症状适当确定，一般情况下（但不一定）制剂中所含的、从2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质或其盐中选出的化合物量，对于成人而言每日给药量为0.1微克~200毫克。当然，由于给药量因种种条件而改变，所以既有少于上述给药量的情况，也有必须超出上述给药量的情况。本发明的药剂，除了直接口服之外，还可以加入到任何饮食品中日常摄取。

本发明的2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质或其盐，能够从葡糖二酸更有效地制备。这种2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质或其盐，除具有抗癌活性之外，还具有癌细胞分化诱导活性、吞噬诱导活性、抗菌活性等性质，是有用的药用化合物。

本发明的2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸也可以通过使 α -酮戊二酸半醛水解反应得到，所以以 α -酮戊二酸半醛作为有效成份，给药后 α -酮戊二酸半醛可以转变成2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸，因此含有这种 α -酮戊二酸半醛的医药也包括在本发明的医药中。

本发明的2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质或其盐，具有抗癌作用、吞噬诱导作用等生理作用；含有、添加或稀释本发明的2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质或其盐制成的食品或饮料，可以作为具有抗癌活性、吞噬诱导活性等生理活性的食品或饮料使用。

从葡糖二酸或葡糖二酸衍生物以及含有葡糖二酸或葡糖二酸衍生物的化合物中选出的至少一种化合物经热处理得到的热处理产物，显示吞噬诱导作用、癌细胞增殖抑制作用、抗菌作用等，以该热处理产

物为有效成份，将其与公知的药用载体组合，可以制成抗癌剂等医药。

抗癌剂的给药量，可以根据其制剂形态、给药途径、给药目的以及用药患者的年龄、体重和症状适当确定；一般而言（但不一定），制剂中所含的有效成份量，对于成人来说每日相当于1~1000毫克，优选10~200毫克。当然，由于给药量因种种条件而改变，所以既有少于上述给药量的情况，也有必须超出上述给药量的情况。本发明的药剂，除了直接口服之外，还可以加入到任何饮食品中日常摄取。

上述热处理产物具有抗菌活性，可以作为抗菌剂或者作为提高食品或饮料保存性能的防腐剂使用。此外，将上述热处理产物加入到食品或饮料中，可以用作食品或饮料的防腐方法。

在食品或饮料中添加上述热处理产物的情况下，热处理产物中所含抗菌剂的性状可以是液态、糊状、粉状、片状、粒状等。若考虑到操作的简易性和与其他添加物混合使用的情况下，优选将其制成干燥粉末状、片状和颗粒状。作为干燥方法，可以按照通常的方法进行，例如喷雾干燥、转鼓干燥、柜式干燥、真空干燥和冷冻干燥等。

以上述热处理产物为有效成份的抗菌剂或防腐剂，可以用本领域技术人员公知的任何方法制备，制备时还可以添加制剂容许的适当公知添加剂，例如赋形剂、稳定剂、崩解剂、粘合剂、溶解助剂等。也可以与乙醇、甘氨酸、乙酸钠、抗坏血酸、甘油脂肪酸酯、食盐、EDTA等其他具有抗菌活性的物质组合使用。

上述热处理产物在食品或饮料中的添加量，因食品或饮料的种类而异，可以根据使用目的来确定。

以上述热处理产物为有效成份的抗菌剂使用方法，可以按照适用于食品或饮料的方法进行。添加的方法并没有特别限制，总之用任何方法都可以使食品或饮料含有上述热处理产物。然而，在使用抗菌剂时，所谓添加是指使食品或饮料含有上述热处理产物的任何方法。通常方法是在食品或饮料的制备过程中加入，但是也可以采用将食品在含有上述热处理产物的溶液中浸渍一定时间的方法。而且也可以将在食品中添加的方法与浸渍方法并用。适于采用浸渍方法的食品是在水

中性状不破坏的食品，例如可以举出例如鱼糕、维也纳香肠等鱼、畜的肉末产品，熟面等面条类、冷冻前的虾、贝、鱼类等冷冻食品。

通过使用以上述热处理产物为有效成份的抗菌剂作为防腐剂，能够进一步提高食品或饮料的保存性。而且，对于冷冻食品和冷冻甜食来说，在冷冻前的加工工序中能够抑制污染微生物的繁殖，可以获得卫生上的极佳结果。以上述热处理产物为有效成份的抗菌剂，对于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都具有效果，例如对于甲氧西林耐药性金黄色酿脓葡萄球菌的除菌，预防肠出血性大肠菌 O-157 等引起食物中毒的细菌感染也是极为应有用的。

上述抗菌剂对于虫牙细菌和牙周病菌也具有抗菌活性，可以提供含有上述抗菌剂的口腔内用剂。口腔内用剂的形态，可以制成液态、糊状等公知形态。口腔内用剂的实例可以举出洁齿剂。所说的洁齿剂也可以呈液态、糊状和粉末状，能够制成公知的洁齿剂形状。对于洁齿剂中上述热处理产物的含量没有特别限制，可以处于对于虫牙细菌和牙周病菌的有效浓度下。在洁齿剂中可以添加公知的添加剂，例如湿润剂、表面活性剂、粘合剂、香料和甜味剂等。

