

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-500411

(P2004-500411A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl.⁷

A61K 45/00

A61K 31/41

A61P 35/00

A61P 43/00

C07D 249/14

F I

A61K 45/00

A61K 31/41

A61P 35/00

A61P 43/00 111

C07D 249/14 501

テーマコード (参考)

4C084

4C086

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 60 頁)

(21) 出願番号 特願2001-572094 (P2001-572094)

(86) (22) 出願日 平成13年3月28日 (2001.3.28)

(85) 翻訳文提出日 平成14年8月7日 (2002.8.7)

(86) 国際出願番号 PCT/US2001/010508

(87) 国際公開番号 WO2001/074349

(87) 国際公開日 平成13年10月11日 (2001.10.11)

(31) 優先権主張番号 60/193,572

(32) 優先日 平成12年3月30日 (2000.3.30)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 594003676

オクラホマ メディカル リサーチ ファ
ウンデーションOKLAHOMA MEDICAL RE
SEARCH FOUNDATION

アメリカ合衆国 オクラホマ 73104

, オクラホマ シティ, エヌ. イー. 1

3ティーエッチ ストリート 825

825 N. E. 13th Stree

t, Oklahoma City, Okl

ahoma 73104, United

States of America

(74) 代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の発達の阻害のための、ブチルニトロンを含む組成物

(57) 【要約】

PBN (- フェニル - tert - ブチルニトロ)、およびその誘導体であるニトロンを基本とするフリーラジカル捕捉剤は、新生物発生前の結節の発達を有意に減少させ、そして非常に低いレベルで肝細胞癌 (HCC) の形成を阻害する。活性酸素種 (ROS) の癌発達における関与は、長年強く関連付けられてきた。ラットへのコリン欠乏 (CD) 食餌の給餌が肝細胞癌 (HCC) の発達を生じるモデルシステムでの癌の発達において、このROSの関与は、強く関連付けられてきた。PBNの飲料水中への投与は、HCCの形成を阻害する。肝臓における新生物発生前の結節の成長は、食事でのPBNまたはその天然の代謝産物のいくらかの投与によって有意に抑制される。CD肝臓モデルにおけるHCCの発達の防止におけるこのPBNの効果は、標的細胞が遺伝的に腫瘍細胞に変化した後の、腫瘍の発達の防止に起因すると考えられる。

Effects of PBN on the induction of HCC in CD rats fed the CDMA diet for 12 weeks									
Group	Treatments	Initial Number n	Effective Number n	Final body weight (g)	Relative weight (g/100 g body weight)	Induction of neoplastic lesions		Grade of lesions	
						HCC	HCC		
For 12 weeks: Last 42 weeks									
1	CDMA	10	7	415 ± 27 ^a	4.45 ± 0.26 ^a	4	57.1	4	37.52 ± 1.75 ^a
2	CDMA + PBN	10	8	409 ± 14	4.52 ± 0.27	2	25.0 ^b	2	25.05 ± 1.95 ^a
3	CDMA + PBN + CDMA	10	9	400 ± 16	4.60 ± 0.24	2	22.2 ^b	0	0 ^a
4	CDMA + PBN	10	9	379 ± 10	4.21 ± 0.15	5	62.5 ^b	0	12.86 ± 1.85
5	CDMA + CDMA	10	0	420 ± 11 ^a	2.20 ± 0.12 ^a	0	0	0	1.64 ± 0.15 ^a
6	CDMA + PBN + CDMA + PBN	10	0	405 ± 16 ^a	2.31 ± 0.23	0	0	0	0 ± 0 ^a

^aValues are presented as mean ± standard deviation.^bSignificantly different from the group 1 value.

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌の開始または発達を阻害するための方法であって、被験体に有効用量のニトロソフリーラジカル捕捉剤を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 2】

腫瘍の発達を阻害するための方法であって、被験体に有効用量のアリール N - アルキルニトロソフリーラジカル捕捉剤を経腸的に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 3】

癌の開始または発達を阻害するための方法であって、被験体に有効用量のニトロソフリーラジカル捕捉剤を食餌投与する工程を包含する、方法。

10

【請求項 4】

前記薬剤が、フェニル N - tert - ブチルニトロソ、3 - ヒドロキシフェニル N - tert - ブチルニトロソ、2 - ヒドロキシフェニル N - tert - ブチルニトロソ、2 - スルホキシフェニル N - tert - ブチルニトロソまたは 4 - ヒドロキシフェニル N - tert - ブチルニトロソである、請求項 1、2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記被験体が、癌の家族歴を有し、または発癌性の環境に曝された、請求項 1、2 または 3 に記載の方法。

【請求項 6】

腫瘍の発達を阻害するための方法であって、有効用量の 3 - ヒドロキシフェニル N - tert - ブチルニトロソまたは 4 - ヒドロキシフェニル N - tert - ブチルニトロソを経腸的に投与する工程を包含する、方法。

20

【請求項 7】

前記有効用量が、1 日当たり体重 1 kg につき約 5 ~ 約 60 mg である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

肝癌形成を阻害するための方法であって、被験体に有効用量のフェニル N - tert - ブチルニトロソ、3 - ヒドロキシフェニル N - tert - ブチルニトロソまたは 4 - ヒドロキシフェニル N - tert - ブチルニトロソの少なくとも 1 つを食餌投与する工程を包含する、方法。

30

【請求項 9】

前記食餌投与が、食物成分の補充による、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記被験体が、B 型肝炎ウイルスまたは C 型肝炎ウイルスに曝されたかまたは感染した、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記有効用量が、投与される食餌の約 0.005 w/w % ~ 約 0.1 w/w % である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

抗発癌性食餌の調製に使用するためのニトロソフリーラジカル捕捉剤。

40

【請求項 13】

抗発癌性食餌の調製に使用するためのアリール N - アルキルニトロソフリーラジカル捕捉剤。

【請求項 14】

抗発癌性食餌の調製に使用するための 3 - ヒドロキシフェニル N - tert - ブチルニトロソまたは 4 - ヒドロキシフェニル N - tert - ブチルニトロソ。

【請求項 15】

抗発癌性食餌の調製に使用するためのフェニル N - tert - ブチルニトロソ、3 - ヒドロキシフェニル N - tert - ブチルニトロソ、2 - ヒドロキシフェニル N - tert - ブチルニトロソ、2 - スルホキシフェニル N - tert - ブチルニトロソまたは 4 - ヒド

50

ロキシフェニル N - t e r t - ブチルニトロンの少なくとも 1 つ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の相互参照)

2000年3月30日に提出された米国仮出願第60/193,572号からの優先権を主張し、そして本明細書で参考として援用する。

【0002】

(連邦に資金援助された研究または開発に関する記述)

米国連邦政府は、National Institutes of Health Grants NS35747、PO1-AG05119、5P50-AG05144および R01 CA82506によって部分的に支持される範囲で、本発明において権利を有する。

【0003】

(背景)

発癌物質を含まないコリン - 欠乏 - L - アミノ酸 - 限定 (C D A A) 食餌の長期の給餌は、ラットにおいて、肝細胞の死および再生の繰り返しならびに線維症が背景に存在する、明らかに新生物発生前の局所的病変の発達を通じて強い肝臓癌誘発性を及ぼす。酸化ストレスは、種々のシグナル分子の状態の改変と関連するその元にある機構において、主な役割を果たすと考えられる。ラジカル捕捉剤のフェニル N - t e r t - ブチルニトン (P B N) は、この食餌の肝臓癌発達の初期において、シクロオキシゲナーゼ活性および線維発生を誘導し得る酸化ストレスを明らかに阻害することによって、新生物発生前の病変の発達を阻害することが示された (F l o y d ら、1998)。

【0004】

活性酸素種 (R O S) は、何年もの間、癌の発達に関係すると考えられている。R O S が強く関連するとされた第一の例は、ラットヘコリン欠乏 (C D) 食餌を給餌することが、任意の外因性の公知の発癌物質に全く曝すことなく、肝細胞癌 (H C C) の発達を生じるモデル系である。このモデルを使用して、本発明は、癌の開始および発達において重要であることが示された、鍵となるシグナル伝達経路と R O S を関連付けることを可能にする新規の所見に関する。本発明者らは、C D 肝臓からのミトコンドリアが変化し、その結果 H_2O_2 生成の有意に高い収量をもたらすことを示した。さらに、本発明者らは、初めて P B N (- フェニル - t e r t - ブチルニトン) およびその誘導体がニトロンを基本とするフリーラジカル捕捉剤でありそして、化合物のとても低いレベルでの新生物発生前の結節の発達を有意に減少させそして肝細胞癌 (H C C) の形成を阻害することを示した。P B N 等は、これまでこのモデル中で研究された最も強力な抗発癌物質である。これらの所見を理解するために、本発明者らは、C D 処置が、ミトコンドリア膜における変化を仲介してその結果 H_2O_2 の増強されたレベルを生成し、そして P B N 等が、複合体 I にて作用することによって過剰な H_2O_2 の生成を有意に阻害することを前提とする。本発明者らはさらに、そのホスファターゼ活性の喪失を生じ、それによってアポトーシス仲介プロセスにおける減少を生じるが腫瘍形成事象における増加を生じる A K T キナーゼ経路の、活性化へのシフトを仲介する P T E N 腫瘍抑制タンパク質の増強された不活性化を、過剰な H_2O_2 が、引き起こすことを前提とする。本発明者らはまた、C D 肝臓において発達する新生物発生前の結節中の細胞が、過剰な H_2O_2 および特定の増殖因子 (T G F β_1 が最もあり得る) の作用の結果、腫瘍形成 (アポトーシスとは逆に) へ傾き、そして過剰の H_2O_2 の生成の阻害を通じて、およびまた増強されたシグナル伝達プロセスの抑制によっての両方で、P B N 等がこれらのプロセスを改変すると提案する。本発明者らは、P B N 等が新生物発生前の結節の細胞に作用して、腫瘍の発達の阻害を生じるアポトーシスプロセスに傾くようにすると考える。

【0005】

(P B N の薬理的作用の研究) 化合物 P B N は、1950年代に最初に合成されたが、1968年に化学反応においてフリーラジカルを捕捉しかつ安定化するために非常に有用で

あることが発見され、それによってスピントラップ (spin-trap) と命名された (Janzen 1971)。PBNは、プロトタイプのスピントラップであるが、他のいくつかのニトロ化合物が合成され、化学反応においてフリーラジカルを捕捉しかつ特徴付けるために有用であることが見出された。これらのスピントラップは、最初化学反応において使用されたが、1970年代中期に生化学的系および生物学的系においてフリーラジカルを捕捉するために使用され始めた (例えば、Floydら 1978; およびPoyerら 1978)。薬物動態研究は、PBNが容易かつ迅速に全ての組織にほぼ同等に分散され、約132分のラットにおける半減期を有し、そして大部分が尿中に排泄されることを示した。比較的少数の代謝研究がなされたが、化合物のいくつかの環の水酸化 (主にパラの位置における) が肝臓中で生じることが公知である。Novelliは、PBNを使用して敗血性ショックから実験動物を保護し得ることを最初に示し (Novelliら 1986)、そして確かにこれが他のグループによって後に確認された (Pogrebniakら、1992)。薬物動態薬剤としてのPBNおよび誘導体の使用は、1988年の発見の後に開始され、PBNが実験的脳卒中モデルにおいて神経保護的活性を有することが示された (Floyd 1990; Floydら 1996; およびCarneyら 1991)。これらの結果は、繰り返されそして展開された (すなわち、例えば、参照Cloughら 1991; Caoら 1994; Folbergrovaら 1995; Pahlmarkら 1996を参照のこと)。本発明者らは、PBNおよび誘導体に関する広範囲の神経保護的薬理学的研究を要約する (Floyd 1997; Hensleyら 1996)。神経変性疾患に加えて、PBNは、糖尿病および他の多くの状態を含むROS媒介プロセスが関与する他の病理学的状態において保護することが示された。PBNおよびその誘導体のいくつかの実験的卒中および他のいくつかの神経変性モデルにおいて非常に神経保護的である理由の機構的基礎は、いまだ完全には解明されていない。しかし、その作用は、そのフリーラジカルを捕捉する能力によって簡単に説明され得ないことは明らかである。実際、PBNの作用の機構的基礎に関する本発明者らの研究は今、PBNが遺伝子の誘導を抑制することによって (Floyd 1997; Hensleyら 1996; Miyajimaら 1995; Tabatabaieら 1996; およびHensleyら 1997)、最もおそらくは酸化感受性シグナル伝達プロセスに作用することによって (Robinsonら 1999)、作用することを示した。実際、PBNは、ミトコンドリアによるシグナル伝達増強ROS形成を抑制することによって作用すると考えられる (Hensleyら 1998)。これらの発見および考えは、神経変性プロセスの研究から持ち上がった。しかし、PBNのCD発癌を防ぐ作用は、この神経変性疾患モデルにおいて見出されるものとは異なり得ることが強調される。作用の特定の機構は、本発明を限定しない。

10

20

30

40

50

【0006】

(PBNは、コリン欠乏モデルにおいて保護的である)

初期の研究は、飲料水中に投与されたPBNが、CDモデルにおいて非常に保護的であったことを示した。この結果は、処置の12週間後に評価された (Nakaeら 1998)。この研究は、いくつかの重要な点を引き出した。(1) PBNは、最も低いレベルでさえ、新生物の結節の大きさを大幅に減少させた (それぞれ6、30および60 mg/kg - 日のCDAA + PBN処理に対して、CDAAのみにおける1.92 mm³ から0.33、0.17および0.10 mm³ へ、Nakaeら 1998の表1を参照のこと)。

【0007】

PBNの、結節の数への影響はあまりなかった、すなわち、それぞれ6、30および60 mg/kg - 日に対して、CDAAのみの1 mm³ 当たり190から、170、149および142へ (Nakaeら、1998の表1を参照のこと)。(2) PBNは、結合組織の増殖を有意に減少させた。(3) PBNの濃度の増大は、8-OHdG量 (DNAの酸化のマーカー) をCD肝臓において減少させた。(4) PBNは、CD肝臓中のPGE₂ の量を、最も高い投与量で約50%減少させたが、mRNAレベルまたはタンパク質レ

ベルのどちらでもC O X - I Iの発現に影響しなかった。次に要約すると、非常に低いレベルのP B Nが、結節の大きさを83%減少させるが、結節の数は11%しか減少させないという事実は、本発明者らに結節の大きさがP B N処理に対して最も感受性のパラメーターであることを示す。P B Nの最も高いレベルでのみP G E₂レベルにいくぶんか影響したが、これはおそらく、酵素それ自体の触媒的阻害剤としての作用に関係がある。

【0008】

C D A Aモデルにおいて試験された他の化学物質と比較してP B Nの効力を強調するために、N a k a e - K o n i s h iグループによって得られた結果を比較することが有益である(M i z u m o t oら 1994; E n d o hら 1996; およびN a k a e 1999)。このデータは、P B Nが、新生物発生前の結節の大きさを減少させ、そして8-O H d G量における増加を妨げる点において、C D A A処置において試験された最も効果的な化合物であることを明らかに示す。このP B Nの結節の大きさに対する効果は、その多くがフリーラジカルの除去剤である他の阻害剤の匹敵する量よりはるかに強力である。高いレベルではあるが、いくぶんかの影響を有すると考えられる他の化合物は、ノルジヒドログアイアル酸(n o r d i h y d r o g u a i a r i c a c i d)(N G D A)およびC V 3 6 1 1だけである。C V 3 6 1 1は、アスコルビン酸の脂肪酸エステルである。N G D Aは、0.1%のレベルで結節の大きさを39%低下させ、そしてC V 3 6 1 1は、0.05%のレベルで44%の低下を生じた。対照的に、最も低いレベルの量でのP B N(6 m g / k g)は、83%減少した;そして最も高いレベルで95%減少した結節の大きさを生じた。N G D Aは、その既知のリボキシゲナーゼ活性の阻害のために試験されたが、これはまた、チロシンキナーゼに拮抗することが最近示された(H e n s l e y 1998)。B P B(p - ブロモフェノシブロミド(b r o m o p h e n o c y b r o m i d e))は、ホスホリパーゼA₂活性の阻害剤として使用されたが、データが示すように、この化合物は、結節の大きさの抑制における活性がほとんどない(E n d o h 1996)。アセチルサリチル酸は、結節の大きさおよび結節の数ならびに8-O H d G量に対していくぶんかの効果を有した(しかしP B Nの効力には遠く及ばない)(E n d o h 1999)。彼らによって研究された トコフェロールおよびアスコルビン酸ならびにトロロックス(t r o l o x)が研究され、どのパラメーターに対してもほとんど効果を有しなかった(M i z u m o t oら、1994)。脂肪肝の発達に対して任意の効果を有する阻害剤は、たとえあるとしても、なかったこともまた留意されるべきである。このモデルにおける種々の抗酸化剤の効果の広範な多様性および脂肪肝の発達に対する影響の欠如は、一貫性のある発見であると考えられる。適切な特筆すべき点としては、C D A Aモデルにおけるその作用と対比してラット肝臓ミクロソームにおける脂質の過酸化を阻害する化合物の抗酸化効果が挙げられる。J a n z e nら 1994によって収集されたデータは、トロロックスおよびB H Tがラットの肝臓ミクロソームの過酸化を阻害する能力において、全く特筆すべき活性を示した(それぞれ40 μ Mおよび6 μ MのI C₅₀)、一方、P B Nは、約1 / 1000効果的であった(I C₅₀ = 5 m M)ことを実証する。しかし、P B Nは、C D A Aモデルにおいて非常に効果的である(N a k a eら 1998)が、B H Tおよびトロロックスはそうではない(G h o s h a lら 1990; M i z u m o t oら 1994)。この比較は、C D A Aモデルにおける阻害剤の作用が、その抗酸化またはラジカル除去特性のみによって簡単に説明され得ないという点を十分に例示する。

【0009】

初期の研究は、新生物発生前の結節の病変の出現とC D A A食餌のラットにおけるP B Nの存在または不在との間の関連の可能性を示してきたが、当業者は、これらの新生物発生前の結節の病変は、依存的に隣接する癌の発達を予測可能にしないと理解する。本発明は、P B Nおよびその誘導体のようなニトロ還元剤が、実際の癌性病変の発達の阻害に実際に効果的であることを確立する。当業者は、この発見が今日の主要な健康問題のひとつに対する重大な意味を有することを理解する。

【0010】

10

20

30

40

50

(発明の要旨)

本発明は、癌の開始または発達、あるいは腫瘍の発達を阻害するための方法を含む。この方法は、有効用量のニトロソフリーラジカル捕捉剤を経腸的に投与することを包含する。この投与は、好ましくは食物または飲料の供給によって経腸的である。好ましいニトロソは、アリール N - アルキルニトロソである。このアルキルは、第三級 (t e r t) ブチルであるが、他のアルキル、シクロアルキル等も使用され得る。好ましいアリールは、フェニル、3 - ヒドロキシフェニルおよび 4 - ヒドロキシフェニル等である。新規アリールおよびアルキルの両方は、一旦当業者が、効果的なニトロソを同定し、最適な用量送達ならびにタイミングスケジュールを見出すために、本明細書中に記載されたように試験を実施すると、使用され得る。被験体に対するニトロソフリーラジカル捕捉剤の有効用量を投与する食餌は、他の経路が特定の状況において効果的であることが見出され得るが、好ましい投与経路である。

【 0 0 1 1 】

本発明は、より好ましくは、癌を予防するかまたは阻害するのに有効な用量の 3 - ヒドロキシフェニル N - t e r t - ブチルニトロソまたは 4 - ヒドロキシフェニル N - t e r t - ブチルニトロソを経腸的に投与することを包含する方法を含む。ほとんどの場合、有効用量は、1 日当たり体重 1 k g につき約 0 . 5 m g から約 6 0 m g である。ひとつの好ましい実施形態において、本発明は、肝臓癌形成を阻害するための方法、フェニル N - t e r t - ブチルニトロソ、3 - ヒドロキシフェニル N - t e r t - ブチルニトロソまたは 4 - ヒドロキシフェニル N - t e r t - ブチルニトロソの少なくともひとつの有効用量を被験体に食餌で投与することを包含する方法を含む。処置される被験体は、前立腺癌、乳癌、肝臓癌または他の癌のような癌の家族歴を有する被験体を含み、そして例えば、過剰の紫外線照射、放射線、食物への発癌物質の混入などの発癌性の環境に曝されたと考えられる被験体を含む。食餌投与が食物成分の補充による場合、有効なニトロソ含有量は、投与される食餌の約 0 . 0 0 5 w / w % から約 0 . 1 w / w % であり得る。

【 0 0 1 2 】

P B N およびその化学的誘導体がおそらく活性である他の腫瘍モデルとしては、B 型肝炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルスからの感染によって引き起こされた H C C の発達が挙げられる。ヒトを悩ませる多くの腫瘍は、新生物発生前の結節の段階を通じて進行し、そして証拠は、R O S または R O S 形成を悪化させる状態が、腫瘍の発達において重要であることを示す。従って、本発明者らは、多くのヒト腫瘍の発達はおそらく、P B N またはその効果的な化学的誘導体のひとつを非常に低いレベルで (おそらく 1 日当たり 1 m g 以下で) 毎日投与することによって抑え得ると考える。

【 0 0 1 3 】

本発明はまた、抗発癌性食餌の調製およびこのような補助食餌の調製に使用するためのニトロソフリーラジカル捕捉剤を含む。アリール N - アルキルニトロソフリーラジカル捕捉剤はまた、抗発癌性食餌の調製における使用のために好ましい。最も好ましいニトロソは、抗発癌性食餌の調製における使用のために別個にまたは組み合わせられる、3 - ヒドロキシフェニル N - t e r t - ブチルニトロソおよび 4 - ヒドロキシフェニル N - t e r t - ブチルニトロソである。

【 0 0 1 4 】

初期の研究は、C D A A 食餌に対するラットにおける新生物発生前の結節性病変の出現と P B N の存在または不在との間に関連がある可能性を示したが、当業者は、これらの新生物発生前の結節性病変は、明らかな癌の発達を依存的に予測可能ではないと理解した。本発明は、P B N およびその誘導体のようなニトロソ還元剤が、実際の癌性病変の発達の阻害に実際に効果的であることを確立する。当業者は、この発見が今日の主要な健康問題のひとつに対する重大な含蓄を有することを理解する。

【 0 0 1 5 】

P B N (またはその強力な誘導体) が、明らかな腫瘍の発達の防止に活性であると予測される例は、肝臓における腫瘍に加えて、胃、結腸、胸部、脾臓、前立腺、皮膚、頭頸部な

らびに血流を含むほとんどの器官において発達する腫瘍を含んだ。

【0016】

本発明はまた、抗発癌性食餌の調製およびこのような補助食餌の調製に使用するためのニトロフリースラジカル捕捉剤を含む。アリールN-アルキルニトロフリースラジカル捕捉剤はまた、抗発癌性食餌の調製における使用のために好ましい。より好ましいニトロンは、抗発癌性食餌の調製における使用のために別個にまたは組み合わされる、3-ヒドロキシフェニルN-tert-ブチルニトロン、2-ヒドロキシフェニルN-tert-ブチルニトロン、2-スルホキシフェニルN-tert-ブチルニトロンおよび4-ヒドロキシフェニルN-tert-ブチルニトロンである。

【0017】

10

(発明の詳細な説明)

本発明は、例えば、C D A A食餌を給餌された動物における、肝細胞癌(H C C)の発達に対するP B Nおよびその誘導体のインヒビターに関する。本発明はまた、P B Nおよびその誘導体がC D A A食餌の長期の給餌によって誘導されるH C Cの発達を効果的に阻害することの提示に関する。P B Nおよびその誘導体のこの化学予防作用は、食餌による肝癌形成の、早期におけるH C Aを含む新生物発生前の病変の発達の妨害、および後期におけるH C Cへの病変の進行の防止の両方の結果であると示唆される。

【0018】

C DモデルにおけるP B Nの効果(飲料水中の場合)の長期(70週間)の研究から最近収集されたデータは、P B Nが明らかなH C C形成を完全に阻害し、そしてP B N自体は発癌性ではないことを実証した。P B Nは、この特定のモデルにおいてこのようにこれまでに試験された最も効果的な抗発癌性化合物である。追試の研究において、本発明者らは、4-ヒドロキシP B N(4-OH-P B N)が食餌中に投与された場合、親の化合物よりもさらに効果的な抗発癌物質であることを見出した。従って、P B N、ならびに4-OH-P B N、3-OH-P B N、2-OH-P B Nおよび2-S P B N(2スルホキシP B N)は、食餌中に投与された場合、ラットにおけるC D仲介性の肝細胞癌の発達を阻害する。

20

【0019】

本明細書中に使用される略語は、以下のものである：P B N、フェニルN-tert-ブチルニトロン；i N O S、誘導性一酸化窒素シンターゼ；N F-B、核因子-B；C O X 2、誘導性シクロオキシゲナーゼ；C D A A食餌、コリン欠乏のL-アミノ酸限定食餌；G S T-P、胎盤型グルタチオンS-トランスフェラーゼ；H C C、肝細胞癌；H C A、肝細胞線腫；C S A A食餌、コリン補給のL-アミノ酸限定食餌；i N O S、誘導性一酸化窒素シンターゼ；C O X、シクロオキシゲナーゼ。

30

【0020】

以下の実施例はさらに、好ましいバージョンおよびこれを作製する方法を含む本発明のモデル実施形態を例示する；しかし、これらの実施例は、本発明の制限として解釈されるべきではない。

【0021】

40

(実施例1)

本実施例は、70週間、コリン欠乏のL-アミノ酸限定(C D A A)食餌を給餌された雄性W i s t a rラットにおける肝発癌に対する、ラジカル捕捉剤のフェニルN-tert-ブチルニトロン(P B N)の効果を示す。肝細胞線腫(H C A)および肝細胞癌(H C C)は、70週間の連続したC D A A食餌の給餌によって、57.1%の発生率で誘導された。実験期間を通じてC D A A食餌とともに0.065%の濃度で飲料水中に投与されたP B Nで、H C A発生率およびH C C発生率の両方が25.0%に減少した。最初の26週間のP B N、次に44週間のピヒクル飲料水がC D A A食餌と共に投与された場合、H C A発生率およびH C C発生率の両方が、それぞれ28.6%および0%に減少した。対照的に、26週間のピヒクル飲料水、次に最後の44週間のP B NがC D A A食餌と共に投与された場合、H C C発生率は0%に減少したが、H C A発生率は62.5%と高い

50

ままであった。これらの結果は、PBNがCDA食餌を給餌されたラットにおいて、肝発癌を阻害することを示した。後期におけるHCAからHCCへの変換のPBNによるこの阻害は、HCCの発達の防止において特に重要である。

【0022】

PBNは、強力な抗酸化活性を有するニトロンを基本とするラジカル捕捉剤である(Kotake 1999)。さらに、PBNは、インピボおよびノまたはインピトロの場合に、iNOSの誘導の阻害によって抗ニトロソ化効果を発揮し、そして種々のシグナル伝達分子(例えば、NF- κ B、前炎症性サイトカイン、COX2ならびに前アポトーシス遺伝子産物)の状態に対する改変を防止することが示された(Kotake 1999)。これらの特性を反映して、PBNは、動物の種々の障害(例えば、酸化的ストレスおよびニトロソ化的ストレスによって媒介され、そしてシグナル伝達を変更する、内毒素性ショック、虚血-再灌流損傷、神経変性疾患および糖尿病)に対して予防的である(Kotake 1999)。

10

【0023】

CDA食餌の長期の給餌は、その内因性の機構に起因して、(任意の公知の発癌物質なしで)1年以内にHCCの高い発生率を誘導する(Nakaeら 1992; Nakae 1999; Nakae 2000)。このモデルにおいて、HCCは、GST-P陽性の細胞が変化した病巣(foci of cellular alteration)、そして次に肝細胞の連続する死および増殖、ならびに肝硬変を生じる線維症が存在する背景下でのHCAを通じて誘導される(Nakae 1999)。

20

【0024】

以前の報告において、本発明者らは、PBNが、肝細胞の核DNAに対する酸化的損傷の阻害および触媒レベルでのCOX2活性の阻害に起因して、CDA食餌を給餌されたラットの肝臓における細胞が変化したGST-P陽性病巣の誘導および増殖を阻害することを実証した(Nakaeら 1998)。これらの発見を展開して、本研究は、HCCを終点マーカーとして使用して、CDA食餌を給餌されたラットにおける肝発癌全体に対するPBNの効果を評価する。

【0025】

(材料および方法)

(動物、食餌および化学物質)このプロトコールは、実験に先立って、日本政府の動物の保護および管理に関する法律第105号および日本政府の実験動物の飼育および補完に関する告示第6号に従った動物実験に関するガイドラインに従い、奈良大学の動物実験委員会によって承認された。6週齢の雄性Wistarラットは、Japan SLC、Inc.、(日本国静岡県浜松市)から購入した。ラットは、5匹ごとにプラスチックのケージに入れ、白色フレック床敷き(Kansai Animal Corp.、日本国京都市)と共に、空調室で飼育した(温度 25 ± 3 、相対湿度 $55 \pm 8\%$ 、10~12/時間の換気および12時間の暗/明サイクル)。ラットを、基本的な食餌(CE-1、Clea Japan、日本国東京都目黒区)に対する1週間の順応後、実験に使用し、そして順応期間および実験期間の間中、食物および飲み水は、自由に与えた。体重、食物消費および水の摂取を毎週モニターした。CDA食餌およびコントロールのCSA食餌は、Dyets Inc.、Bethlehem、PAから取得した。PBNを、本発明者らの研究室のJanzenおよびHaire(Janzenら 1990)の方法に従って合成し、99.997%の純度まで精製した。

30

40

【0026】

(予備研究)予備研究を、CDA食餌を給餌されたラットにおいて肝発癌の後期が開始する時点を決断するために実施した。20匹のラットの群に、16週間CDA食餌を給餌し、そして10匹の動物を屠殺した。次いで残りの10匹のラットに54週間CSA食餌を給餌し、そして開始後70週間で軽いエーテル麻酔下での全採血によって屠殺した。20匹のラットの他の群に、26週間CDA食餌を給餌し、そして10匹の動物を屠殺した。次いで、残りの10匹のラットに、44週間CSA食餌を給餌し、そして開始

50

後70週間で屠殺した。この屠殺に際し、肝臓を採取し、そして4 μ mの厚さの、10%中性緩衝化ホルマリン固定(24時間)し、パラフィン包埋した検体を調製し、そしてH & E手順によって慣用的に染色した。この肝臓検体を、文献に記載された基準に従って組織学的に試験した(Maronpotら 1996)。

【0027】

(主研究)合計60匹のラットを、6群に均等に分配した。第1群は、C D A A食餌を70週間受けた。第2群は、飲料水中の0.065%の濃度のP B Nと共に70週間C D A A食餌を受けた。第3群は、26週間P B Nと共にC D A A食餌を受け、次いで44週間C D A A食餌のみを受けた。第4群は、26週間C D A A食餌のみ受け、次いで44週間P B Nと共にC D A Aを受けた。第5群および第6群は、それぞれC S A A食餌のみおよびP B NとC S A A食餌を70週間受けた。このP B N用量は、本発明者らの先の報告に基づいて決定した(Nakaeら 1998)。第3群および第4群において処置が変更される、開始後26週間目の時点は、予備研究の結果に従って決定した(以下の結果および考察の節を参照のこと)。生存する全てのラットを、開始後70週間目に屠殺し、そして肝臓を採取した。2つの連続した4 μ mの厚さの、10%中性緩衝化ホルマリン固定(24時間)し、パラフィン包埋した肝臓検体を調製し、そして慣用的なH & E手順およびマッソン三色手順によって染色した。このH & E染色した肝臓検体を、前述の基準(Maronpotら 1986)に従って組織学的に試験し、そしてH C AおよびH C Cの発生率を決定した。線維症の度合いは、マッソン三色染色された肝臓検体におけるコラーゲン線維によって占有される面積の百分率を、I P A P画像分析システム(Sumika Technoservice、Corp.、日本国大阪府大阪市)を使用して分析することによって評価した。

10

20

【0028】

(統計的分析)統計的分析を、InStatソフトウェア(GraphPad Software、Inc.、San Diego、CA)を使用して実行した。フィッシャーの直接確率検定を使用して、群の間の病変発生率の差異の統計的有意性を評価した。Student-Newman-Keulsの複数比較検定を、群の平均値間の偏差を決定する一方向(one-way)のANOVOの後に群の間の平均値の差異の統計的有意性を評価するために使用し、続いて分散の均等性を決定するためにBartlett's検定を使用した。

30

【0029】

予備研究において、細胞が変化した病巣は、16週間C D A A食餌で給餌された全てのラットの肝臓において誘導され、そしてこれらの病変は続く54週間のC S A A食餌の給餌の後でさえも持続した。H C AまたはH C Cは、これらのいずれのラットにおいても観察されなかった。雄性Fischer 344ラットを使用して、細胞が変化した病巣は24週間のC D A A食餌の給餌、そして28週間のC S A A食餌の給餌によって誘導されるが、H C AまたはH C Cは誘導されないことが、同様に示された(Nakaeら 1992)。16~24週間の期間は、H C AまたはH C Cを誘導するために十分ではないが、それ自体を持続性に維持するが追加的発癌性刺激がない下では進行した形態に変換する能力を有さない細胞が変化した病巣を誘導するためには十分であることが示唆される。対照的に、H C Aは、26週間のC D A A食餌の給餌の後、10匹のラットのうち2匹において誘導された(発生率20%)。26週間のC D A A食餌次いで44週間のC S A A食餌が給餌された場合、H C Aを、10匹のラットのうち2匹において観察した(発生率20%)。これらの結果は、少なくとも26週間のC D A A食餌の長期の給餌がH C Aを誘導し、そしてH C Cが追加的発癌性刺激がなくても後に誘導されることを実証する。予備研究のこれらの結果は、ラット肝発癌の後期が、C D A A食餌の給餌の開始後26週間で開始し得ることを示唆する。

40

【0030】

主研究のこの結果を、図1の表中に要約する。3匹、2匹、3匹および2匹のラットが、それぞれ、第1、2、3および4群において死亡した。第5および6群においては、全て

50

のラットが生存した。食物消費または水の摂取の点では、群の間に差異はなかった。第5群の最終体重および相対的な肝臓の重量は、それぞれ、第1群のものよりも高くそして低かった。PBNのこの投与は、第2、3、4および6群においては、最終体重または相対的な肝臓の重量に影響しなかった。第1群において、これらの肝臓は、巨視的には黄色がかった白色であり、そして濁りかつ暗い色の数個の大きい腫瘍と関連して硬変を呈した。組織学的には、HCAおよびHCCは、どちらも7匹のラットのうち4匹において観察されたが（発生率57.1%）、全てのラットが脂肪肝および肝硬変を示し、肝臓検体の13.32%はコラーゲン線維によって占有された。第2群において、これらの肝臓は、巨視的には茶色がかった紫色であり、そして比較的滑らかな表面を有した。組織学的には、HCAおよびHCCは、両方とも第2群の8匹のラットのうち2匹においてのみ観察されたが（発生率25.0%）、これらの発生率は、第1群の値よりも有意に小さかった。脂肪肝は、なお明白であったが、線維症は大幅に減少し、線維によって占有された肝臓検体はほんの9.95%であった。これは、第1群の値よりも有意に小さかった。第3群において、これらの肝臓の巨視的および組織学的特徴は、第2群の特徴に類似であった。HCAおよびHCCは、それぞれ、7匹のラットのうち2匹（発生率28.6%）および0匹（発生率0%）において観察され、そして肝臓検体の8.71%が線維によって占有された。これらの発生率および線維症の度合いは全て、第1群の値よりも有意に小さかった。第4群において、これらの肝臓は、巨視的にはほとんど第1群のものに類似のように見えたが、大きな腫瘍を欠いていた。組織学的には、HCAは8匹のラットのうち5匹において（発生率62.5%）脂肪肝および肝硬変を伴って観察され、肝臓検体の12.86%が線維によって占有された。これらは全て第1群と同じ範囲内であった。しかし、HCCは、組織学的には観察されず（発生率0%）、この発生率は、第1群の値よりも有意に小さかった。顕著な巨視的または組織学的変化は、第5または6群の肝臓中には検出されず、そしてHCAおよびHCCの発生率（どちらも0%）および線維症の度合い（1.61%）は全て、第1群の値よりも有意に小さかった。これらの結果は、PBNがCDA食餌を給餌されたラットの肝臓におけるHCCの誘導を阻害することを明らかに示す。PBNのこのような阻害効果は、HCA発達の防止（最初の26週間のみ投与されたPBNによってHCAの発達は減少しHCCは発達しないので）、およびHCAのHCCへの変換の防止（HCA発生率の変更を伴わずにHCCが発達しないので）の両方に起因すると示唆される。