通过使食品或饮料中含有上述热处理产物，可以制备吞噬诱导性食品或饮料。含有上述热处理产物的食品或饮料，因该热处理产物具有各种生理活性、吞噬诱导作用、抗癌作用、抗菌作用等，所以是通过摄取这些物质具有癌症的预防和抑制效果的适于细胞异常增殖性疾病患者使用的康复食品或饮料，而且是维持生物体内环境稳定，特别是对于保持肠胃健康来说有用的食品或饮料。此外，因其抗菌作用，还是保存性极好的食品或饮料。因此，上述热处理产物是极为有用的食品或饮料添加剂，特别是食品或饮料的防腐剂。

本发明的 2,5-二羟基四氢-2-咪喃甲酸、其光学活性物质或其盐，或上述热处理产物，即使经口给药具有生理活性的有效剂量，也没有发现任何毒性。

实施例

以下列举实施例进一步具体说明本发明，但是本发明并不受这些

实施例的任何限制。实施例中的%，是指重量%。

实施例 1

(1) 将 D-糖二酸钾 (304-02, ナカライテスク株式会社制备) 溶解在 1N 盐酸中成 10 mg/ml, 在 121℃ 下加热 30 分钟, 盐酸酸性下调制热处理产物。接着用氢氧化钠将该盐酸酸性下的热处理产物调节到 pH7.0, 稀释到 5 mg/ml 后, 按照以下方法测定了对于人前骨髓性白血病细胞 HL-60 的吞噬诱导活性。

在经 56℃ 30 分钟处理的含有 10% 胎牛血清 (ギブコ株式会社制) 的 RPMI1640 培养基 (日水株式会社制) 中, 于 37℃ 下培养 HL-60 (ATCC CCL-240), 然后将其悬浮在含有 10% 牛胎盘血清的 RPMI1640 培养基中, 使之浓度达到 2.5×10^5 个/4.5ml。

向 4.5ml 这种悬浮液中加入 0.5ml 上述盐酸酸性下的热处理产物, 在 37℃ 和 5% 二氧化碳存在下培养 16 小时。而且, 为了对照使用公知的诱导吞噬作用的试剂 0.05 ml 放线菌素 D (シグマ株式会社制) 水溶液和 0.45 ml 生理食盐水代替上述盐酸酸性下的热处理产物, 进行了同样的培养。

在光学显微镜下观察培养细胞, 分别确认了盐酸酸性的热处理产物和加入放线菌素 D 后的培养细胞产生细胞核的凝缩、细胞的缩小、吞噬小体的形成和细胞增殖抑制作用。而在对照用的、加入了生理食盐水、0.5M 氯化钠水溶液 (与调节 pH 后稀释的盐酸酸性下的热处理产物具有同样盐浓度) 以及 0.5 ml 葡糖二酸钾未加热的物质的培养细胞中, 没有发现这些现象。

(2) 将 D-糖二酸钾溶解在 10ml 水中制成浓度达 10 mg/ml, pH 为 3.95。在 121℃ 下加热 30 分钟。热处理产物的 pH 为 4.1。用氢氧化钠将此盐酸酸性下的热处理产物调节到 pH 7.0 后, 按照实施例 1-(1) 的方法测定了对 HL-60 细胞的吞噬诱导活性、细胞增殖抑制活性, 此样品具有这两种活性。

结果示于附图 1 中。也就是说, 附图 1 是在 HL-60 细胞培养液中添加糖二酸的酸性下热处理产物达到 1mg/ml 时, 表示培养时间与培养

液中活细胞数目之间关系的曲线图。图中，横轴表示培养时间(时间)，而纵轴表示培养液中的活细胞数($\times 10^5$ 个/5ml)。附图1中，正方形白符号($\square$)和菱形白符号($\diamond$)，分别表示未添加样品(对照)和添加有糖二酸酸性下热处理产物。

(3) 将D-糖二酸 1,4-内酯一水合物(304-35, ナカライテスク株式会社制)溶解在1N盐酸中制成浓度达10 mg/ml, 在121℃下加热30分钟, 制备了盐酸酸性下的热处理产物。接着用氢氧化钠将该盐酸酸性的热处理产物调节到pH 7.0, 并稀释到5 mg/ml, 然后按照实施例1-(1)的方法测定对HL-60细胞的吞噬诱导活性和细胞增殖抑制活性, 此样品具有这两种活性。而未加热的D-糖二酸 1,4-内酯无此活性。

(4) 将D-糖二酸 1,4-内酯一水合物(304-35, ナカライテスク株式会社制)溶解在水中制成浓度10 mg/ml, 用氢氧化钠调节到pH 7.0后, 在121℃下加热30分钟。热处理产物的pH 4.3。用氢氧化钠将此热处理产物调节到pH 7.0后, 按照实施例1-(1)的方法测定对HL-60的吞噬诱导活性和细胞增殖抑制活性, 此样品具有这两种活性。而未加热的D-糖二酸 1,4-内酯无活性。

结果示于附图2中。也就是说, 附图2是在HL-60细胞培养液中添加糖二酸 1,4-内酯的热处理产物达到1mg/ml时, 表示培养时间与培养液中活细胞数目之间关系的曲线图。图中, 横轴表示培养时间(时间), 而纵轴表示培养液中的活细胞数($\times 10^5$ 个/5ml)。附图2中, 正方形白符号($\square$)和菱形白符号($\diamond$), 分别表示未添加样品(对照)和添加有糖二酸 1,4-内酯的热处理产物。