10

20

30

【0031】

本発明者らの以前の報告は、PBNが、12週間のCDA食餌の給餌による細胞変化のGST-P陽性病巣の誘導および、より顕著には、増殖を阻害し、これが酸化ストレスおよびCOX2活性の阻害に寄与することを実証する（Nakaeら 1998）。活性酸素種およびCOX2の役割は、CDA食餌を給餌されたラットにおける肝癌形成の早期において十分に示されたが、種々の他の因子もまた、関与すると示唆された（Nakae 1999；およびNakae 2000）。iNOS誘導およびNF- κ B活性化の両方の阻害剤である1'-アセトキシカピコールアセテートおよびPBN（Kotake 1999；Ohataら 1998）が、GST-P陽性細胞変化の病巣の誘導を阻害するので、活性酸素種、およびNF- κ Bのような転写因子が関与し得る（Nakae 1999；Nakae 2000；およびNakae 1998）。一方、種々のシグナル伝達の変化は、半精製コリン欠乏食餌（Zeisel）を給餌されたラットの肝臓において誘導される。本発明者らは、12週間のCDA食餌の給餌の間、ラットの肝臓においてNF- κ B、カスパーゼ-1および種々のサイトカインの蓄積または変化した状態をも示した（Nakae 1999）。このような変化もまた、PBNがこれらの変化を正常化し得るので、この肝癌形成の早期において関与し得る（Kotake 1999）。線維症に関連するシグナルもまた、関与し得る。なぜなら、活性酸素種および種々のシグナル伝達分子が、CDA食餌を給餌されたラットの肝臓における線維症ならびに細胞変化のGST-P陽性病巣の両方の誘導を阻害する、肝臓星状細胞の活性化、増殖および機能に関与するからである（Sakaidaら 1996；Sakaidaら 1998）

40

50

。非ステロイド性抗炎症薬剤のN-(4-ヒドロキシフェニル)レチナミド(*retinamide*)およびPBNは、細胞変化のGST-P陽性病巣の誘導および増殖の阻害と共に、線維症の誘導を阻害する(Nakae 1999; Nakae 2000; および Nakaeら 1998)。本結果は、線維性のプロセスもまた、早期のHCAの誘導に関与し、そしてPBNによって阻害され得るが、肝硬変自体の存在が、後期におけるHCCへのHCAの変換に影響しないかもしれないことを示唆する。考え合わせると、CDA食餌を給餌されたラットにおける肝癌形成の早期におけるPBNの阻害的効果は、広範囲のシグナル伝達経路の調節から生じることが示唆される。

【0032】

CDA食餌を給餌されたラットにおける肝癌形成の後期の下にある機構に関してはほとんど解明されていないが、癌遺伝子の低メチル化は、コリンおよび複数のメチル基給与体(リポトロブ(*lipotrope*))の欠乏した食餌に起因するラットの肝癌形成における重要な因子の1つであると、長く考えられてきた(Poirierら 1994; および Chrisman 1995)。本発明者らは最近、*c-myc*遺伝子の5'隣接領域が低メチル化され、これが、CDA食餌を給餌されたラットにおいて、HCC(HCAではなく)における*c-myc*遺伝子のmRNAの過剰発現を生じること示した(Tsujiachiら 1995)。*c-myc*遺伝子の低メチル化は、HCAから変換したHCCによる悪性腫瘍の獲得において役割を果たすことが考えられる。活性酸素種は、転写因子介入下のDNAメチル化パターンにおける後成的な変化を生じる(Chrisman 1995; および Cerdraら 1997)。PBNは、酸化ストレスおよび転写因子の活性化に対する阻害能によって、異常なDNAメチル化パターンの形成を妨げ得(Kotake 1999)、そして次にHCCへのHCAの変換を予防する。さらに、トランスフォーミング増殖因子-シグナル伝達経路は、CDA食餌の給餌によって誘導されたHCCにおいて変化される(Sasakiら 2001)。これは、CDA食餌を給餌されたラットにおける肝癌形成の後期の機構に関与する別の因子であり得、そしてPBNは、変化されたシグナル伝達を正常化する能力によってこのプロセスに影響し得る(Kotake 1999)。

【0033】

結論として、PBNは、HCA誘導だけでなく、HCAからHCCへの変換もまた阻害することによって、CDA食餌を給餌されたラットの肝臓におけるHCCの誘導に対して化学防御的である。さらなる研究は、広範な発癌発生に対するPBNの化学防御的効果を評価し、そしてPBNの癌化学防御的効果の下にある機構を解明するために、明らかに所望される。

【0034】

(実施例2)

本実施例は、ラジカル捕捉剤フェニルN-tert-ブチルニトロソ(PBN)の抗肝癌形成効果を示す以前の結果(Nakae, D.ら (1998))を拡張する。これは、コリン欠乏性の、L-アミノ酸限定(CDA)食餌を給餌されたラットにおける肝癌形成の早期に対するその誘導体の効果を試験することによる。6週齢の雄性Wistarラットを、CDA食餌単独または0.009%、0.045%または0.090%の濃度のPBN誘導体を含むCDA食餌で、16週間給餌した。グルタチオンS-トランスフェラーゼ胎盤型(GST-P)陽性の推定前新生物性病変の数は、最も高い用量のPBNによってのみ減少された。しかし、前新生物性病変の大きさおよび肝細胞の核外成分に対する酸化損傷は、全ての用量の4-ヒドロキシ-PBNならびに最も高い用量のPBNおよび3-ヒドロキシ-PBNによって減少された。4-ヒドロキシ-PBNおよび3-ヒドロキシ-PBNは、周辺組織におけるその阻害なしに、GST-P陽性病変において細胞のアポトーシスを増強した。4-ヒドロキシ-PBNだけが、GST-P陽性病変および周辺組織の両方において肝細胞の増殖を阻害した。2-ヒドロキシ-PBNも2-スルホキシ-PBNも、いかなるこれらの効果も及ぼさなかった。本結果は、PBN、4-ヒドロキシ-PBNおよび3-ヒドロキシ-PBNが前新生物性病変の増殖を阻害するこ

10

20

30

40

50

とを実証する。4 - ヒドロキシ - PBN は、PBN および 3 - ヒドロキシ - PBN より効果的であった。PBN の 4 - ヒドロキシ - PBN への代謝的変換が PBN の抗肝癌形成効果において重要な役割を果たすこと、および、PBN、4 - ヒドロキシ - PBN および 3 - ヒドロキシ - PBN が有用な癌の化学防御剤として役割を果たし得ることを示唆する。

【0035】

天然または合成の化学物質による化学防御は、発癌を遅延させるかまたは停止させることによる癌の潜在的制御において魅力的な注目点を有する (Chemoprevention Working Group 1999 ; および Hursting ら 1999)。発癌は、複数の工程のプロセスであり、そして従って、各工程において生じる事象が化学防御的化学物質についての標的であり得ることが提案された。有望な結果が、適切なインビボ動物モデルを使用する調査によって主に得られている (Chemoprevention Working Group 1999 ; および Hursting ら 1999)。

【0036】

フェニル N - tert - ブチルニトロソ (PBN) は、スピントラッピング技術によるラジカル種の検出に使用されている、ニトロソベースのフリーラジカル捕捉剤である。PBN は、酸化的ストレスおよびニトロソ化ストレスならびにシグナル伝達異常のインビトロおよびインビボでの阻害において、強力に効果的であることが示された (Kotake 1999)。ラットへの PBN の投与は、単一の優勢な代謝産物として 4 - ヒドロキシ - PBN (4 - OHPBN) を生じる (Reinke 2000)。PBN がインビボでラットに投与される場合、4 - OHPBN の遊離形態および結合形態が、肝臓組織において、ならびに胆汁、尿および血漿中において検出される (Reinke 2000)。従って、4 - OHPBN は、肝臓のミクロソームシステムにおいて形成される、PBN の主要な代謝産物であると考えられ、そしてその親化合物の薬理学的作用において重大な役割を果たすと考えられる (Kotake 1999 ; Reinke 2000)。しかし、4 - OHPBN の生物学的効果についてはほとんど知られていない。

【0037】

本発明者らは、PBN が、コリン欠乏性の、L - アミノ酸限定 (CDA) 食餌を給餌されたラットの肝臓において、グルタチオン S - トランスフェラーゼ胎盤型 (GST - P) 陽性の推定前新生物性病変の誘導、より顕著には、増殖を阻害することを以前に実証した。PBN は、肝細胞核 DNA に対する酸化的損傷を阻害し、そして誘導性シクロオキシゲナーゼ活性を抑制する (Nakae ら 1998)。しかし、PBN の抗肝癌形成機構の特定の作用は、いまだおおむね不明瞭なままである。本研究は、CDA 食餌中に PBN およびその誘導体を長期に給餌することによる、ラット肝癌形成の早期に対する 4 - OHPBN および他の誘導体の効果を試験することによって、本発明者らの PBN の抗肝癌形成効果に対する初期の知見を拡張するために実施した。

【0038】

(材料および方法)

(動物) 合計 110 匹の雄性 Wistar ラットを、Charles River Japan, Inc.、Atugi, Kanagawa, Japan から、5 週齢で得た。実験を、基本食餌 (CE - 2 食餌、Clea Japan, Meguro, Tokyo, Japan) に対する 1 週間の順化後に開始した。ラットを、標準雰囲気下 (温度 25 ± 3 ; 相対湿度 $55 \pm 8\%$; 10 ~ 15 回 / 時間の換気 ; および 12 時間の暗 / 明サイクル) の、白色フレーク床敷き (Kansai Animal Corp., City of Kyoto, Kyoto, Japan) を有するプラスチックケージに 5 匹ずつ置いた。食物および飲み水への自由な接触を、順化期間中および実験期間中、許容した。

【0039】

(食餌および化学物質) この CDA 食餌およびそのコントロールであるコリンを補充した L - アミノ酸限定 (CSA) 食餌 (Nakae ら 1992 ; Nakae ら 1990) を、Dyets Inc., Bethlehem, PA から得た。PBN、4 - OH

PBN、3-ヒドロキシ-PBN(3-OHPBN)および2-ヒドロキシ-PBN(2-OHPBN)を、本発明者らの研究室で合成し、そして99.997%の純度に精製した(Janzénら 1990)。2-スルホキシ-PBN(2-SPBN)を、Aldrich Chemical Co.(Milwaukee、WI)から購入した。

【0040】

(動物実験)順化後、ラットを、各5動物からなる22群に均等に分配した。第1群の動物は、CDA食餌のみを受容した。第2、3および4群は、0.009%、0.045%および0.090%の濃度(本明細書中以降、それぞれ、低用量、中用量および高用量という)でPBNを含むCDA食餌を受容した。第5~7、8~10、11~13および14~16群は、それぞれ、4-OHPBN、3-OHPBN、2-OHPBNおよび2-SPBNの低用量、中用量および高用量を含む、CDA食餌を受容した。第17群は、CSA食餌のみを受容した。第18、19、20、21および22群は、それぞれ、PBN、4-OHPBN、3-OHPBN、2-OHPBNおよび2-PBNの高用量を含む、CSA食餌を受容した。これらの化合物の用量を、PBNを飲料水中に投与した、本発明者らの以前の報告(Nakaeら 1998)に従って決定した。しかし、本実験においては、本発明者らは、PBNのヒドロキシ誘導体の限定された溶解性に起因して、食餌中にこれらの化合物を投与した。全ての動物を、開始後16週目で軽いエーテル麻酔下での瀉血によって屠殺し、そして肝臓を摘出した。肝臓の左葉、中葉および右葉から5mm厚のスライスを採取し、10%中性緩衝ホルマリンで24時間固定し、次いで、パラフィンに包埋した。5つの連続する4μm厚の切片を、各固定した肝臓スライスから調製し、そして以下に記載のような組織学的および免疫組織学的な評価のために使用した。これらの肝臓の残りの部分を、直ぐに液体窒素下で凍結し、使用するまで-80で貯蔵した。

10

20

【0041】

体重ならびに食物および水の摂取を、毎週モニターし、次いで、PBNおよびその誘導体の平均投与量を計算した。

【0042】

(組織学的および免疫組織学的評価)組織学的評価を、ヘマトキシリン/エオシン手順およびマッソン三色染色手順によって慣用的に染色した切片を使用して実施した。線維症の度合いを、第1、4、7、10、13、16および17群において、定量的に評価した。これは、IPAP画像分析システム(Sumika Technoservice、Corp.、City of Osaka、Osaka、Japan)を使用して、マッソン三色法によって青色に染色されたコラーゲン線維によって占有される面積の百分率を計算することによる。GST-P陽性病変を、免疫組織学的に可視化した。6より多い細胞からなる病変を、他に記載のように(Kishidaら 2000)、IPAPシステムを使用して定量化した。アポトーシスおよび細胞増殖活性の量を、それぞれ、第1、4、7、10、13、16および17群において、上述のGST-P免疫組織化学とインサイチュ末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介dUTPビオチンニックエンドラベリング法(Goldら 1994)を組み合わせた二重染色技術、および増殖中の細胞の核抗原に対する増強ポリマー工程染色(enhanced polymer one-step staining)法(Tsutsumiら 1995)を使用して決定した。GST-P陽性病変における1000~5000個の肝細胞および周辺組織における5000個の肝細胞中のアポトーシス性および増殖中の肝細胞の数を、光学顕微鏡下で計算してパーセンテージを得、これらを、それぞれ、本明細書中以降アポトーシス指標および増殖指標という。

30

40

【0043】

(酸化的肝細胞損傷の決定)肝細胞に対する酸化的損傷のレベルを、凍結肝臓サンプルについて決定した。核DNAに対する酸化的損傷を、10⁶のデオキシグアノシン(dG)に対する8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)の量の比をパラメーターとして使用して、上述のように評価した(Nakaeら 1995)。核外成分に対する酸

50

化的損傷を、タンパク質 1 ミリグラム当たりの 2 - チオバルビツール酸反応基質 (T B A R S) のピコモルマロンジアルデヒド等価物 (M D A e q .) レベルを決定することによって、他に記載のように評価した (N a k a e ら 1 9 9 0) 。

【 0 0 4 4 】

(統計) 群の平均間の偏差を決定するための分散の一方方向分析、それに続く、分散の等質性を決定するためのパートレットの検定後に使用した、ダネット (D u n e t t) 多重比較検定によって、 0 . 0 5 未満の p 値が得られた場合、複数の群に対する定量化データにおける群の間の差異は、有意であると認めた。データがガウスベル型分布または非ガウス分布を示した場合に、それぞれ、スチューデント t 検定またはウェルチ (W e l c h) t 検定によって 0 . 0 5 未満の p 値が得られた場合、特定の群の対に対するデータにおける群の間の差異を、有意であると見なした。

10

【 0 0 4 5 】

(結果)

(一般的発見) 全てのラットが、実験期間を通じて生存した。最終体重または平均食物摂取の点においては、群の間に差異はなかった (図 2 の表) 。コントロールの食餌を与えられたラット、すなわち、第 1 7 群の相対的な肝臓の重量は、 C D A A 食餌のラット (第 1 群) より低かった ; しかし、 P B N もその誘導体のいずれも、コントロールの食餌を受容した動物における肝臓の重量の有意な変更を生じなかった (図 2 の表) 。 P B N およびその誘導体の平均投与量は、化学物質間で差異を示さない投与の投与量と密接に関連した (図 2 の表) 。

20

【 0 0 4 6 】

(P B N およびその誘導体の G S T - P 陽性病変の数および大きさに対する効果) 新生物発生前の病変の数および大きさを、図 3 の表に要約した。 G S T - P 陽性病変を、第 1 ~ 1 6 群において観察した。第 1 7 ~ 2 2 群においては、病変は存在せず、従って、第 1 群のものより有意に低かった。 P B N は、最も高い投与量でのみ、病変の数を第 1 群の値の 5 2 % にまで有意に減少させた。 P B N およびその誘導体は、2 つの最も低いレベルでは、病変の数に対する影響を示さない。対照的に、病変の大きさを、高投与量の P B N 、 3 - O H P B N および 4 - O H P B N によって、第 1 群の値の 1 9 % および 9 % にまで有意に減少した。 4 - O H P B N は、最大の効果を及ぼした。低、中、および高投与量の 4 - O H P B N は、それぞれ、病変の大きさを第 1 群の値の 2 4 、 1 9 および 1 8 % にまで減少させた。最も低い投与量の 4 - O H P B N は、より高いその投与量と同様に効果的であり、そしてまた、 P B N および 3 - O H P B N の最も高い投与量と同様に効果的であった。 2 - O H P B N も 2 - S P B N も、病変の数および大きさに対していかなる影響も有しなかった。

30

【 0 0 4 7 】

(P B N およびその誘導体の酸化肝細胞損傷のレベルに対する効果) 8 - O H d G および T B A R S のデータをまた、図 3 の表に示す。第 1 7 群の 8 - O H d G の核 D N A 含有量は、第 1 群のものより有意に低かった。 P B N 、 4 - O H P B N および 3 - O H P B N の全ての投与量は、 C D A A 食餌の給餌によって生じた、増大した 8 - O H d G 含有量を有意に阻害した。これらの効果は、投与量依存性を欠き、そして 3 つの化学物質間の強度は、異ならなかった。 2 - O H P B N も 2 - S P B N も、第 1 群のものから 8 - O H d G のレベルを減少させなかった。どの化学物質も、コントロールの食餌の動物の 8 - O H d G 含有量に対していかなる影響も有さなかった。

40

【 0 0 4 8 】

第 1 7 群の T B A R S のレベルは、第 1 群のものよりも有意に低かった。 P B N および 3 - O H P B N の高投与量のみが C D A A 給餌によって生じた、増強されたレベルを有意に阻害したが、 4 - O H P B N の 3 つ全ての投与量は、有意に効果を及ぼした。 4 - O H P B N の低い投与量は、より高いその投与量ならびに P B N および 3 - O H P B N の高投与量同様に効果的であった。 2 - O H P B N も 2 - S P B N も、 T B A R S レベルに影響しなかった。 C S A A コントロール食餌が与えられた場合、どの化学物質も、いかなる影響

50

も有さなかった。

【0049】

(G S T - P 陽性病変および周辺組織における、P B Nおよびその誘導体の、肝細胞のアポトーシスおよび増殖に対する効果) G S T - P 陽性病変およびその周辺組織におけるアポトーシス指標および増殖指標を、図4の表に要約する。第17群の周辺組織におけるアポトーシス指標は、第1群のものより有意に低かった。このアポトーシス指標は、第1群の周辺組織においてよりも病変部において有意に低かった。P B N、4 - O H P B Nおよび3 - O H P B Nの高投与量は、病変部におけるアポトーシス指標を、第1群の値を約3 ~ 4倍上回って有意に増大させたが、周辺組織におけるこの指標を約40%にまで有意に減少させた。結果として、アポトーシス指標は、これらの群の周辺組織においてよりも病変部において有意に高くなった。効果の強度は、3つの化学物質間で有意には異ならなかった。2 - O H P B Nも2 - S P B Nも、アポトーシス指標を変更しなかった。

10

【0050】

第17群の周辺組織における増殖指標は、第1群のものより有意に低かった。この増殖指標は、第1群の周辺組織においてよりも病変部において有意に高かった。高投与量の4 - O H P B Nのみが、増殖指標を病変部において第1群の値の約31%にまで、周辺組織において第1群の値の約49%にまで、両方とも有意に減少させた。結果として、病変部における増殖指標は、第17群の周辺組織における増殖指標よりなお有意に高いが、これに近づいた。コントロールの群においては、他のどの化学物質も、増殖指標にいかなる影響も有さなかった。

20

【0051】

(P B Nおよびその誘導体の組織学的肝臓損傷に対する効果) 第1群において、広範囲な線維症を、脂肪肝に関連して組織学的に観察した。どの化学物質も、脂肪肝にいかなる影響も有さなかった。P B N、4 - O H P B Nおよび3 - O H P B Nは、線維症を阻害したが、2 - O H P B Nも2 - S P B Nも、阻害しなかった。第1、4、7、10、13、16および17群における線維症の度合いを、図4の表に要約する。第17群の値は、第1群の値より有意に低かった。P B N、4 - O H P B Nおよび3 - O H P B Nの高投与量は、線維症の度合いにおいて第1群の値から有意に低かった。この効果の強度は、3つの化学物質間で異ならなかった。高投与量の2 - O H P B Nも2 - S P B Nも両方とも、線維症の度合いに影響を有しなかった。第17 ~ 22群においては、特別な組織学的変化は、

30

【0052】

(議論)

本結果は、P B N、4 - O H P B Nおよび3 - O H P B NがC D A A食餌を給餌されたラットにおける早期の肝癌形成を阻害するが、2 - O H P B Nまたは2 - S P B Nが阻害しないことを実証し、そして4 - O H P B NがP B Nおよび3 - O H P B Nより大きな効果を及ぼすことを実証する。G S T - P 陽性病変の数は高投与量のP B Nによって陽性コントロールレベルの約半分に減少したが、その大きさは、P B N、4 - O H P B Nおよび3 - O H P B Nによって約20%以下に減少した。酵素変異肝臓病変の大きさおよび数は新生物発生前の肝細胞集団の誘導および増殖を反映すると考えられることから(P i t o t

40

50

癌効果に重要な構成要素であると考えられる。

【0053】

C D A A 食餌を給餌されたラットの肝臓において、給餌の3日目から、肝細胞のアポトーシスは誘導され、そして肝細胞の核外成分に対する酸化損傷に密接に関連して蓄積する (Y o s h i j i ら 1992)。これは、肝細胞ミトコンドリアによって過酸化水素の過剰産生が生じる時点である (H e n s l y 2000)。これは、T B A R S レベルの増大と密接に関連する (Y o s h i j i ら 1992)。本結果は、周辺組織における状況と比較した場合、アポトーシスが G S T - P 陽性病変において抑制されることを示す。酸化ストレスはアポトーシスを誘導するシグナル伝達に影響し (N o s e 2000)、変更された肝細胞を除去するが (L o w e ら 2000; および W y l l i e ら 1999)、アポトーシスのシグナル伝達はいくつかの新生物発生前の肝細胞においては調節されず (R e e d 1999)、その結果、これらの細胞が新生物発生前の病変中に成長し得ることを可能にする、アポトーシスに対する抵抗性を獲得するらしいということが示唆される。いくつかの新生物発生前の細胞におけるアポトーシスのシグナル伝達の変化は、外因性の肝癌形成の間に化学的毒性に対する抵抗性の獲得に類似する (F a r b e r 1006)。この文脈において、P B N、4 - O H P B N および 3 - O H P B N は、新生物発生前および非新生物発生前の肝細胞における酸化ストレス仲介アポトーシス事象に対して異なる効果を及ぼして、前者の除去および後者の維持の増強を導き得ると考えられる。G S T - P 陽性病変の周辺組織におけるアポトーシスの阻害は、例えば、腫瘍壊死因子 - 、インターロイキン - 1 および 1 - 、インターフェロン - 、c - f o s、カスパーゼ - 3 ならびに f a s - A の過剰発現といった、プロアポトーシスのシグナル伝達因子に対する P B N の阻害効果に起因し得る (P o g r e b n i a k ら 1991; R o b i n s o n 1999; S a n g ら 1999; および S t e w a r t 1999)。対照的に、P B N およびその活性な誘導体によって G S T - P 陽性病変においてアポトーシスが増強される理由については未知であり、そして本発明者らの研究室において活発な調査下にある。可能性のある標的分子の1つは、核因子 - B である。なぜなら、その活性化が P B N によって阻害されるからである (K o t a k e ら 1998)。(前)新生物発生細胞における自己増殖は、細胞増殖についての調節システムの種々の改変の結果である。このシステムは、化学防御の最も重要な標的の1つであると考えられてきた (K r u p p ら 2000; および M o r i ら 1999)。C D A A 食餌を給餌されたラットの肝臓において、c - m y c および c - H a - r a s は、2日以内に過剰発現し (T s u j i u c h i ら 1995)、次いで肝細胞の増殖は、3日目から T B A R S の増大に密接に関連して誘導される (Y o s h i j i ら 1992)。本発明者らが実証したように、肝細胞の増殖活性は、周辺細胞においてよりも G S T - P 陽性病変において高い。本研究において、4 - O H P B N のみが、肝細胞の増殖を阻害した。この阻害は、周辺細胞においてよりも G S T - P 陽性病変においてより顕著であった。これはおそらく、4 - O H P B N の化学防御的有効性が P B N または 3 - O H P B N よりも大きいことの主要な理由の1つである。

【0054】

P B N の水酸基誘導体の生物学的な効果については、ほとんど知られていない。本発明者らは、少なくとも本モデルにおいて、4 - O H P B N、3 - O H P B N および 2 - O H P B N が、P B N よりもそれぞれ、より効果的、同等、またはより効果が低いことを実証した。明らかに、水酸基の位置は、これらの P B N 誘導体の効果において重要である。4 - O H P B N への代謝的変換が P B N の抗肝癌形成効果において重要な役割を果たし得る可能性は高い。対照的に、2 - S P B N の化学防御的効果の欠如は、その親水性の性質に起因し得る (K o t a k e 1999)。2 - S P B N の遊離基捕捉の有効性は、P B N と同等に強力であるか、または水性の環境においては P B N よりまさに強い (K o t a k e 1999)。さらに、2 - S P B N は、親水性の層において誘導される酸化ストレスによって媒介される種々の障害に対する阻害効果を示す (F a l l o n ら 1997; H a r k i n s ら 1997; および S c h u l z ら 1995)。親油性抗酸化剤の N ,

10

20

30

40

50

N' - ジフェニル - p - フェニレンジアミンは、C D A A 食餌を給餌されたラットの肝臓において、G S T - P 陽性病変の数を影響することなくその大きさを減少させる (N a k a e ら 1 9 9 4)。この様式において、これは 4 - O H P B N および 3 - O H P B N に類似する。親油性ビタミン C 誘導体の 2 - O - オクタデシルアスコルビン酸は、C D A A 食餌の長期の給餌によるラットの肝癌形成を、その親水性の親である L - アスコルビン酸より大きく阻害する (M i z u m o t o ら 1 9 9 4)。本結果は、親油性の層において誘導される酸化的ストレスが C D A A 食餌を給餌されたラットにおける肝癌形成にて重要な機構的因子および化学防御的標的の両方であることを示唆する。

【 0 0 5 5 】

結論として、P B N、4 - O H P B N、2 - O H B P N、2 - S O B P N および 3 - O H P B N は、新生物発生前の細胞におけるアポトーシスの選択的誘導および酸化的ストレスの阻害によって、おそらく有用な癌化学防御剤として働く。さらに、P B N の主要な代謝産物の 4 - O H P B N は、新生物発生前の細胞の増殖を阻害するそのさらなる能力に起因して、特に効果的であり得る。

10

【 0 0 5 6 】

(参考文献)

以下の引用文献は、本出願の詳細な補充のために本明細書中に参考として援用される：

【 0 0 5 7 】

【 化 1 】

Cao et al., " α -Phenyl-*tert*-butyl-nitron Reduces Cortical Infarct and Edema in Rats Subjected to Focal Ischemia," Brain Res., 644:267-272, 1994.

Carney et al., "Reversal of Age-related Increase in Brain protein Oxidation, Decrease in Enzyme Activity, and Loss in Temporal and Spacial Memory by Chronic Administration of the Spin-trapping Compound N-*tert*-butyl- α -phenyl-nitron," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:3633-3636, 1991.

Cerda et al., "Influence of oxygen Radical Injury on DNA Methylation," Mutat. Res., 386:141-152, 1997.

10

Chemoprevention Working Group. (1999) *Cancer Res.* 59, 4743-4358.

Christman J.K., "Lipotrope Deficiency and Persistent Changes In DNA Methylation: Lipotrope Deficiency and DNA Methylation," Adv. Exp. Med. Biol., 375:97-106, 1995.

Clough-Helfman et al., "The Free Radical Trapping Agent N-*tert*-butyl α -phenylnitron (PBN) Attenuates Cerebral Ischaemic Injury in Gerbils," Free Radic. Res. Commun., 15:177-186, 1991.

Endoh et al., "Inhibition by Acetylsalicylic Acid, a Cyclo--Oxygenase Inhibitor, and p-bromophnacylbromide, a Phosphoipase A₂ Inhibitor, of Both Cirrhosis and Enzyme-Altered Nodules Caused by a Choline-Deficient, L-amino Acid-Defined Diet in Rats, "Carcinogenesis", 17:467-475, 1996.

20

Fallon, J., Matthews, R. T., Hyman, B. T. & Beal, M. F. (1997) *Exp. Neurol.* 144, 193-198.

Farber, E. (1996) *Adv. Cancer Res.* 70, 21-48.

Floyd et al., "Spin Trapping in biological Systems. Oxidation of the Spin Trap-5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide by a Hydroperoxide-hematin System," Biochem. Biophys. Res. Commun., 74:79-84, 1977.

30

[0010]

Floyd et al., "Role of Oxygen Free Radicals in Carcinogenesis and Brain Ischemia," FASEB J., 4:2587-2597, 1990.

Floyd et al., "Nitron Radical Traps Protect in Experimental Neurodegenerative Diseases," In: Neuroprotective Approaches to the Treatment of Parkinson's Disease and other Neurodegenerative Disorders, edited by C.A. Chapman, C.W. Olanow, P. Jenner, and M. Youssim, London: Academic Press Limited, 1996, p. 69-90.

Floyd, R.A., "Protective Action of Nitron-Based Free Radical Traps Against Oxidative Damage to the Central Nervous System," Adv. Pharmacol., 38:361-378, 1997.

10

Floyd et al., "Inhibition by Phenyl *N-tert*-butyl Nitron of Early Phase Carcinogenesis in the Livers of Rats Fed a Choline-Deficient, L-amino Acid-defined Diet," Cancer Res., 58:4548-4551, 1998.

Folbergrova et al., *N-tert*-butyl- α -phenylnitron Improves Recovery of Brain Energy State in Rats following Transient Focal Ischemia," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:5057-5061, 1995.

Gold, R., Schmied, M., Giegerich, G., Breitschopf, H., Hartung, H. P., Toyaka, K. V. & Lassmann, H. (1994) Lab. Invest. 71, 219-225.

20

Goshal et al., "Prevention by Free Radial Scavenger AD₅ of Prooxidant Effects of Choline Deficiency," Free Radic. Biol. Med., 8:3-7, 1990.

Harkins, J. D., Carney, J. M., Meier, M., Leak, S. C. & Tobin, T. (1997) Vet. Hum. Toxicol. 39, 268-271.

Hautekeete et al., "The Hepatic Stellate (Ito) Cell: Its role in Human Liver Disease," Virchows Arch., 430:195-207, 1997.

Hensley et al., "Nitron-based Free Radical Traps as Neuroprotective Agents in Cerebral Ischemia and Other Pathologies," In: Neuroprotective Agents and Cerebral Ischaemia, edited by A. R. Green and A. J. Cross, London: Academic press Ltd., 1996, p. 299-317.

30

Hensley et al., "Quantitation of Protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Array Detection," Anal. Biochem., 251:187-195, 1997.

[10] 10 423]

Hensley et al., "Interaction of α -phenyl-*N*-*tert*-butyl Nitron and Alternative Electron Acceptors With Complex I Indicates a Substrate Reduction Site Upstream from the Rotenone Binding Site," *J. Neurochem.* 71:2549-2557, 1998.

Hensley, K., Personal Communication, 1998.

Hensley, K., Kotake, Y., Sang, H., Pye, Q. N., Kolker, W. G. L., Tabatabaie, T., Stewart, C. A., Konishi, Y., Nakae, D. & Floyd, R. A. (2000) *Carcinogenesis* 21, 983-989.

Hursting, S. D., Slaga, T. J., Fischer, S. M., DiGiovanni, J. D. & Phang, J. M. (1999) *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 215-225.

10

Janzen, E. G., "Spin Trapping," *Acc. Chem. Res.*, 4:31-40, 1971.

Janzen, E. G. & Haire, D. L. (1990) in *Advances in Free Radical Chemistry*, ed. Tanner D. D. (JAI Press, Greenwich), pp. 253-295.

Janzen et al., "Comparison of Antioxidant Activity of PBN with Hindered Phenols in Initiated Rat Liver Microsomal Lipid Peroxidation," In: *Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine*, edited by K. Asada and T. Toshikawa, Elsevier Science, 1994, p. 431-446.

Kishida, H., Nakae, D., Kobayashi, Y., Kusuoka, O., Kitayama, W., Denda, A., Kobayashi, Y., Nakae, D., Akai, H., Kishida, H., Okajima, E., Kitayama, W., Denda, A., Tsujiuchi, T., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H. & Konishi, Y. (1998) *Carcinogenesis* 19, 1809-1814. Fukui, H. & Konishi, Y. (2000) *Exp. Toxicol. Pathol.* 52, 405-412.

20

Kotake, Y. (1999) *Antiox. Redox Signal.* 1, 481-499.

Kotake, Y., Sang, H., Miyajima, T. & Wallis, G. L. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1448, 77-84.

Krupp, G., Klapper, W. & Parwaresch, R. (2000) *Cell Mol. Life Sci.* 57, 464-486.

Lowe, S. W. & Lin, A. W. (2000) *Carcinogenesis* 21, 485-495.

30

Maronpot et al., "National Toxicology Program Nomenclature for Hepatoproliferative Lesions for Rats," *Toxicol. Pathol.*, 14:263-273, 1986.

Miyajima et al., "Spin Trapping Agent, phenyl-*N*-*tert*-butyl Nitron, Inhibits Induction of Nitric Oxide Synthase in Endotoxin-induced Shock in Mice," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 215:114-121, 1995.

{ 6210562 }

Mizumoto, Y., Nakae, D., Yoshiji, H., Andoh, N., Horiguchi, K., Endoh, T., Kobayashi, E., Tsujiuchi, T., Shimoji, N., Denda, A., Tsujii, T., Nagao, M., Wakabayashi, K. & Konishi, Y. (1994) *Carcinogenesis* **15**, 241-246.

Mori, H., Sugie, S., Yoshimi, N., Hara, Y. & Tanaka, T. (1999) *Mutat. Res.* **428**, 291-298.

Nakae, D., Kotake, Y., Kishida, H., Hensley, K. L., Denda, A., Kitayama, W., Tsujiuchi, T., Sang, H., Stewart, C. A., Tabatabaie, T., Floyd, R. A. & Konishi, Y. (1998) *Cancer Res.* **58**, 4548-4551.