(5) 将D-糖二酸钾溶解在水中制成10 mg/ml和pH3.95。在121℃下将其加热30分钟、1小时、2小时、4小时、和16小时。将各种加热物和未加热物的pH调节到7附近后, 进行0.22微米的过滤器灭菌, 制备了测定吞噬诱导活性和细胞增殖抑制活性测定用的样品。将这些样品稀释2倍、5倍、10倍、20倍、50倍和100倍后, 按照以下方法测定了对于人前骨髓性白血病细胞HL-60的细胞增殖抑制活

性，对比活性的大小。

也就是说，将各稀释液或水各取 10 微升分别置于 96 孔微量点滴板的孔穴中。向其中加入 100 微升含有 5000 个 HL-60 细胞和 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基，在 5% 二氧化碳存在下，37℃ 培养 48 小时。加入浓度为 5mg/ml 的 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑噻吩溴化物 (MTT; シグマ株式会社制) 的磷酸盐缓冲食盐水溶液，进一步继续培养 4 小时后，用显微镜观察了细胞的生育状态。而且，优选加入 100 微升含有 0.04N 盐酸的 2-丙醇后搅拌，在 590nm 下测定吸光度，以此作为细胞增殖程度 (MTT 法)。

结果发现，未加热的 D-糖二酸钾溶液中没有细胞增殖抑制活性，而分别经过 30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、16 小时热处理的 D-糖二酸钾热处理溶液中，分别稀释到 2、2、5、10 和 20 倍之前都具有细胞增殖抑制活性。在显示细胞增殖抑制活性的样品浓度下，发现了细胞核的凝缩、细胞的缩小和吞噬小体的形成现象，因而证明了其吞噬诱导活性。

另一方面，在 pH 调节之前从各热处理产物中取出一部分样品浓缩至干，溶解在相当于浓缩至干物质容积 1/20 的 50% 的甲醇中。将这些浓缩物点滴在两片薄层硅胶 (硅胶 160 F254, Merck 公司制) 上后，用展开溶剂 (醋酸正丁酯: 醋酸: 蒸馏水 = 3: 1: 1) 展开。展开终止后的一片薄层用短波紫外线照射，检出样品斑点。进而用 $\text{AgNO}_3\text{-NH}_3$ 溶液 (0.1N AgNO_3 水溶液 + 5N NH_3 水溶液的等量混合物) 喷雾，利用加热检出样品斑点。用乙醇硫酸混合物 (乙醇: 硫酸 = 2: 1) 在另一片薄层上喷雾，通过加热检出样品斑点。

薄层硅胶色谱检出的结果发现，随着时间流逝而一起增加的斑点的 RF 值，处于 0.13、0.06 和 0.03 附近，此趋势与 MTT 法分析的细胞增殖抑制活性的增加，具有平行关系。

(6) 将 D-糖二酸 1,4-内酯-水合物 (ナカライテスク株式会社制) 溶解在水中制成 10 mg/ml 和 pH2.5。在 121℃ 下分别将其加热 30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、和 16 小时。将各加热物和未加热物

的 pH 调节到 7 附近后, 进行 0.22 微米的过滤器灭菌, 制备了测定细胞增殖抑制活性用样品。将这些细胞增殖抑制活性测定用样品分别稀释 2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍和 100 倍后, 按照实施例 1-(5) 的方法测定了对于 HL-60 细胞的细胞增殖抑制活性, 对比活性大小。观察到培养细胞的细胞核凝缩、细胞缩小和吞噬小体的形成现象, 进而比较了吞噬诱导活性的强弱。

结果发现, 未加热的 D-糖二酸 1,4-内酯溶液中没有细胞增殖抑制活性和吞噬诱导活性, 而分别经过 30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、16 小时热处理的 D-糖二酸 1,4-内酯热处理溶液中, 分别稀释到 1、2、5、10 和 50 倍之前都具有细胞增殖抑制活性和吞噬诱导活性。

另一方面, 在 pH 调节之前从各热处理产物中取出一部分样品浓缩至干, 溶解在相当于浓缩至干物质容积 1/20 的 50% 的甲醇中。然后, 按照实施例 1-(5) 记载的方法进行薄层硅胶色谱处理。

薄层硅胶色谱检出的结果发现, 随着时间流逝而一起增加的斑点的 RF 值, 处于 0.13、0.06 和 0.03 附近, 此趋势与 MTT 法分析的细胞增殖抑制活性的增加, 具有平行关系。

进而, 将 1.5 ml D-糖二酸 1,4-内酯热处理物浓缩至干, 将其再溶解在 60 微升 50% 甲醇中, 然后取其中的 50 微升, 与实施例 1-(5) 同样用薄层硅胶色谱展开。剪下此薄层硅胶之 RF 值处于 0.13 附近、0.13~0.06、0.06 附近、0.03 附近和原点附近的硅胶, 分别将其用 500 微升 50% 甲醇萃取。将这些萃取液浓缩至干后, 溶解在 100 微升灭菌的蒸馏水中, 按照与实施例 1-(5) 同样方法测定细胞增殖抑制活性和吞噬诱导活性后发现, 在点至 RF 值 0.13 之间具有活性。

(7) 将 D-糖二酸 1,4-内酯一水合物 (ナカライテスク株式会社制) 溶解在水中制成 10 mg/ml 和 pH2.5。在 121℃ 下分别将其加热 4 小时和 16 小时。