10

Nakae, D., Yoshiji, H., Mizumoto, Y., Horiguchi, K., Shiraiwa, K., Tamura, K., Denda, A. & Konishi, Y. (1992) *Cancer Res.* **52**, 5042-5045.

Nakae, D., Yoshiji, H., Maruyama, H., Kinugasa, T., Denda, A. & Konishi, Y. (1990) *Jpn. J. Cancer Res.* **81**, 1081-1084.

Nakae, D., Mizumoto, Y., Kobayashi, E., Noguchi, O. & Konishi, Y. (1995) *Cancer Lett.* **97**, 233-239.

Nakae, D., Yamamoto, K., Yoshiji, H., Kinugasa, T., Maruyama, H., Farber, J. L. & Konishi, Y. (1990) *Am. J. Pathol.* **136**, 787-795.

20

Nakae, D., Mizumoto, Y., Yoshiji, H., Andoh, N., Horiguchi, K., Shiraiwa, K., Kobayashi, E., Endoh, T., Shimoji, N., Tamura, K., Tsujiuchi, T., Denda, A. & Konishi, Y. (1994) *Jpn. J. Cancer Res.* **85**, 499-505.

Nakae D., "Endogenous Liver Carcinogenesis in the Rat," *Pathol. Int.*, **49**:1028-1942, 1999.

Nakae D., "Modulation by Environmental Chemicals of Liver Carcinogenesis in Rats", *Recent Res. Devel. Cancer*, **2**:143-165, 2000.

30

Nose, K. (2000) *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 897-903.

Novelli et al., "Anti-shock Action of Phenyl-*tert*-butyl-nitrone, a Spin Trapper," In: *Oxygen Free Radicals in Shock*, edited by G.P. Novelli and F. Ursini, Florence: Karger, Basel, 1986, page 119-124.

(参考文献)

Ohata et al., "Inhibition by 1'-acetoxychavicol Acetate of Lipopolyvsaccharide- and Interferon- γ -induced Nitric Oxide production Through Suppression of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression in RAW263 Cells," Carcinogenesis, (Lond.), 19:1007-1012, 1998.

Pahlmark et al., "Effects of the Spin Trap- α -phenyl-N-*tert*-butyl nitron (PBN) in Transient Forebrain Ischaemia in the Rat," Acta Physiol. Scand., 157:41-51, 1996.

Pitot, H. C., Campbell, H. A., Matonpot, R., Bawa, N., Rizvi, T. A., Xu, Y. H., Sargent, L., Dragan, Y. & Pyron, M. (1989) Toxicol. Pathol. 17, 594-612.

Pogrebniak, H., Matthews, W., Mitchell, J., Russo, A., Samuni, A. & Pass, H. (1991) J. Surg. Res. 50, 469-474.

Pogrebniak et al., "Spin Trap Salvage From Endotoxemia: The Role of Cytokine Down-Regulation," Surgery, 112:130-139, 1992.

Poirier L.A., "Methyl Group Deficiency in Hepatocarcinogenesis," Drug Metab. Rev., 26: 185-199, 1994.

Poyer et al., "Spin Trapping of the Trichloromethyl Radical Produced During Enzymic NADPH Oxidation in the Presence of Carbon Tetrachloride or Carbon Bromotrichloromethane," Biochim. Biophys. Acta, 539:402-409, 1978.

Reed, J. C. (1999) J. Clin. Oncol. 17, 2941-2953.

Reinke, L. A., Moore, D. R., Sang, H., Janzen, E. G. & Kotake, Y. (2000) Free Radic. Res. Biol. Med. 28, 345-350.

Robinson, K. A., Stewart, C. A., Pye, Q. N., Nguyen, X., Kenney, L., Salzman, S., Floyd, R. A. & Hensley, K. (1999) J. Neurosci. Res. 55, 724-732.

Sakata et al., "the Prolyl 4-hydroxylase Inhibitor HOE077 Prevents Activation of Ito Cells, Reducing procollagen Gene Expression In Rat Liver Fibrosis Induced by Choline-Deficient L-amino Acid-defined Diet," Hepatology, 23:755-763, 1996.

Sang, H., Wallis, G. L., Stewart, C. A. & Kotake, Y. (1999) Arch. Biochem. Biophys. 363, 341-348.

Sasaki et al., "Alterations of the Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinomas Induced Endogenously and Exogenously in Rats," Jpn. J. Cancer Res., 92:16-22, 2001.

10

20

30

[化学的経路]

Schulz, J. B., Henshaw, D. R., Siwek, D., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Cipolloni, P. B., Kowall, N. W., Rosen, B. R. & Beal, M. F. (1995) *J. Neurochem.* **64**, 2239-2247.

Stewart, C. A., Hyam, K., Wallis, G., Sang, H., Robinson, K. A., Floyd, R. A., Kotake, Y. & Hensley, K. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 71-74.

Tabatabaie et al., "In Vivo Trapping of Nitric Oxide in the Brain of Neonatal Rats Treated with the HIV-1 Envelope Protein gp 120: Protective Effects of α -Phenyl-tert-butyl nitron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221:386-39-. 1996.

10

Tsutsumi, Y., Serizawa, A. & Kawai, K. (1995) *Pathol. Int.* **45**, 108-115.

Tsujiuchi, T., Kobayashi, E., Nakae, D., Mizumoto, Y., Andoh, N., Kitada, H., Ohashi, K., Fukuda, T., Kido, A., Tsutsumi, M., Denda, A. & Konishi Y. (1995) *Jpn. J. Cancer Res.* **86**, 1136-1142.

Wyllie, A. H., Bellamy, C. O., Bubb, V. J., Clarke, A. R., Corbet, S., Curtis, L., Harrison, D. J., Hooper, M. L., Toft, N., Webb, S. & Bird, C. C. (1999) *Br. J. Cancer* **80**, Suppl. 1, 34-37.

Yoshiji, H., Nakae, D., Mizumoto, Y., Horiguchi, K., Tamura, K., Denda, A., Tsujii, T. & Konishi, Y. (1992) *Carcinogenesis* **13**, 1227-1233.

20

Zeisel S.H., "Nutrients, Signal Transduction and Carcinogenesis," *Adv. Exp. Med. Biol.*, 369:175-183, 1995.

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、C D A A 食餌を 70 週間給餌したラットにおける、H C A、H C C および線維症の誘導に対する P B N の効果を示す表である。

【図 2】図 2 は、C D A A ± 種々の量のニトロンの結果を示す表である。

【図 3】図 3 は、ラットの G S T - P 陽性の肝臓病変の数および大きさならびに酸化的な肝細胞の損傷のレベルの結果を示す表である。 30

【図 4】図 4 は、ラットの肝臓におけるアポトーシス指標および線維症の度合いの結果を示す表である。

【図 1】

FIG. 1

加齢、CDAA食餌と経口トライトに与えるHCA、HCCおよびHCC食餌の投与による肝臓の病変

群	処置	投与量 (g/100g体重)	投与回数 (回)	投与期間 (日)	肝臓重量 (g/100g体重)	肝臓の病変の程度			肝臓の病変の程度 (H&E染色による評価)
						HCA	HCC	HCC	
1	CDAA	10	7	415 ± 27 ^a	4.45 ± 0.26 ^a	4	57.1	4	57.1
2	CDAA + PEN	10	7	408 ± 34	4.52 ± 0.07	2	25.0 ^a	2	25.0 ^a
3	CDAA + PEN	10	7	406 ± 58	4.40 ± 0.24	2	28.5 ^a	0	0 ^a
4	CDAA	10	8	398 ± 39	4.23 ± 0.53	5	63.3	0	0 ^a
5	CDAA	10	10	435 ± 31 ^a	2.90 ± 0.10 ^a	0	0 ^a	0	0 ^a
6	CDAA + PEN	10	10	446 ± 15	3.36 ± 0.26	0	0	0	0

^a 他は平均値と標準偏差で示される。
* 第1群の値と有意に異なる。

【図 2】

FIG. 2

群	処置	投与量 (g/100g体重)	投与回数 (回)	平均食物摂取量 (g/100g体重/日)	平均肝臓重量 (g/100g体重/日)	肝臓の病変の程度 (H&E染色による評価)	肝臓の病変の程度 (H&E染色による評価)
1	CDAA	10	7	415 ± 27 ^a	4.45 ± 0.26 ^a	4	57.1
2	CDAA + PEN	10	7	408 ± 34	4.52 ± 0.07	2	25.0 ^a
3	CDAA + PEN	10	7	406 ± 58	4.40 ± 0.24	2	28.5 ^a
4	CDAA	10	8	398 ± 39	4.23 ± 0.53	5	63.3
5	CDAA	10	10	435 ± 31 ^a	2.90 ± 0.10 ^a	0	0 ^a
6	CDAA + PEN	10	10	446 ± 15	3.36 ± 0.26	0	0
7	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	417 ± 34	4.55 ± 0.59	4	57.6
8	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	417 ± 34	4.55 ± 0.59	4	57.6
9	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	404 ± 29	3.49 ± 0.69	0	0
10	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	404 ± 29	3.49 ± 0.69	0	0
11	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	404 ± 29	3.49 ± 0.69	0	0
12	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	404 ± 29	3.49 ± 0.69	0	0
13	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	404 ± 29	3.49 ± 0.69	0	0
14	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	404 ± 29	3.49 ± 0.69	0	0
15	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	404 ± 29	3.49 ± 0.69	0	0
16	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	404 ± 29	3.49 ± 0.69	0	0
17	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	404 ± 29	3.49 ± 0.69	0	0
18	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	404 ± 29	3.49 ± 0.69	0	0
19	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	404 ± 29	3.49 ± 0.69	0	0
20	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	404 ± 29	3.49 ± 0.69	0	0
21	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	404 ± 29	3.49 ± 0.69	0	0
22	CDAA + 4-OH-PEN	10	7	404 ± 29	3.49 ± 0.69	0	0

^a 肝臓の病変の程度は、H&E染色による評価で、0は正常、1は軽度、2は中等度、3は重度、4は非常に重度、5は最重度を示す。

^a 他は平均値と標準偏差で示される。
* 第1群の値と有意に異なる。

【図 3】

FIG. 3

CDAA食餌の肝臓病変の程度と投与量との関係

群	処置	投与量 (g/100g体重)	投与回数 (回)	投与期間 (日)	肝臓重量 (g/100g体重)	肝臓の病変の程度	肝臓の病変の程度 (H&E染色による評価)
1	CDAA	10	7	415 ± 27 ^a	4.45 ± 0.26 ^a	4	57.1
2	CDAA + PEN	10	7	408 ± 34	4.52 ± 0.07	2	25.0 ^a
3	CDAA + PEN	10	7	406 ± 58	4.40 ± 0.24	2	28.5 ^a
4	CDAA	10	8	398 ± 39	4.23 ± 0.53	5	63.3
5	CDAA	10	10	435 ± 31 ^a	2.90 ± 0.10 ^a	0	0 ^a
6	CDAA + PEN	10	10	446 ± 15	3.36 ± 0.26	0	0

^a 他は平均値と標準偏差で示される。
* 第1群の値と有意に異なる。

【図 4】

FIG. 4

肝臓におけるCDAA食餌の肝臓病変の程度と投与量との関係

群	処置	投与量 (g/100g体重)	投与回数 (回)	投与期間 (日)	肝臓重量 (g/100g体重)	肝臓の病変の程度	肝臓の病変の程度 (H&E染色による評価)
1	CDAA	10	7	415 ± 27 ^a	4.45 ± 0.26 ^a	4	57.1
2	CDAA + PEN	10	7	408 ± 34	4.52 ± 0.07	2	25.0 ^a
3	CDAA + PEN	10	7	406 ± 58	4.40 ± 0.24	2	28.5 ^a
4	CDAA	10	8	398 ± 39	4.23 ± 0.53	5	63.3
5	CDAA	10	10	435 ± 31 ^a	2.90 ± 0.10 ^a	0	0 ^a
6	CDAA + PEN	10	10	446 ± 15	3.36 ± 0.26	0	0

^a 他は平均値と標準偏差で示される。
* 第1群の値と有意に異なる。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 October 2001 (11.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/74349 A1(51) International Patent Classification: A61K 31/15
A61P 35/00, A61K 31/135

(21) International Application Number: PCT/US01/10508

(22) International Filing Date: 28 March 2001 (28.03.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/193,572 30 March 2000 (30.03.2000) US

(71) Applicant: OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH
FOUNDATION (US/US), 825 Northeast 13th Street,
Oklahoma City, OK 73101 (US).(72) Inventors: FLOYD, Robert, A., 6301 Hanken Drive, Ok-
lahoma City, OK 73118 (US); KOTAKE, Yoshige, 6823
Newman Drive, Oklahoma City, OK 73162 (US); HENS-
LEY, Kenneth, 125 A Crestland Drive, Norman, OK
73071 (US); NAKAE, Dai, 265-1-613 Tsuchihashi-cho,
Kadiloua, Nara 634-8521 (JP).(74) Agent: HODGENS, Daniel, S., Head, Johnson & Kach-
igian, 228 West 17th Place, Tulsa, OK 74119 (US).(81) Designated States (national): AT, AU, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GF, GR, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SA, SE, SG, SI, SK, SL,
TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).Published:
— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments.For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: BUTYLNITROSE CONTAINING COMPOSITIONS FOR INHIBITION OF CANCER DEVELOPMENT

Effects of PBN on the induction of HCA, HCC and fibrosis in rats fed the CD diet for 70 weeks

Group	Treatments	Initial number of rats	Effective number of rats	Final body weight (g)	Relative liver weight (g/100 g body weight)	Induction of neoplastic lesions				Degree of fibrosis (Percent area occupied by collagen fiber in the specimen)	
						HCA		HCC			
						Number of rats/total	Incidence (%)	Number of rats/total	Incidence (%)		
1	CDAA	CDAA	10	7	415 ± 27 ^a	4.45 ± 0.26 ^a	4	57.1	4	57.1	13.32 ± 1.57 ^a
2	CDAA + PBN	CDAA + PBN	10	8	400 ± 14	4.52 ± 0.07 ^a	2	25.0 ^b	2	25.0 ^b	9.85 ± 1.17 ^b
3	CDAA + PBN	CDAA	10	7	400 ± 58	4.40 ± 0.24	2	28.6 ^b	0	0 ^c	4.37 ± 1.17 ^b
4	CDAA + CDAA	CDAA + PBN	10	8	399 ± 39	4.21 ± 0.63	5	62.5 ^b	0	0 ^c	12.16 ± 1.43
5	CSAA	CSAA	10	10	413 ± 21 ^a	2.90 ± 0.10 ^c	0	0 ^c	0	0 ^c	1.61 ± 0.22 ^b
6	CSAA + PBN	CSAA + PBN	10	10	415 ± 15	3.26 ± 0.28	0	0	0	0	1.58 ± 0.15

^a Values are presented as mean ± standard deviation.^b Significantly different from the group 1 value.

(57) Abstract: PBN (α-phenyl-tert-butyl nitroxide), and its derivatives nitroxide-based free radical traps, significantly reduce preneoplastic nodule development as well as inhibit hepatocellular carcinoma (HCC) formation at very low levels. The involvement of reactive oxygen species (ROS) in cancer development has been strongly implicated for many years. The involvement of ROS has been strongly implicated in cancer development in a model system where feeding a choline deficiency (CD) diet to rats leads to hepatocellular carcinoma (HCC) development. Administering PBN in the drinking water inhibits HCC formation. Preneoplastic nodule growth in the liver is significantly suppressed by administering PBN, or some of its natural metabolites, in the diet. The effectiveness of PBN in preventing HCC development in the CD liver model is considered due to its prevention of tumor development after the target cells have already been initiated, i.e. genetically changed into tumor cells. Administration of PBN (or its potent derivatives) to humans that may already have microscopic tumor preneoplastic nodules should prevent the eventual frank tumor formation.

WO 01/74349 A1

WO 01/74349

PCT/US01/10508

1

BUTYLNITRONE CONTAINING COMPOSITIONS FOR INHIBITION OF CANCER DEVELOPMENT

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

Priority is claimed from provisional application U.S. Serial No. 60/193,572 filed on March 30, 2000, and incorporated by reference herein.

STATEMENT REGARDING FEDERALLY SPONSORED RESEARCH OR DEVELOPMENT

The federal government has rights in the present invention insofar as it was supported in part by the National Institutes of Health Grants NS35747, PO1-AG05119, 5P50-AG05144 and R01 CA82506.

BACKGROUND

Chronic feeding of a choline-deficient-L-amino acid-defined (CDAA) diet containing no carcinogens exerts a strong hepatocarcinogenicity in rats through the development of apparently preneoplastic, focal lesions in the background presence of repeating hepatocyte death and regeneration as well as fibrosis. Oxidative stress appears to play major roles in its underlying mechanisms in association with alteration on the status of various signaling molecules. Phenyl *N-tert*-butyl nitron (PBN), a radical trapper, has been shown to inhibit the development of preneoplastic lesions in the early phase of this dietary hepatocarcinogenesis by apparently inhibiting oxidative stress, inducible cyclo-oxygenase activity and fibrogenesis (Floyd et al., 1998).

Reactive oxygen species (ROS) have been implicated in cancer development for many years. A prime example where ROS are strongly implicated is the model system where feeding a choline deficiency (CD) diet to rats leads to hepatocellular carcinoma (HCC) development, *i.e.* in the complete absence of exposure to any exogenous known carcinogen. Utilizing this model, the present invention concerns novel observations that make it possible to link ROS with key signal transduction pathways that have been shown to be fundamental in cancer initiation and development. The present inventors have shown that mitochondria from CD-livers are changed such that they mediate a significantly higher yield of H₂O₂ production. Additionally, for the first time the present inventors have shown that PBN (α -phenyl-*tert*-butyl nitron) and its derivatives are nitron-based free radical traps and, significantly reduce preneoplastic nodule development as well as inhibit hepatocellular carcinoma (HCC) formation at very low levels of the compound.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

2

as well as inhibit hepatocellular carcinoma (HCC) formation at very low levels of the compound. PBN and the like are the most potent anti-carcinogens ever studied in this model. To understand these observations the inventors postulate that the CD-regimen mediates changes in mitochondrial membranes such that they produce enhanced levels of H_2O_2 and that PBN and the like significantly inhibit the excess H_2O_2 production by acting at Complex I. The present inventors further postulate that excess H_2O_2 causes an enhanced inactivation of the PTEN tumor suppressor protein, which causes a loss of its phosphatase activity and thereby mediates a shift toward the activation of the AKT-kinase pathway resulting in a decrease in apoptosis-mediated processes but an increase in oncogenic events. The inventors also propose that the cells in preneoplastic nodules which develop in CD-livers are predisposed toward ontogenesis (as opposed to apoptosis) because of the action of excess H_2O_2 and certain growth factors (most likely TGF β_1) and that PBN and the like alter these processes through both inhibition of excess H_2O_2 production and also by suppression of enhanced signal transduction processes. The inventors believe that PBN and the like act to cause preneoplastic nodule cells to become predisposed toward apoptotic processes leading to inhibition of tumor development.

Studies on the pharmacological action of PBN - The compound PBN was first synthesized in the 1950's, but in 1968 it was discovered to be very useful to trap and stabilize free radicals in chemical reactions and hence it was termed a spin-trap (Janzen 1971). Although PBN is the prototype spin-trap several other nitrones have been synthesized and found useful to trap and characterize free radicals in chemical reactions. These spin traps were used in chemical reactions first, but in the mid-1970's they began to be used to trap free radicals in biochemical and biological systems (Floyd et al. 1978; and Poyer et al. 1978, for example). Pharmacokinetic studies have shown that PBN is readily and rapidly distributed almost equally to all tissues, has a half-life in rats of about 132 minutes and is eliminated mostly in the urine. Relatively few metabolism studies have been done, but it is known that some ring hydroxylation (primarily in the para position) of the compound occurs in the liver. Novelli first showed that PBN could be used to protect experimental animals from septic shock (Novelli et al. 1986), and indeed this was later confirmed by other groups (Pogrebniak et al. 1992). The use of PBN and derivations as pharmacological agents began after discoveries in 1988 that showed that PBN had neuroprotective activity in experimental brain stroke models (Floyd 1990; Floyd et al. 1996; and Carney et al. 1991). These results were repeated and extended, (i.e. see References Clough et al. 1991; Cao et al. 1994; Folbergrova et al. 1995; Pahlmark et al. 1996, for example). The

WO 01/74349

PCT/US01/10508

3

present inventors have summarized the extensive neuroprotective pharmacological research effort on PBN and derivatives (Floyd 1997; Hensley et al. 1996). In addition to neurodegenerative diseases, PBN has been shown to protect in other pathological conditions where ROS-mediated processes are involved, including diabetes and many other conditions. The mechanistic basis of why PBN and some of its derivatives are so neuroprotective in experimental stroke and several other neurodegenerative models has not been completely elucidated yet. However, it is clear that its action cannot simply be explained by its ability to trap free radicals. In fact the present inventors' research effort on the mechanistic basis of PBN's action now shows that it is acting by suppressing gene induction (Floyd 1997; Hensley et al. 1996; Miyajima et al. 1995; Tabatabaie et al. 1996; and Hensley et al. 1997), most likely by acting on oxidation-sensitive signal transduction processes (Robinson et al. 1999). In fact PBN seems to be acting by suppressing signal transduction enhanced ROS formation by mitochondria (Hensley et al. 1998). These findings and ideas have arisen from the study of neurodegenerative processes. It should be emphasized, however, that PBN's action in preventing CD carcinogenesis may be different than those found in the neurodegenerative disease models. A specific mechanism of action does not limit the present invention.

PBN is protective in choline-deficiency model

Earlier studies showed that PBN administered in drinking water was very protective in the CD-model. The results were assessed after 12 weeks on the regime (Nakae et al. 1998). The research brought out several important points (1) PBN, even at the lowest level, drastically reduced the size of neoplastic nodules (from 1.92 mm³ in CDAA only to 0.33, 0.17 and 0.10 mm³ for the CDAA plus PBN treated at 6, 30 and 60 mg/kg-day respectively, see Table 1 of Nakae et al. 1998).

There was less effect of PBN on nodule number, i.e. 190 per mm³ for CDAA only to 170, 149 and 142 for the 6, 30 and 60 mg/kg-day respectively, (see Table 1 of Nakae et al. 1998). (2) PBN significantly reduced connective tissue proliferation. (3) Increasing concentrations of PBN reduced 8-OHdG content (a marker of DNA oxidation) in the CD-livers. (4) PBN reduced the amount of PGE₂ in the CD-livers by about 50% at the highest dose but it had no effect on COX-II expression, either the mRNA or protein level. In summary then the fact that the very lowest level of PBN decreased the nodule size by 83% but only decreased the nodule number by 11% indicates to us that nodule size is the most sensitive parameter to PBN

WO 01/74349

PCT/US01/10508

4

treatment. There was some effect on PGE_2 levels but only at the highest levels of PBN and this probably had to do with it acting as a catalytic inhibitor of the enzyme *per se*.

To highlight the potency of PBN relative to other chemicals that have been tested in the CDAA model, it is instructive to compare results, which were obtained by the Nakae-Konishi group (see Mizumoto et al. 1994; Endoh et al. 1996; and Nakae 1999). The data clearly show that PBN is the most effective compound tested in the CDAA regimen in reducing the size of the preneoplastic nodules and in preventing an increase in the 8-OHdG content. The effectiveness of PBN on nodule size is much more potent than comparable amounts of the other inhibitors, most of which are free radical scavengers. The only other compounds that seemed to have some effect, albeit at higher levels, were nordihydroguaric acid (NGDA) and CV3611. CV3611 is the fatty acid ester of ascorbate. NGDA at the 0.1% level lowered nodule size, by 39% and CV3611 at the 0.05% level caused a 44% lowering. In contrast, PBN at the lowest level amount given (6 mg/kg) decreased nodule size by 83%, and by 95% at the highest level. NGDA was tested because of its known inhibition of lipoxygenase activity, but it has also been recently shown to antagonize tyrosine kinases (Hensley 1998). BPB (p-bromophenocyanide) was used as an inhibitor of phospholipase A_2 activity but as the data show, this compound had little activity in suppressing the size of the nodules (Endoh 1996). Acetylsalicylic acid had some effect (but not nearly as potent as PBN) on nodule size and nodule number, as well as 8-OHdG content (Endoh 1999). Alpha tocopherol and ascorbate as well as trolox were studied by they had very little effect on any of the parameters (Mizumoto et al. 1994). It should also be noted that none, if any, of the inhibitors have any effect on fatty liver development. The wide variability in effectiveness of various antioxidants in this model and their lack of effect on fatty liver development seems to be a consistent finding. A striking case in point involves antioxidant effectiveness of compounds inhibiting lipid peroxidation in rat liver microsomes versus their action in the CDAA model. Data collected by Janzen et al. 1994 demonstrate that Trolox and BHT show quite striking activity in ability to inhibit rat liver microsomal peroxidation (IC_{50} of 40 μM and 6 μM respectively) whereas PBN is about one thousand-fold less effective (IC_{50} = 5 mM). Yet PBN is very effective in the CDAA model (Nakae et al. 1998) but BHT and Trolox are not (Ghoshal et al. 1990; Mizumoto et al. 1994). This comparison amply illustrates the point that the action of inhibitors in the CDAA model cannot simply be explained by their antioxidant or radical scavenging properties alone.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

5

While earlier studies have indicated a possible connection between the occurrence of preneoplastic nodular lesions and the presence or absence of PBN in rats on a CDAA diet, those of skill in the art understand that these preneoplastic nodular lesions are not dependently predictable of frank cancer development. The present invention establishes that nitronc

5 reductants such as PBN as its derivatives are in fact effective in inhibiting the development of actual cancerous lesions. Those of skill in the art will understand that this discovery has great implications for one of the major health problems of our day.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention involves a method for inhibiting initiation or development of cancer or tumor development. The method comprises enterally administering an effective dose

0 of a nitronc free radical trapping agent. The administering is preferably enteral by supplementing food or drink. A preferred nitronc is an aryl N-alkyl nitronc. The alkyl is tertiary (tert) butyl although other alkyls, cycloalkyls and the like may be used. Preferred aryls are phenyl, 3-hydroxyphenyl and 4-hydroxyphenyl and the like. Both new aryls and alkyls may be used once

5 one of skill in the art performs tests as described herein to identify effective nitroncs, find optimal doses, delivery and timing schedules. Dietarily administering an effective dose of a nitronc free radical trapping agent to a subject is a preferred administrative route although other routes may be found effective in particular situations.

The present invention more preferably involves a method comprising enterally

0 administering an effective dose of 3-hydroxyphenyl N-tert-butyl nitronc or 4-hydroxyphenyl N-tert-butyl nitronc to prevent or inhibit cancer. In most cases an effective dose is from about 0.5 to about 60 mg/kg body wt. per day. In one preferred embodiment, the present invention involves a method for inhibiting hepatocarcinogenesis, the method comprising dietarily administering to

5 a subject an effective dose of at least one of phenyl N-tert-butyl nitronc, 3-hydroxyphenyl N-tert-butyl nitronc or 4-hydroxyphenyl N-tert-butyl nitronc. Subjects to be treated include those with a family history of cancer such as prostate, breast, liver or other cancer, as well as subjects believed to have been exposed to a carcinogenic environment such as excess UV irradiation, radiation, food contaminated with carcinogens, etc. In cases where the dietary administration is through

0 supplementation of a food component, the nitronc content effective amount may be from about 0.005 w/w% to about 0.1 w/w % of the diet being administered.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

6

Other tumor models where PBN and its chemical derivatives are likely to be active include HCC development caused by infection from hepatitis B virus and hepatitis C virus. Many tumors that afflict humans progress through a preneoplastic nodular stage and evidence indicates that ROS or conditions that exacerbate ROS formation are important in tumor development. Therefore, we consider it likely that the development of many human tumors may be held in check by daily administering of PBN or one of its effective chemical derivatives at very low levels (perhaps at 1 mg or less per day).

The present invention also involves a nitronone free radical trapping agent for use in the preparation of an anti-carcinogenic diet and the preparation of such supplemented diets. Again an aryl N-alkyl nitronone free radical trapping agent is preferred for use in the preparation of an anti-carcinogenic diet. The most preferred nitronones are 3-hydroxyphenyl N-tert-butyl nitronone and 4-hydroxyphenyl N-tert-butyl nitronone, individually or in combination for use in the preparation of an anti-carcinogenic diet.

While earlier studies have indicated a possible connection between the occurrence of preneoplastic nodular lesions and the presence or absence of PBN in rats on a CDA/A diet, those of skill in the art understand that these preneoplastic nodular lesions are not dependently predictable of frank cancer development. The present invention establishes that nitronone reductants such as PBN as its derivatives are in fact effective in inhibiting the development of actual cancerous lesions. Those of skill in the art will understand that this discovery has great implications for one of the major health problems of our day.

Examples where PBN (or its potent derivatives) are expected to be active in preventing frank tumor development included in addition to those in the liver, those that develop in most organs including stomach, colon, breast, pancreas, prostate, skin, head and neck, as well as the blood stream.

The present invention also involves a nitronone free radical trapping agent for use in the preparation of an anti-carcinogenic diet and the preparation of such supplemented diets. Again an aryl N-alkyl nitronone free radical trapping agent is preferred for use in the preparation of an anti-carcinogenic diet. More preferred nitronones are 3-hydroxyphenyl N-tert-butyl nitronone, 2-hydroxyphenyl N-tert-butyl nitronone, 2-sulfoxyphenyl N-tert-butyl nitronone and 4-hydroxyphenyl N-tert-butyl nitronone, individually or in combination for use in the preparation of an anti-carcinogenic diet.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

7

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG 1 is a table showing the effects of PBN on the induction of HCA, HCC and fibrosis in rats fed the CDAA diet for 70 weeks.

FIG 2 is a table showing the results of CDAA + various amounts of nitrones.

FIG 3 is a table showing the results of the numbers and sizes of GST-P-positive liver lesions and levels of oxidative hepatocyte injuries of rats.

FIG 4 is a table showing the results of apoptotic indices and grade of fibrosis in the livers of rats.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to inhibitors of PBN and its derivatives on the development of hepatocellular carcinoma (HCC), for example, in animals fed a CDAA diet. The present invention also relates to a showing that PBN and its derivatives effectively inhibit the development of HCC induced by a chronic feeding of the CDAA diet. This chemopreventive action of PBN and its derivatives is suggested to result from both the disturbance of the development of preneoplastic lesions including HCA in the early phase and the prevention of their progression to HCC in the late phase of the dietary hepatocarcinogenesis.

Data recently collected from a long-term (70-week) study of the effectiveness of PBN (when in drinking water) in the CD-model, demonstrated that it completely inhibited frank HCC formation and was not carcinogenic itself. PBN is the most effective anti-carcinogenic compound tested thus far in this specific model. In follow-up studies, the inventors found that 4-hydroxy PBN (4-OH-PBN) when administered in the diet was even a more effective anti-carcinogen than the parent compound. Accordingly, PBN, as well as 4-OH-PBN 3-OHPBN, 2-OHPBN and 2-SPBN (2 sulfoxy PBN), inhibit CD-mediated hepatocellular carcinoma development in rats when administered in the diet.

The abbreviations used herein are as follows: PBN, phenyl *N-tert*-butyl nitron; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NF- κ B, nuclear factor- κ B; COX2, inducible cyclo-oxygenase; CDAA diet, choline-deficient, L-amino acid-defined diet; GST-P, glutathione *S*-transferase placental form; HCC, hepatocellular carcinoma; HCA, hepatocellular adenoma; CSAA diet, choline-supplemented, L-amino acid-defined diet; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX, cyclo-oxygenase.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

8

The following examples further illustrate model embodiments of the present invention including preferred versions and methods of making the same; however these examples are not to be construed as limitations of this invention.

EXAMPLE 1

5 The present example shows effects of phenyl N-*tert*-butyl nitron (PBN), a radical trapping agent, on hepatocarcinogenesis in male Wistar rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined (CDAA) diet for 70 weeks. Hepatocellular adenoma (HCA) and carcinoma (HCC) were induced with 57.1% incidences by continuous feeding of the CDAA diet for 70 weeks. PBN, administered in the drinking water at a concentration of 0.065% throughout the
0 experimental period with the CDAA diet, reduced HCA and HCC incidences, both to 25.0%. When PBN for the first 26 weeks and then vehicle drinking water for 44 weeks were administered with the CDAA diet, both HCA and HCC incidences were reduced to 28.6 and 0%, respectively. In contrast, when vehicle drinking water for 26 weeks and then PBN for the last 44 weeks were administered with the CDAA diet, HCC incidence was reduced to 0%, but HCA
5 incidence remained high as 62.5%. These results indicate that PBN inhibited hepatocarcinogenesis in rats fed the CDAA diet. The inhibition by PBN of the conversion from HCA to HCC in the late phase is especially important in the prevention of the HCC development.

PBN is a nitron-based radical trapping agent possessing potent anti-oxidative activity (Kotake 1999). In addition, PBN has been shown to exert anti-nitrosative effects by inhibiting
0 the induction of iNOS and to prevent alterations on the status of various signaling molecules like NF- κ B, pro-inflammatory cytokines, COX2 and pro-apoptotic gene products in *in vitro* and/or *in vivo* occasions (Kotake 1999). Reflecting these properties, PBN is preventive against a variety of animal disorders such as endotoxin shock, ischemia-reperfusion injuries, neurodegenerative diseases and diabetes that are mediated by oxidative and nitrosative stresses and altered signal
5 transduction (Kotake 1999).

Chronic feeding of the CDAA diet induces a high incidence of HCC within a year (in the absence of any known carcinogen) due to the endogenous mechanisms (Nakae et al. 1992; Nakae 1999; Nakae 2000). In this model, HCC is induced through GST-P-positive, foci of cellular alteration and then HCA under the background presence of continuous death and proliferation
0 of hepatocytes and fibrosis resulting in cirrhosis (Nakae 1999).

In a previous report, the present inventors demonstrated that PBN inhibits the induction and growth of GST-P-positive foci of cellular alteration in the livers of rats fed a CDAA diet due

WO 01/74349

PCT/US01/10508

9

to the inhibition of oxidative injury on hepatocyte nuclear DNA and of COX2 activity at the catalytic level (Nakae et al. 1998). Extending these findings, the present study assesses effects of PBN on the entire hepatocarcinogenesis in rats fed the CDAA diet, using HCC as an endpoint marker.

5 Materials and Methods

Animals, diets and chemical. The protocols were approved prior to the experiments by the Animal Experimentation committee at Nara Medical University according to the Guidelines on Animal Experiments in accordance with Japanese Government Animal Protection and Management Law Number 105 and Japanese Government Notification on Feeding and Safekeeping of Animals Number 6. Male Wistar rats, 6 weeks old, were purchased from Japan SLC, Inc., Hamamatsu, Shizuoka, Japan. Rats were housed 5 each to a plastic cage with white flake bedding (Kansai Animal Corp., City of Kyoto, Kyoto, Japan) in an air-conditioned room ($25 \pm 3^\circ\text{C}$ temperature, $55 \pm 8\%$ relative humidity, 10-12/h ventilation and 12-h dark/light cycle). Rats were used for the experimentation after a 1-week acclimation on a basal diet (CE-1, Clea Japan, Meguro, Tokyo, Japan) and allowed free access to food and tap water throughout the acclimation and experimental periods. Body weight, food consumption and water intake were monitored weekly. The CDAA diet and a control CSAA diet were obtained from Dyets Inc., Bethlehem, PA. PBN was synthesized and purified to 99.997% purity according to the method of Janzen and Haire (Janzen et al. 1990) in our laboratories.