将这些 D-糖二酸 1,4-内酯的加热物和未加热物用 API-III (サイエックス株式会社制) 进行负离子质谱分析。结果查明, 随着加热时间和吞噬诱导活性的增加, 加热物中分子量为 130 和 148 的物质增加。

实施例 2

(1) 121℃下将 1%的 D-糖二酸 1,4-内酯一水合物加热 4 小时, 取其样品 100ml 冷冻干燥, 再溶解在 2 毫升水中。使用 0.5 微米 Cosmonice 过滤器 (440-84, ナカライテスク株式会社制) 将一部分此再溶解物过滤后, 以 0.1%三氟乙酸 (349-01, ナカライテスク株式会社制) 水溶液为移动相, 在每分钟 0.5 毫升流速下, 使用 TSK 凝胶 ODS-80Ts (6mm×250mm; 东ソー株式会社制) 进行了 HPLC 分析, 测定 210 nm 处的吸光度后可以发现十个主峰, 所以用同样方法分取各主峰, 进行 0.22 微米过滤器灭菌, 利用这种方法制备了癌细胞增殖抑制活性的样品。将这些样品分别稀释 1、2、4、8、16 和 32 倍, 按照实施例 1-(5) 的方法测定了对于人前骨髓白血病细菌 HL-60 的细胞增殖抑制活性以及吞噬诱导活性, 并且比较了活性的强弱。

结果发现, 保留时间为 5.6 分钟的主峰物质具有活性, 而保留时间 5.6 分钟主峰的 32 倍稀释物具有细胞增殖抑制活性和吞噬诱导活性。

(2) 分取实施例 2-(1) 记载的保留时间 5.6 分钟的主峰物质, 减压浓缩至干, 使用 DX302 质谱仪 (日本电子株式会社制) 对此样品进行了质谱分析。然后溶解在重水中, 用核磁共振法 (NMR) 分析其结构。核磁共振仪使用 JNM-A500 (日本电子株式会社制)。接着将其溶解在水中制成 88 微克/毫升, 用 UV-2500 型分光光度计 (岛津制作所制) 测定了紫外吸收光谱。试验结果如下。

此样品的各种特性示于附图 3~6。即, 附图 3~6 是显示本发明的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸各种特性的曲线图。

附图 3 表示质谱 [纵轴是相对强度 (%), 横轴是 m/z], 附图 4 表示紫外吸收光谱 [纵轴是吸光度, 横轴是波长 (nm)], 附图 5 表示 ^1H -核磁共振谱 [纵轴是信号强度, 横轴是化学位移量 (ppm)], 附图 6 表示 ^{13}C -核磁共振谱 [纵轴是信号强度, 横轴是化学位移量 (ppm)]。

FAB-MS: m/z 131 [M-H₂O + H]⁺

UV: $\lambda_{\max}$ 末端吸收

非对映体 1

$^1\text{H-NMR}$: δ 1.83 (1H, m, 4-H), 1.94 (1H, m, 3-H), 2.18 (1H, m, 4-H), 2.36 (1H, m, 3-H), 5.55 (1H, d-d, $J=2.0, 5.0\text{ Hz}$, 5-H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ 32.1, 34.3, 100.5, 103.3, 174.4

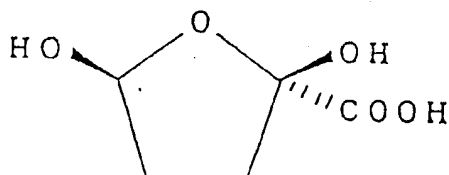
非对映体 2

$^1\text{H-NMR}$: δ 1.88 (1H, m, 4-H), 2.07 (1H, m, 3-H), 2.15 (1H, m, 4-H), 2.23 (1H, m, 3-H), 5.51 (1H, d-d, $J=3.5, 5.0\text{ Hz}$, 5-H)

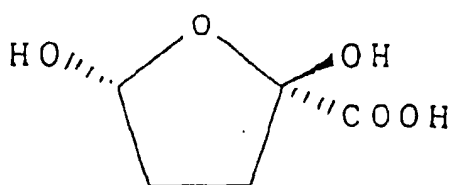
$^{13}\text{C-NMR}$: δ 32.7, 35.5, 101.1, 103.5, 174.7

其中, 在 $^1\text{H-NMR}$ 中以 HOD 的化学位移值为 4.65ppm, $^{13}\text{C-NMR}$ 中以二噁烷的化学位移值为 67.4ppm.

从这些数值可以知道, 本样品是下式【II】表示的 (2S, 5S)-2, 5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸及其对映体, 以及下式【III】表示的 (2S, 5R)-2, 5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸及其对映体之间的混合物。其中, 对映体 1 和对映体 2 是式【II】表示的物质、其对映体或其混合物, 其他一些是式【III】表示的物质、其对映体或其混合物。



【II】



【Ⅲ】

实施例 3

用《细菌学杂志》，116 卷，1464-1354 页（1973 年）上提到的方法制备了 α -酮戊二酸半醛，再利用水解反应得到了 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸。