Pilot study. A pilot study was conducted to determine a time-point when the late phase starts in hepatocarcinogenesis in rats fed the CDAA diet. A group of 20 rats were fed the CDAA diet for 16 weeks, and 10 animals were sacrificed. The remaining 10 rats were then fed the CSAA diet for 54 weeks and sacrificed 70 weeks after the commencement by exsanguination under light ether anesthesia. The other group of 20 rats were fed the CDAA diet for 26 weeks, and 10 animals were sacrificed. The remaining 10 rats were then fed the CSAA diet for 44 weeks and sacrificed 70 weeks after the commencement. Upon the sacrifice, the livers were taken, and 4- μm -thick, 10%-neutrally-buffered-formalin-fixed (for 24 h), paraffin-embedded specimens were prepared and stained routinely by a H&E procedure. The liver specimens were histologically examined according to the criteria described in the literature (Maronpot et al. 1996).

Main study. A total of 60 rats were equally divided into 6 groups. Group 1 received the CDAA diet for 70 weeks. Group 2 received the CDAA diet with PBN at a concentration of

WO 01/74349

PCT/US01/10508

10

0.065% in the drinking water for 70 weeks. Group 3 received the CDAA diet with PBN for 26 weeks and then the CDAA diet alone for 44 weeks. Group 4 received the CDAA diet alone for 26 weeks and then the CDAA with PBN for 44 weeks. Groups 5 and 6 received the CSAA diet alone and with PBN, respectively, for 70 weeks. The PBN dose was decided based on the inventors' previous report (Nakae et al. 1998). The time-point of 26 weeks after the commencement, when treatments were changed in groups 3 and 4, was decided according to the results of the pilot study (see the Results and Discussion section below). All surviving rats were sacrificed 70 weeks after the commencement, and the livers were taken. Two serial 4- μ m-thick, 10%-neutrally-buffered-formalin-fixed (9 for 24h), paraffin-embedded liver specimens were prepared and stained routine H&E and Masson's trichrome procedures. The H&E-stained liver specimens were histologically examined according to the aforementioned criteria (Maronpot et al. 1986), and the incidences of HCA and HCC were determined. Grade of fibrosis were evaluated by analyzing percent area occupied by collagen fiber in the Masson's trichrome-stained liver specimens using an IPAP image analyzing system (Sumika Tecmoservice, Corp., City of Osaka, Osaka, Japan).

Statistical analyses. Statistical analyses were carried out using an InStat software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Fisher's exact test was used to assess statistical significance of inter-group differences of the lesion incidences. Student-Newman-Keuls multiple comparison test was used to assess statistical significance of inter-group differences of means after one-way ANOVA to determine variations among group means, followed by Bartlett's test to determine homogeneity of variance.

In the pilot study, foci of cellular alteration were induced in the livers of all rats fed the CDAA diet for 16 weeks, and these lesions were persistent even after the following feeding of the CSAA diet for 54 weeks. No HCAs or HCCs were observed in any of these rats. Using male Fischer 344 rats, it was similarly shown that foci of cellular alteration, but not HCAs or HCCs are induced by feeding the CDAA diet for 24 weeks and then the CSAA diet for 28 weeks (Nakae et al. 1992). It is suggested that a period of 16-24 weeks is not enough to induce HCAs or HCCs but sufficient to induce foci of cellular alteration maintaining themselves persistent but not have a potency to be converted into advanced forms in the absence of the additional carcinogenic stimuli. In contrast, HCAs were induced in 2 out of 10 rats (20% incidence) after feeding the CDAA diet for 26 weeks. When the CDAA diet for 26 weeks and then the CSAA diet for 44 weeks were fed, HCAs were observed in 2 out of 10 rats (20% incidence). These

WO 01/74349

PCT/US01/10508

11

results demonstrate that chronic feeding of the CDAA diet for at least 26 weeks induces HCAs, and that HCCs are later induced even in the absence of the additional carcinogenic stimuli. These results of the pilot study suggest that the late phase of rat hepatocarcinogenesis may start 26 weeks after the beginning of feeding of the CDAA diet.

5 The results of the main study are summarized in the table of FIG 1. Three, 2, 3, and 2 rats died in groups 1, 2, 3 and 4, respectively. All rats survived in groups 5 and 6. There were no differences among groups in terms of food consumption or water intake. The final body and relative liver weights of group 5 were higher and lower than those of group 1, respectively. The administration of PBN did not affect the final body or relative liver weights in groups 2, 3, 4 and 6. In group 1, the livers were macroscopically yellowish-white and appeared cirrhotic in association with a few large tumors with turbid and dark color. Histologically, HCAs and HCCs were both observed in 4 out of 7 rats (57.1% incidence), while all rats had fatty liver and cirrhosis, 13.32% of liver specimen being occupied by collagen fiber. In group 2, the livers were macroscopically brownish-purple and with relatively smooth surface. Histologically, HCAs and HCCs were both observed only in 2 out of 8 group 2 rats (25.0% incidence), these incidences being significantly less than the group 1 values. While fatty liver was still evident, fibrosis was drastically reduced, only 9.95% of liver specimen being occupied by fiber, which was significantly less than the group 1 value. In group 3, macroscopic and histological characteristics of the livers resembled those of group 2. HCAs and HCCs were observed in 2 (28.6% incidence) and 0 (0% incidence) out of 7 rats, respectively, and 8.71% of liver specimen was occupied by fiber. These incidences and the grade of fibrosis were all significantly less than the group 1 values. In group 4, the livers almost appeared macroscopically, similarly to those of group 1, but lacked large tumors. Histologically, HCAs were observed in 5 out of 8 rats (62.5% incidence) with fatty liver and cirrhosis, 12.86% of liver specimen being occupied by fiber. These were all in the same range as group 1. HCCs, however, were not histologically observed (0% incidence), the incidence being significantly less than the group 1 value. No remarkable macroscopic or histological changes were detected in the livers of groups 5 or 6, and the incidences of HCAs and HCCs (both 0%) and grade of fibrosis (1.61%) were all significantly less than the group 1 values. These results clearly show that PBN inhibits the induction of HCCs in the livers of rats fed the CDAA diet. Such an inhibitory effect of PBN is suggested to be due to both the prevention of the HCA development, because of the reduced HCA and no HCC development by PBN

WO 01/74349

PCT/US01/10508

12

administered only in the first 26 weeks, and of the conversion of HCAs into HCCs, because of the no HCC development without altering HCA incidence.

The present inventors' previous report demonstrates that PBN inhibits the induction and, more prominently, growth of GST-P-positive foci of cellular alteration by a 12-week feeding of the CDAA diet, which is attributed to its inhibition of oxidative stress and COX2 activity (Nakae et al. 1998). While the roles of reactive oxygen species and COX2 have been well indicated in the early phase of hepatocarcinogenesis in rats fed the CDAA diet, various other factors have also been suggested to participate (Nakae 1999; and Nakae 2000). Reactive nitrogen species and transcription factors like NF- κ B may be involved, because 1'-acetoxychavicol acetate and PBN, both inhibitors of iNOS induction and NF- κ B activation (Kotake 1999; Ohata et al. 1998), inhibit the induction of GST-P-positive foci of cellular alteration (Nakae 1999; Nakae 2000; and Nakae 1998). While a variety of signaling alterations are induced in the livers of rats fed a semipurified choline-deficient diet (Zeisel). The present inventors have shown the accumulation or altered status of NF- κ B, caspase-1 and various cytokines also in the livers of rats during a 12-week feeding of the CDAA diet (Nakae 1999). Such alterations may also take part in the early phase of this hepatocarcinogenesis, because PBN can normalize these alterations (Kotake 1999). Signals relating to fibrosis may also participate, because reactive oxygen species and various signaling molecules are involved in the activation, proliferation and functioning of liver stellate cells inhibit the induction of both fibrosis and GST-P-positive foci of cellular alteration in the livers of rats fed the CDAA diet (Sakaida et al. 1996; Sakaida et al. 1998). Non-steroidal anti-inflammatory drugs, N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and PBN inhibit the induction of fibrosis along with the inhibition of the induction and growth of GST-positive foci of cellular alteration (Nakae 1999; Nakae 2000; and Nakae et al. 1998). The present results suggest that the fibrotic processes are also involved in the induction of HCAs in the early phase and can be inhibited by PBN, but that the presence of cirrhosis itself may not affect the conversion of HCAs into HCCs in the late phase. Taken together, it is suggested that the inhibitory effects of PBN on the early phase of hepatocarcinogenesis in rats fed the CDAA diet result from its regulation of a wide range of signal transduction pathways.

Whereas little has been elucidated about the mechanisms underlying the late phase of hepatocarcinogenesis in rats fed the CDAA diet, hypomethylation of oncogenes has long been considered as one of the critical factors in rat hepatocarcinogenesis due to dietary deficiency in choline and multiple methyl group donors (lipotropes) (Poirier et al. 1994; and Christman 1995).

WO 01/74349

PCT/US01/10508

13

The present inventors have recently shown that the 5'-flanking region of the *c-myc* gene is hypomethylated, resulting in overexpression of its mRNA in HCCs, but not HCAs, in rats fed the CDAA diet (Tsujiiachi et al. 1995). It is conceivable that hypomethylation of the *c-myc* gene play roles in the acquisition of the malignancy by HCC converted from HCA. Reactive oxygen species lead epigenetic alteration in DNA methylation patterns under the intervention of transcription factors (Christman 1995; and Cordra et al. 1997). PBN may disturb the formation of aberrant DNA methylation patterns by virtue of its inhibitory potency for oxidative stress and the activation of transcription factors (Kotake 1999), and in turn prevent the conversion of HCAs into HCCs. Furthermore, the transforming growth factor- β signaling pathway is altered in HCCs induced by the CDAA diet feeding (Sasaki et al. 2001). This may be another factor involved in the late phase mechanisms of hepatocarcinogenesis in rats fed the CDAA diet, and PBN may affect this process by its ability to normalize altered signal transduction (Kotake 1999).

In conclusion, PBN is chemopreventive against the induction of HCCs in the livers of rats fed the CDAA diet by inhibition of not only the HCA induction but also the conversion from HCAs to HCCs. Further studies are apparently demanded to evaluate chemopreventive effects of PBN against a wide variety of carcinogenic occasions and to elucidate the mechanisms underlying the cancer chemopreventive effects of PBN.

EXAMPLE 2

The present example extends previous results (Nakae, D., et al. (1998)) showing the anti-hepatocarcinogenic effects of a radical trapping agent, phenyl *N-tert*-butyl nitronc (PBN), by examining the effects of its derivatives on the early phase of hepatocarcinogenesis in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined (CDAA) diet. Male Wistar rats, 6 weeks old, were fed the CDAA diet alone or containing PBN derivatives at concentrations of 0.009, 0.045 or 0.090% for 16 weeks. The number of glutathione *S*-transferase placental form (GST-P)-positive, putatively preneoplastic lesions, were decreased only by the highest dose of PBN. However, the size of the preneoplastic lesions as well as oxidative injury on hepatocyte extra-nuclear components were decreased by all doses of 4-hydroxy-PBN and the highest doses of PBN and 3-hydroxy-PBN. 4-hydroxy-PBN and 3-hydroxy-PBN enhanced cellular apoptosis in the GST-P-positive lesions, without inhibiting it in surrounding tissue. Only 4-hydroxy-PBN inhibited hepatocyte proliferation both in GST-P-positive lesions as well as in the surrounding tissue. Neither 2-hydroxy-PBN nor 2-sulfoxy-PBN exerted any of those effects. The present results

WO 01/74349

PCT/US01/0508

14

demonstrate that PBN, 4-hydroxy-PBN and 3-hydroxy-PBN inhibit the growth of preneoplastic lesions. 4-hydroxy-PBN was more effective than PBN and 3-hydroxy-PBN. It is suggested that the metabolic conversion of PBN to 4-hydroxy-PBN plays an important role in the anti-hepatocarcinogenic effects of PBN, and that PBN, 4-hydroxy-PBN and 3-hydroxy-PBN may serve as useful cancer chemopreventive agents.

Chemoprevention by natural or synthetic chemicals has attracted attention in the potential control of cancers by delaying or arresting the carcinogenic (Chemoprevention Working Group 1999; and Hursting et al. 1999). Carcinogenesis is a multi-step process and therefore, it has been proposed that events occurring in each step can be targets for chemopreventive chemicals. Promising results have been obtained chiefly by investigations using appropriate *in vivo* animal models (Chemoprevention Working Group 1999; and Hursting et al. 1999).

Phenyl *N-tert*-butyl nitron (PBN) is a nitron-based free radical trapping agent that has been used in the detection of radical species by the spin-trapping technique. It has been shown to be potentially effective in inhibiting *in vitro* and *in vivo* oxidative and nitrosative stress and signal transduction abnormalities (Kotake 1999). PBN administration to rats yields 4-hydroxy-PBN (4-OHPBN) as the single predominate metabolite (Reinke 2000). When PBN is administered to rats *in vivo*, free and conjugated forms of 4-OHPBN are detected in hepatic tissue, as well as in the bile, urine, and blood plasma (Reinke 2000). 4-OHPBN is, therefore, considered the major metabolite of PBN formed in the liver microsomal system and it is thought to play crucial roles in the pharmacological action of the parent compound (Kotake 1999, Reinke 2000). Little is known, however, about the biological effects of 4-OHPBN.

The present inventors have previously demonstrated that PBN inhibits the induction and, more prominently, the growth of glutathione *S*-transferase placental form (GST-P)-positive, putatively preneoplastic lesions, in the livers of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined (CDAA) diet. PBN inhibits oxidative damage to hepatocyte nuclear DNA and suppresses inducible cyclo-oxygenase activity (Nakae et al 1998). The specific action of the anti-hepatocarcinogenic mechanism of PBN, however, still remain largely obscure. The present study was conducted to extend our earlier findings on the anti-hepatocarcinogenic effects of PBN, by examining the effect of 4-OHPBN, and other related derivatives on the early phase of rat hepatocarcinogenesis by chronic feeding of the PBN and derivatives in the CDAA diet.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

15

Materials and Methods

Animals. A total of 110 male Wistar rats were obtained at 5 weeks of age from Charles River Japan, Inc., Atsugi, Kanagawa, Japan. Experimentation began after a 1-week acclimation on a basal diet (CE-2 diet, Clea Japan, Meguro, Tokyo, Japan). Rats were housed 5 each in plastic cages with white flake bedding (Kansai Animal Corp., City of Kyoto, Kyoto, Japan) in a standard atmosphere (temperature, $25 \pm 3^\circ\text{C}$; relative humidity, $55 \pm 5\%$; ventilation, 10-15/hour; and a 12-hour dark/light cycle). Free access to food and tap water was allowed throughout the acclimation and experimental periods.

Diets and chemicals. The CDAA diet and its control, a choline-supplemented, L-amino acid-defined (CSAA) diet (Nakae et al. 1992; and Nakae et al. 1990) were obtained from Dyets, Inc., Bethlehem, PA. PBN, 4-OHPBN, 3-hydroxy-PBN (3-OHPBN) and 2-hydroxy-PBN (2-OHPBN) were synthesized and purified to 99.997% purity in our laboratories (Janzen et al. 1990). 2-Sulfoxy-PBN (2-SPBN) was purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI).

Animal experiment. After acclimation, rats were divided equally into 22 groups consisting of 5 animals each. Animals in group 1 received the CDAA diet alone. Groups 2, 3, and 4 received the CDAA diet containing PBN at concentrations of 0.009, 0.045, and 0.090% (hereafter referred as low, middle and high doses, respectively). Groups 5-7, 8-10, 11-13 and 14-16 received the CDAA diet containing the low, middle, and high doses of 4-OHPBN, 3-OHPBN, 2-OHPBN and 2-SPBN, respectively. Group 17 received the CSAA diet alone. Groups 18, 19, 20, 21, and 22 received the CSAA diet containing the high doses of PBN, 4-OHPBN, 3-OHPBN, 2-OHPBN, and 2-SPBN, respectively. The doses of compounds were decided according to our previous report in which PBN was administered in the drinking water (Nakae et al. 1998). However in the present experiment we administered the compounds in the diet because of the limited solubility of the hydroxy-derivatives of PBN. All animals were sacrificed by exsanguination under light ether anesthesia 16 weeks after commencement, and the livers excised. Slices 5-mm-thick were taken from the left lateral, median and right lateral lobes of the livers, fixed in 10% neutrally-buffered formalin for 24 hours and then embedded in paraffin. Five serial 4- μm -thick sections were prepared from each fixed liver slice and used for histological and immunohistochemical assessment as described below. The remaining portions of the livers were immediately frozen under liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

Body weight and food and water intake were monitored weekly, and the average dosages of PBN and its derivatives were then calculated.

WO 01/74349

PCT/US01/0508

16

Histological and immunohistochemical assessments. Histological assessment was performed using sections routinely stained with hematoxylin/eosin and Masson's trichrome procedures. Gradation of fibrosis was quantitatively evaluated in groups 1, 4, 7, 10, 13, 16 and 17 by calculating the percent area occupied by collagen fiber stained blue by Masson's trichrome method using an IPAP image analyzing system (Sumika Technoservice Corp., City of Osaka, Osaka, Japan). GST-P-positive lesions were visualized immunohistochemically. Lesions consisting of more than 6 cells were quantified using the IPAP system as described elsewhere (Kishida et al. 2000). The amount of apoptosis and the cellular proliferative activity were determined in groups 1, 4, 7, 10, 13, 16 and 17, using the double staining techniques by combination of the GST-P immunohistochemistry as above with the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling method (Gold et al. 1994) and the enhanced polymer one-step staining method for proliferating cell nuclear antigen (Tsutsumi et al. 1995), respectively. Numbers of apoptotic and proliferating hepatocytes among the 1000-5000 hepatocytes in GST-P-positive lesions and 5000 hepatocytes in surrounding tissue were counted under light microscopy to obtain percentages that are hereafter referred as apoptotic and proliferative indices, respectively.