实施例 4

（1）将 D-糖二酸钾溶解在蒸馏水中制成 1%，在 121℃ 下加热 4 小时。使用这种糖二酸钾的热处理产物研究了抗菌活性。

在 L-肉汤（含有 1% 胰胨、0.5% 酵母提取物和 0.5% 氯化钠，pH7.0）中将大肠杆菌 HB101 培养一夜。向在 5 毫升 L-肉汤中加有 50、500 微升糖二酸钾热处理产物培养基，以及未加入热处理产物的培养基中，接种 5 微升种培养液，在 37℃ 下振动培养，测定其生育情况。培养开始时和培养 6.5 小时后，用富士数字浊度计（富士工业株式会社出售，秋元电机制作所制备）在调节刻度为 82.3 的条件下，进行测定，以从 6.5 小时后的数值扣除培养开始时的数值作为生育状态。结果示于表 1 之中，如表 1 中所示，糖二酸钾的热处理产物具有抗菌活性。

表 1

添加量（微升/5 毫升）	生育（浊度）
0	167
50	159
500	120

（2）将 D-糖二酸-1,4-内酯一水合物溶解在蒸馏水中制成 1%，在 121℃ 下加热 4 小时。使用此 D-糖二酸-1,4-内酯的热处理产物按照实施例 4-（1）中记载的方法研究了抗菌活性。结果示于表 2 之中，如表 2 中所示，糖二酸-1,4-内酯的热处理产物具有抗菌活性。

表 2

添加量 (微升/5 毫升)	生育 (浊度)
0	167
50	154
500	15

实施例 5 注射剂

(1) 制备了 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸的 0.1% 注射用蒸馏水溶液, 将其无菌过滤, 制备了注射剂。

(2) 将实施例 1-(2) 记载的 D-糖二酸热处理产物的中和产物浓缩至干, 溶解在蒸馏水中, 制备了 1% 的溶液。将此溶液充填在冷冻干燥用安培瓶中, 使其中一个安培瓶中的溶液含有相当于 10 毫克上清馏份的干燥物, 进行冷冻干燥。另外向其中加入 2 毫升生理食盐水作为溶解液。

使用实施例 1-(4) 中记载的 D-糖二酸-1,4-内酯的热处理产物, 按照同样方法制备了注射剂。

实施例 6 片剂

按照以下配方配制了片剂:

D-糖二酸钾的热处理产物	10 毫克
玉米淀粉	65 毫克
羧甲基纤维素	20 毫克
聚乙烯基吡咯烷酮	3 毫克
硬脂酸镁	2 毫克
一片含	100 毫克

使用了实施例 1-(2) 记载的 D-糖二酸热处理产物中和产物的冷冻干燥物。

发明的效果

本发明提供了具有抗癌作用、癌细胞增殖抑制作用、吞噬诱导作

用和抗菌作用等生理活性的，安全性高的 2,5-二羟基四氢-2-呋喃甲酸、其光学活性物质或其盐，而且提供了含有所说的化合物并具有生理活性功能的医药（特别是抗癌制剂）。

图 1

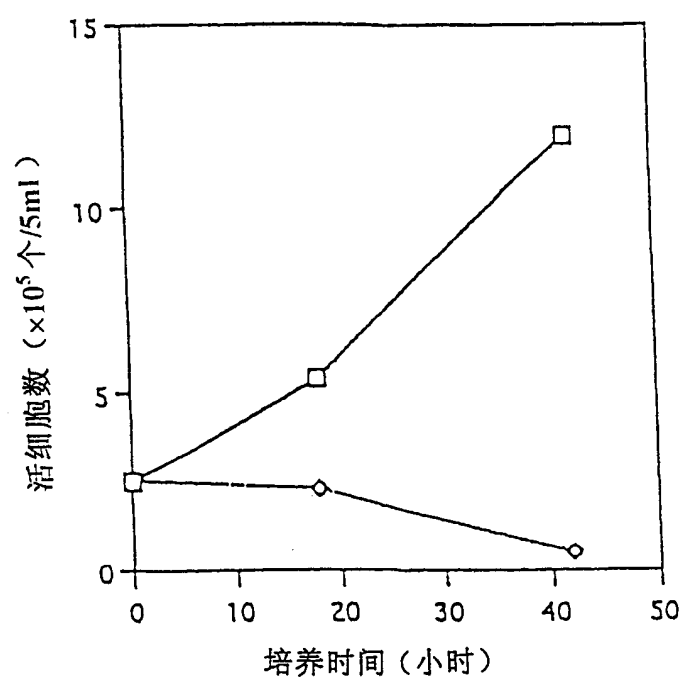


图 2

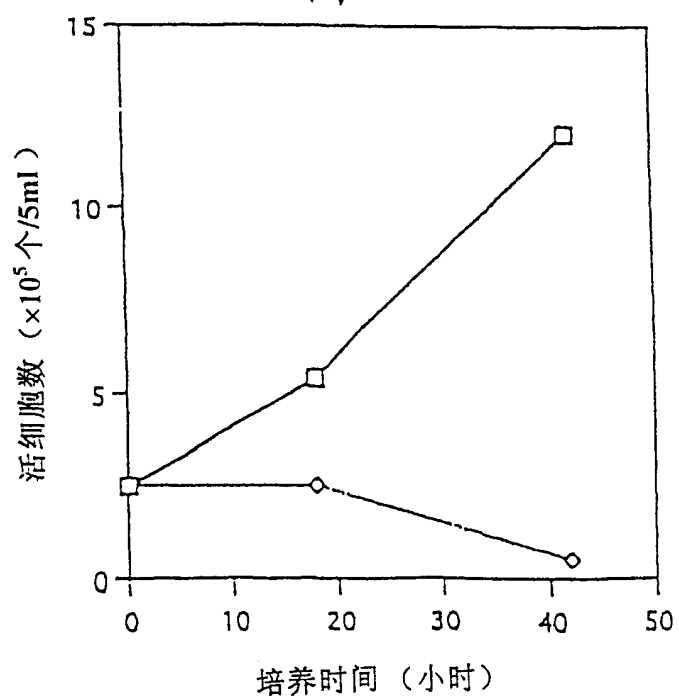


图 3

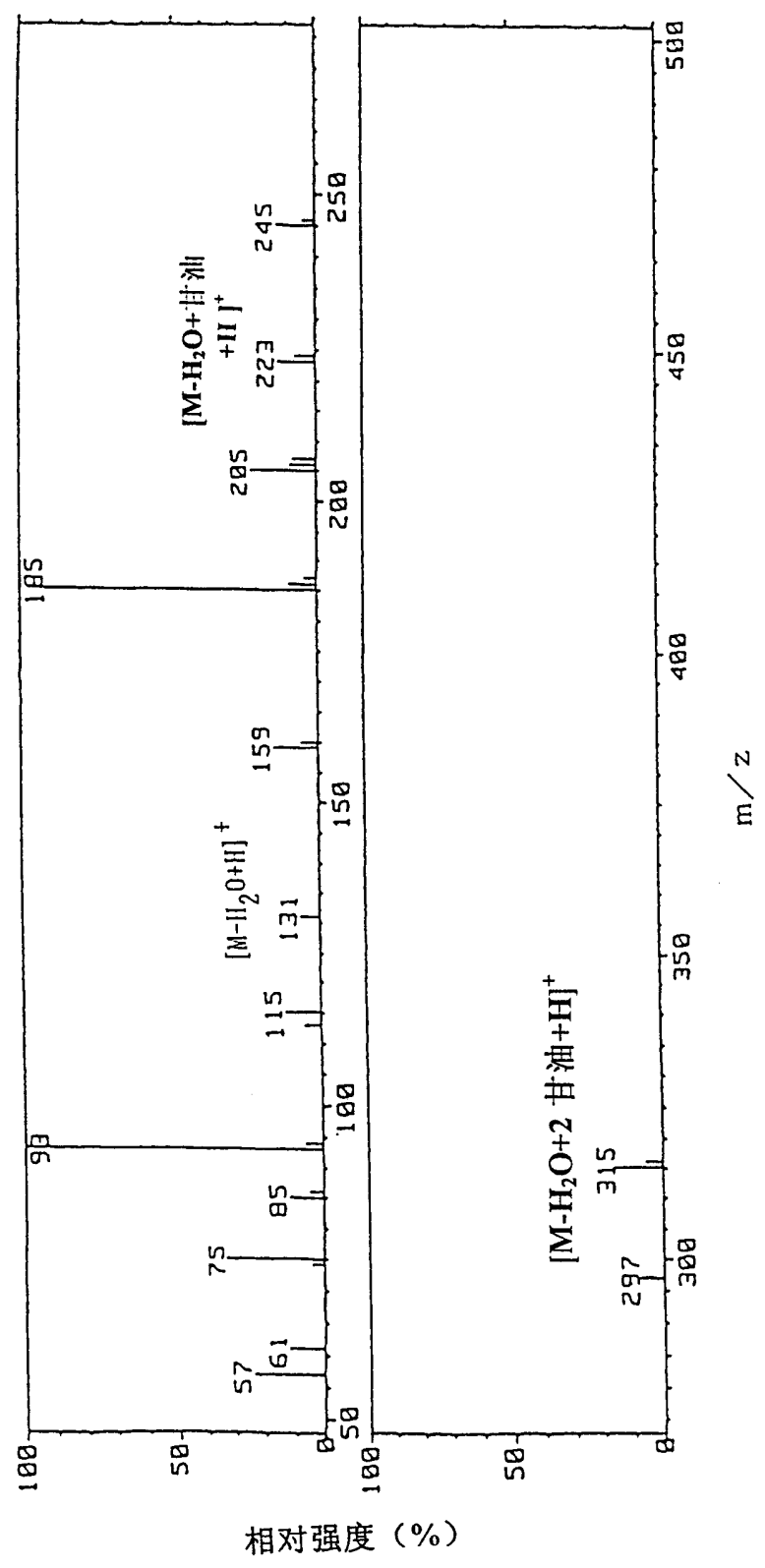


图 4

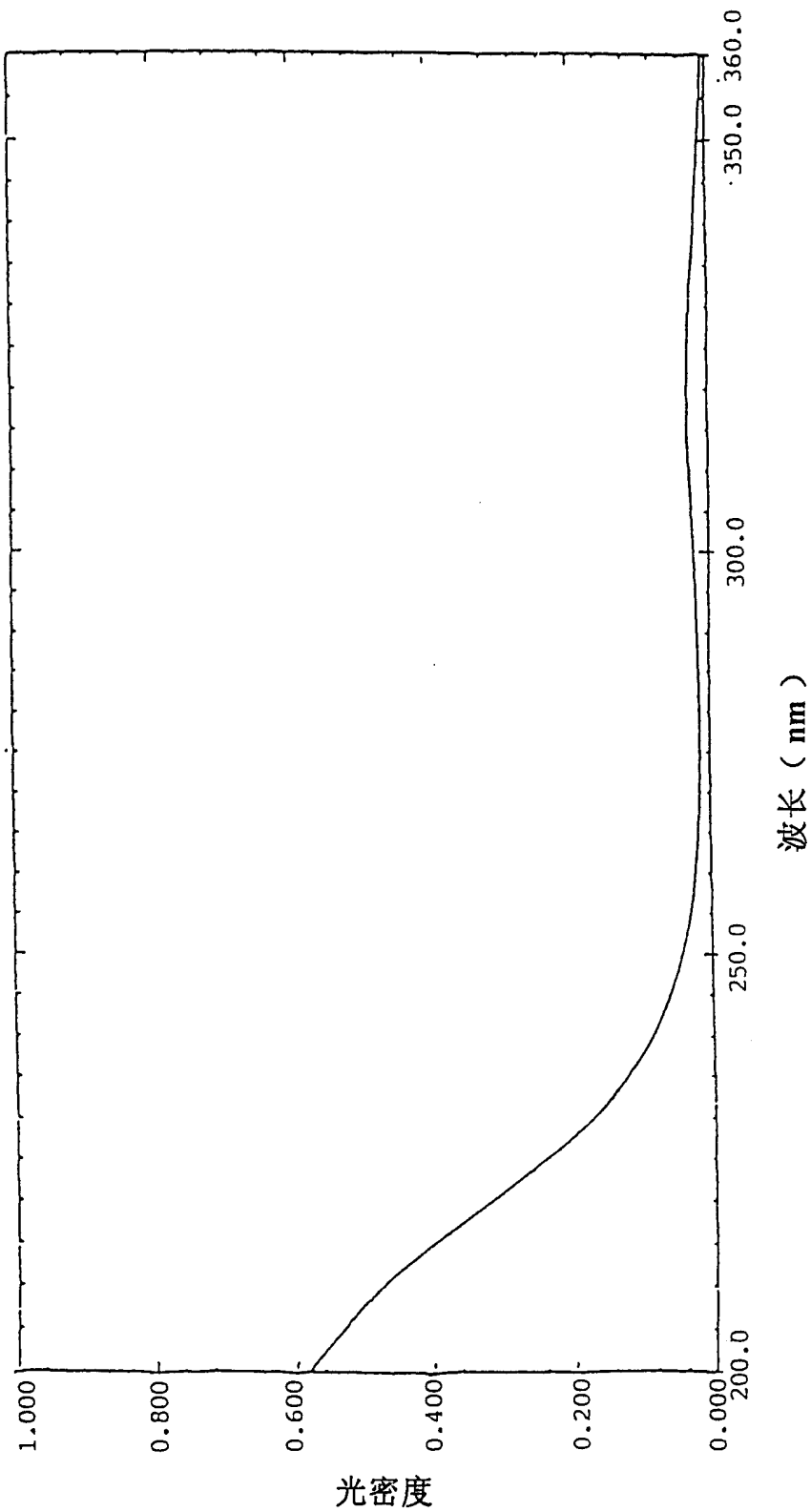


图 5

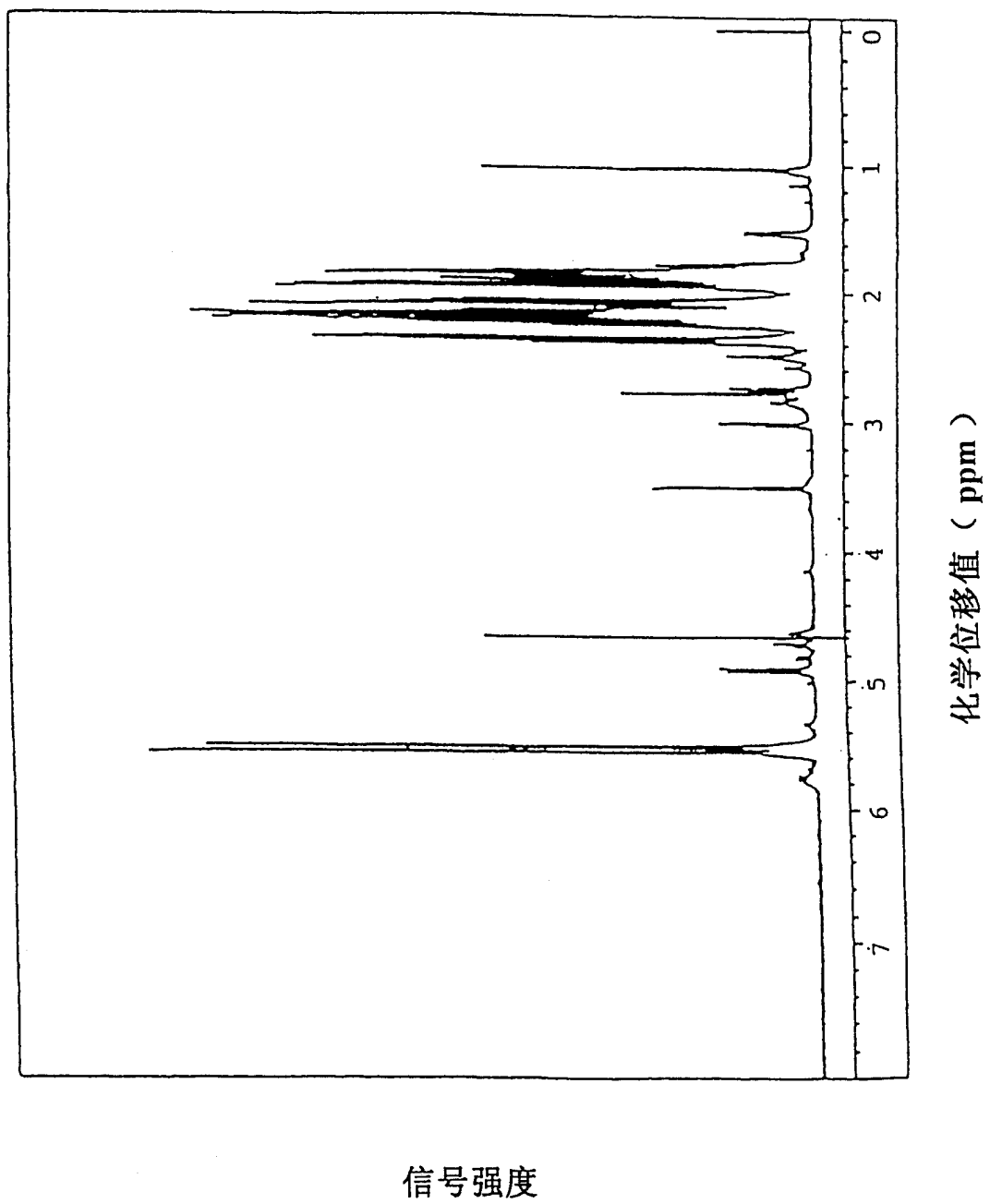
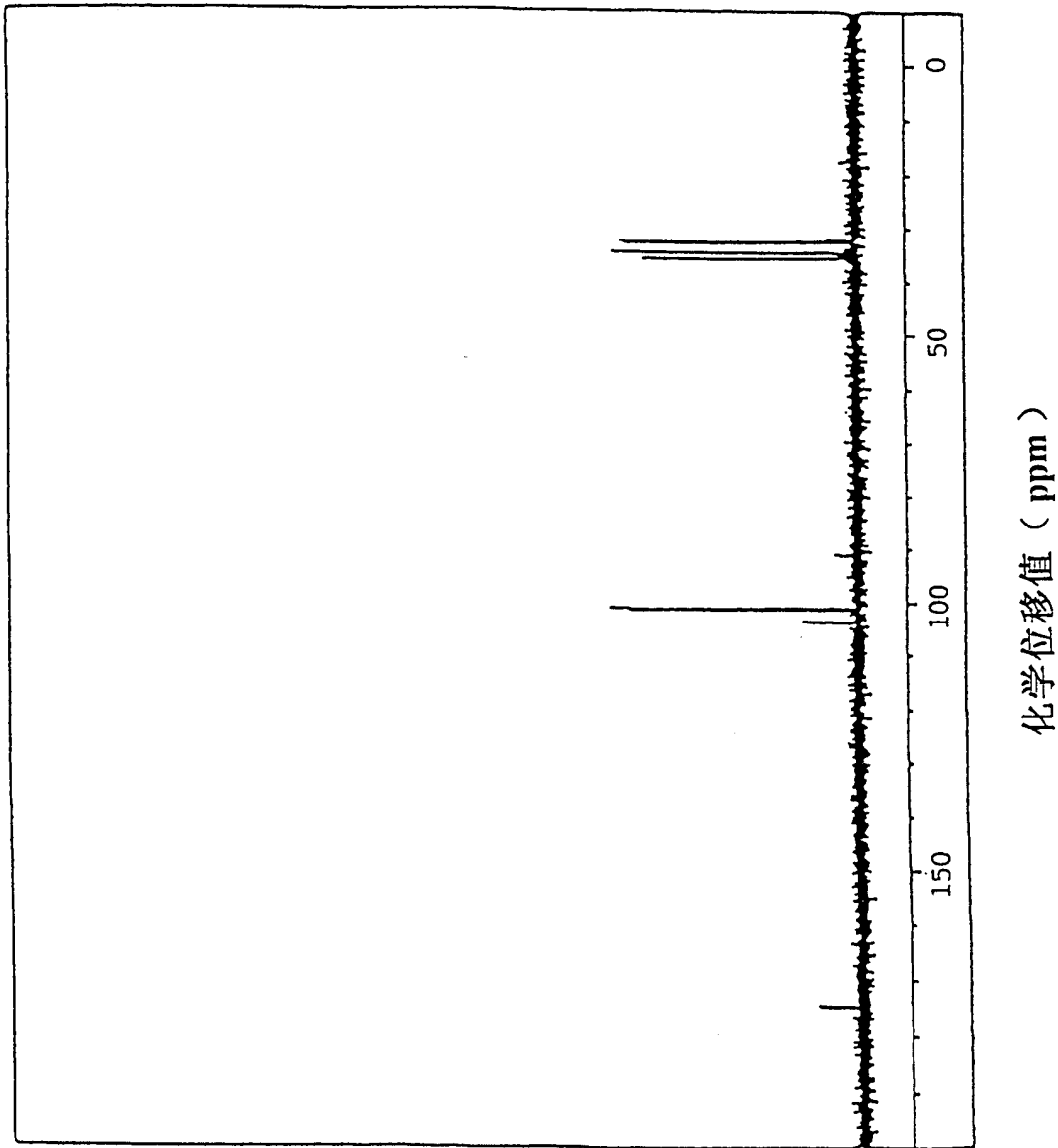


图 6



信号强度