Determination of oxidative hepatocyte injuries. Levels of oxidative damage to the hepatocytes were determined on frozen liver samples. Oxidative damage to nuclear DNA was assessed as previously described, using the amount of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) to 10⁶ deoxyguanosine (dG) ratio as a parameter (Nakae et al. 1995). Oxidative injury to extra-nuclear components was assessed as described elsewhere, by determining picomole malondialdehyde equivalent (MDA eq.) levels of 2-thiobarbituric acid-reacting substances (TBARS) per milligram protein (Nakae et al. 1990).

Statistics. Inter-group differences in quantitative data for multiple groups were recognized to be significant, when *p* values smaller than 0.05 were obtained by the Dunnett multiple comparison test employed after one-way analysis of variance to determine the variation among the group means followed by the Bartlett's test to determine the homogeneity of variance. Inter-group differences in data for particular group pairs were considered significant, when *p* values smaller than 0.05 were obtained by Student's *t*-test or Welch's *t*-test in cases where the data showed Gaussian bell-shaped or non-Gaussian distributions, respectively.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

17

Results

General findings. All rats survived throughout the experimental period. There were no differences among groups in terms of final body weights or average food intake (the table of FIG 2). The relative liver weight of rats given the control diet, i.e. group 17 was lower than those on the CDAA diet (group 1); but neither PBN nor any of its derivatives caused significant alterations of the liver weight in animals receiving the control diet (the table of FIG 2). The average dosage of PBN and its derivatives closely correlated with their doses of administration showing no differences among chemicals (the table of FIG 2).

Effects of PBN and its derivatives on the numbers and sizes of GST-P-positive lesions. The numbers and sizes of the preneoplastic lesions are summarized in the table of FIG 3. GST-P positive lesions were observed in groups 1-16. There were no lesions in group 17-22 and therefore they were significantly lower than that of group 1. PBN significantly decreased the number of the lesions only at the highest dosage to 52% of the group 1 value. PBN and its derivative at the two lowest levels show no effect on the number of lesions. In contrast, the sizes of the lesions were significantly decreased to 19 and 9% of the group 1 value by the high doses of PBN, 3-OHPBN and 4-OHPBN. 4-OHPBN exerted the greatest effect. The low, middle and high doses of 4-OHPBN reduced lesion sizes to 24, 19 and 18% of the group 1 value, respectively. The lowest dose of 4-OHPBN was as effective as its higher doses and also as effective as the highest dose of PBN and 3-OHPBN. Neither 2-OHPBN nor 2-SPBN had any effect on the number or sizes of the lesions.

Effects of PBN and its derivatives on the levels of oxidative hepatocyte injuries. 8-OHdG and TBARS data are also presented in the table of FIG 3. The nuclear DNA content of 8-OHdG of group 17 was significantly lower than that of group 1. All doses of PBN, 4-OHPBN, and 3-OHPBN significantly inhibited the increased 8-OHdG content caused by the CDAA diet feeding. These effects lacked dose-dependency, and the magnitudes were not different among the three chemicals. Neither 2-OHPBN nor 2-SPBN decreased the 8-OHdG levels from those of group 1. None of the chemicals had any effect on the 8-OHdG content of animals on the control diet.

The TBARS level of group 17 was significantly lower than that of group 1. While only the high dose of PBN and 3-OHPBN significantly inhibited the enhanced level caused by CDAA feeding, all three doses of 4-OHPBN significantly exerted an effect. The low dose of 4-OHPBN was as effective as its higher doses and of the high doses of PBN and 3-OHPBN. Neither 2-

WO 01/74349

PCT/US01/10508

18

OHPBN nor 2-SPBN affected the TBARS levels. None of the chemicals had any effect when given in the CSAA control diet.

Effects of PBN and its derivatives on hepatocyte apoptosis and proliferation in GST-P-positive lesions and surrounding tissue. Apoptotic and proliferative indices in GST-P-positive lesions and the surrounding tissue are summarized in the table of FIG 4. The apoptotic index in the surrounding tissue of group 17 was significantly less than that of group 1. The apoptotic indices were significantly lower in the lesions than in the surrounding tissue in group 1. The high doses of PBN, 4-OHPBN, and 3-OHPBN significantly increased the apoptotic indices in the lesions approximately 3-4 fold over the group 1 value, while significantly decreasing this index in the surrounding tissue to about 40%. As a result, the apoptotic indices became significantly higher in the lesions than in the surrounding tissue of these groups. The magnitude of the effect was not significantly different among the three chemicals. Neither 2-OHPBN nor 2-SPBN altered the apoptotic indices.

The proliferative index in the surrounding tissue of group 17 was significantly less than that of group 1. The proliferative indices were significantly higher in the lesions than in the surrounding tissue in group 1. Only the high dose 4-OHPBN significantly decreased the proliferative indices both in the lesions to approximately 31% of the group 1 value and in the surrounding tissue to about 49%. As a result, the proliferative indices in the lesions were still significantly higher than, but became close to, those in the surrounding tissue of group 17. None of the other chemicals had any effect on the proliferative indices in the control groups.

Effects of PBN and its derivatives on histological liver injury. In group 1, extensive fibrosis was histologically observed in association with fatty liver. None of the chemicals had any effect on fatty liver. PBN, 4-OHPBN and 3-OHPBN inhibited fibrosis, but neither 2-OHPBN nor 2-SPBN did not. The grades of fibrosis of groups 1, 4, 7, 10, 13, 16 and 17 are

WO 01/74349

PCT/US01/10508

19

4-OHPBN exerts a greater effect than PBN and 3-OHPBN. Even though the number of GST-P-positive lesions were reduced to approximately half of the positive control level by the high dose of PBN, their sizes were decreased to around 20% or less by PBN, 4-OHPBN and 3-OHPBN. Because the numbers and sizes of enzyme-altered liver lesions have been considered to reflect the induction and growth of preneoplastic hepatocyte population (Pitot et al. 1989), it is thus suggested that 4-OHPBN and 3-OHPBN inhibit the growth of preneoplastic liver lesions more prominently than it does their induction. We have already noted this result for PBN (Nakao et al. 1998). Oxidative hepatocyte damage to both nuclear DNA and extra-nuclear components were inhibited by PBN, 4-OHPBN and 3-OHPBN, but not by 2-OHPBN or 2-SPBN. The inhibition profile for TBARS was identical to that for the sizes of GST-P-positive lesions. Because oxidative hepatocyte damage to nuclear DNA and extra-nuclear components are involved respectively in the induction and growth of preneoplastic hepatocyte population in rats fed the CDAA diet, (Nakao et al. 1994; and Kobayashi et al. 1998), it is conceivable that the inhibition of oxidative stress is an important clue for the anti-carcinogenic effects of PBN, 4-OHPBN and 3-OHPBN.

In the livers of rats fed the CDAA diet, hepatocyte apoptosis is induced and accumulates in close association with oxidative damage to hepatocyte extra-nuclear components from 3 days on (Yoshiji et al. 1992). This is the time when over production of hydrogen peroxide by hepatocyte mitochondria occurs (Hensley 2000). It is closely associated with the increase of TBARS levels (Yoshiji et al. 1992). The present results show that apoptosis is suppressed in GST-P-positive lesions when compared with the situation in surrounding tissue. It is suggested that, whereas oxidative stress influences signaling inducing apoptosis (Nose 2000) to eliminate altered hepatocytes (Lowe et al. 2000; and Wyllie et al. 1999), it appears that apoptotic signaling is dysregulated in some preneoplastic hepatocytes (Reed 1999) such that they acquire resistance to apoptosis allowing those cells capable of growing into preneoplastic lesions. The apoptotic signaling change in some preneoplastic cells is analogous to their acquirement of resistance to chemical toxicity during exogenous hepatocarcinogenesis (Farber 1996). In this context, it is conceivable that PBN, 4-OHPBN and 3-OHPBN may exert different effects on oxidative stress-mediated apoptotic events in preneoplastic and non-prenoplastic hepatocytes, leading to enhanced elimination of the former and maintenance of the latter. The inhibition of apoptosis in the tissue surrounding GST-P-positive lesions may be due to the inhibitory effects of PBN on pro-apoptotic signaling factors, such as the over-expression of tumor necrosis factor- α ,

WO 01/74349

PCT/US01/10508

20

interleukin-1 α and 1- β , interferon- γ , c-fos, caspase-3 and fas-A (Pogrebniak et al. 1991; Robinson 1999; Sang et al. 1999; and Stewart 1999). In contrast, it is unknown and under active investigation in our laboratories as to why apoptosis was enhanced in GST-P-positive lesions by PBN and its active derivatives. One of the possible target molecules is nuclear factor- κ B, because its activation is inhibited by PBN (Kotake et al. 1998).

Autonomous proliferation in (pre)neoplastic cells is a result of various modifications of the regulating system for cell proliferation. This system has been considered as one of the most important targets for chemoprevention (Krupp et al. 2000; and Mori et al. 1999). In the liver of rats fed the CDAA diet, *c-myc* and *c-Ha-ras* are over-expressed within 2 days (Tsujiuchi et al. 1995), and then hepatocyte proliferation is induced in close association with the increase of TBARS from the third day (Yoshiji et al. 1992). The hepatocyte proliferation activity is higher in GST-P-positive lesions than in the surrounding cells as we demonstrated. In the present study, only 4-OHPBN inhibited hepatocyte proliferation. The inhibition was more prominent in GST-P-positive lesions than in the surrounding cells. This is probably one of the major reasons why the chemopreventive efficacy of 4-OHPBN is greater than PBN or 3-OHPBN.

Very little is known about the biological effects of the hydroxy-derivatives of PBN. We demonstrated that, at least in the present model that 4-OHPBN, 3-OHPBN and 2-OHPBN was more effective than, equal to, or much less effective than PBN, respectively. Clearly, the position of the hydroxy-group is important in the effectiveness of these PBN derivatives. It is highly likely that metabolic conversion to 4-OHPBN may play a significant role in the anti-hepatocarcinogenic effect of PBN. In contrast, the lack of the chemopreventive effects of 2-SPBN may be due to its hydrophilic property (Kotake 1999). The efficacy of the free radical trapping of 2-SPBN is as potent as, or in an aqueous environment, even stronger than PBN (Kotake 1999). Furthermore, 2-SPBN shows inhibitory effects on various disorders mediated by oxidative stress induced in the hydrophilic layer (Fallon et al. 1997; Harkins et al. 1997; and Schulz et al. 1995). *N,N'*-diphenyl-*p*-phenylenediamine, a lipophilic antioxidant, reduces the sizes of GST-P-positive lesions without affecting their numbers in the livers of rats fed the CDAA diet (Nakae et al. 1994). In this manner, it is similar to 4-OHPBN and 3-OHPBN. A lipophilic vitamin C derivative, 2-*O*-octadecylascorbic acid, inhibits rat hepatocarcinogenesis by chronic feeding in the CDAA diet greater than its hydrophilic parent, L-ascorbic acid (Mizumoto et al. 1994). The present results suggest that oxidative stress induced in the

WO 01/74349

PCT/US01/10508

21

lipophilic layer is both an important mechanistic factor as well as a chemopreventive target in hepatocarcinogenesis in rats fed the CDAA diet.

In conclusion, PBN, 4-OHPBN, 2-OHPBN, 2-SOBPN and 3-OHPBN serve as useful cancer chemopreventive agents possibly by inducing apoptosis selectively in preneoplastic cells and inhibiting oxidative stress. Additionally, 4-OHPBN, a major metabolite of PBN, may be especially effective due to its additional ability to inhibit proliferation of preneoplastic cells.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

22

References

The following citations are incorporated by reference herein for details supplementing this application:

- 5 Cao et al., "α-Phenyl-tert-butyl-nitron Reduces Cortical Infarct and Edema in Rats Subjected to Focal Ischemia," Brain Res., 644:267-272, 1994.
- Carney et al., "Reversal of Age-related Increase in Brain protein Oxidation, Decrease in Enzyme Activity, and Loss in Temporal and Spatial Memory by Chronic Administration of the Spin-trapping Compound N-tert-butyl-α-phenyl-nitron," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:3633-3636, 1991.
- 0 Cerda et al., "Influence of oxygen Radical Injury on DNA Methylation," Mutat. Res., 386:141-152, 1997.
- Chemoprevention Working Group. (1999) Cancer Res. 59, 4743-4358.
- Christman J.K., "Lipofate Deficiency and Persistent Changes In DNA Methylation: Lipofate Deficiency and DNA Methylation," Adv. Exp. Med. Biol., 375:97-106, 1995.
- 5 Clough-Helfman et al., "The Free Radical Trapping Agent N-tert-butyl α-phenylNitron (PBN) Attenuates Cerebral Ischaemic Injury in Gerbils," Free Radic. Res. Commun., 15:177-186, 1991.
- Endoh et al., "Inhibition by Acetylsalicylic Acid, a Cyclooxygenase Inhibitor, and p-bromophenacylbromide, a Phospholipase A₂ Inhibitor, of Both Cirrhosis and Enzyme-Altered
- 10 Nodules Caused by a Choline-Deficient, L-amino Acid-Defined Diet in Rats, "Carcinogenesis", 17:467-475, 1996.
- Fallon, J., Matthews, R. T., Hyman, B. T. & Beal, M. F. (1997) Exp. Neurol. 144, 193-198.
- Farber, E. (1996) Adv. Cancer Res. 70, 21-48.
- 5 Floyd et al., "Spin Trapping in biological Systems. Oxidation of the Spin Trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline-L-oxide by a Hydroperoxide-hematin System," Biochem. Biophys. Res. Commun., 74:79-84, 1977.
- Floyd et al., "Role of Oxygen Free Radicals in Carcinogenesis and Brain Ischemia," EASEB J., 4:2587-2597, 1990.
- 10 Floyd et al., "Nitron Radical Traps Protect in Experimental Neurodegenerative Diseases," In: Neuroprotective Approaches to the Treatment of Parkinson's Disease and other

WO 01/74349

PCT/US01/10508

23

Neurodegenerative Disorders, edited by C.A. Chapman, C.W. Olanow, P. Jenner, and M. Youssim, London: Academic Press Limited, 1996, p. 69-90.

Floyd, R. A., "Protective Action of Nitron-Based Free Radical Traps Against Oxidative Damage to the Central Nervous System," Adv. Pharmacol., 38:361-378, 1997.

5 Floyd et al., "Inhibition by Phenyl *N-tert*-butyl Nitron of Early Phase Carcinogenesis in the Livers of Rats Fed a Choline-Deficient, L-Amino Acid-defined Diet," Cancer Res., 58:4548-4551, 1998.

Folbergrova et al., *N-tert*-butyl- α -phenylnitron Improves Recovery of Brain Energy State in Rats following Transient Focal Ischemia," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:5057-5061, 1995. Gold, R., Schmied, M., Giegerich, G., Breitschopf, H., Hartung, H. P., Toyaka, K. V. & Lassmann, H. (1994) Lab. Invest. 71, 219-225.

Goshal et al., "Prevention by Free Radical Scavenger AD₃ of Prooxidant Effects of Choline Deficiency," Free Radic. Biol. Med., 8:3-7, 1990.

5 Harkins, J. D., Carney, J. M., Meier, M., Leak, S. C. & Tobin, T. (1997) Vet. Hum. Toxicol. 39, 268-271.

Hautekeerste et al., "The Hepatic Stellate (Ito) Cell: Its role in Human Liver Disease," Virchows Arch., 430:195-207, 1997.

Hensley et al., "Nitron-based Free Radical Traps as Neuroprotective Agents in Cerebral Ischemia and Other Pathologies," In: Neuroprotective Agents and Cerebral Ischaemia, edited by A. R. Green and A. J. Cross, London: Academic press Ltd., 1996, p. 299-317.

10 Hensley et al., "Quantitation of Protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Array Detection," Anal. Biochem., 251:187-195, 1997.

Hensley et al., "Interaction of α -phenyl-*N-tert*-butyl Nitron and Alternative Electron Acceptors With Complex I Indicates a Substrate Reduction Site Upstream from the Rotenone Binding Site," J. Neurochem., 71:2549-2557, 1998.

Hensley, K., Personal Communication, 1998.

Hensley, K., Kotake, Y., Sang, H., Pye, Q. N., Kolker, W. G. L., Tabatabaie, T., Stewart, C. A., Konishi, Y., Nakae, D. & Floyd, R. A. (2000) Carcinogenesis 21, 983-989.

10 Hursting, S. D., Slaga, T. J., Fischer, S. M., DiGiovanni, J. D. & Phang, J. M. (1999) J. Natl. Cancer Inst. 91, 215-225.

Janzen, E. G., "Spin Trapping," Acc. Chem. Res., 4:31-40, 1971.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

24

Janzen, E. G. & Haire, D. L. (1990) in *Advances in Free Radical Chemistry*, ed. Tanner D. D. (JAI Press, Greenwich), pp. 253-295.

Janzen et al., "Comparison of Antioxidant Activity of PBN with Hindered Phenols in Initiated Rat Liver Microsomal Lipid Peroxidation," In: Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine, edited by K. Asada and T. Toshiyawa, Elsevier Science, 1994, p. 431-446.

Kishida, H., Nakae, D., Kobayashi, Y., Kusuoka, O., Kitayama, W., Denda, A., Kobayashi, Y., Nakae, D., Akai, H., Kishida, H., Okajima, E., Kitayama, W., Denda, A., Tsujiuchi, T., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H. & Konishi, Y. (1998) *Carcinogenesis* **19**, 1809-1814. Fukui, H. & Konishi, Y. (2000) *Exp. Toxicol. Pathol.* **52**, 405-412.

Kotake, Y. (1999) *Antiox. Redox Signal.* **1**, 481-499.

Kotake, Y., Sang, H., Miyajima, T. & Wallis, G. L. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1448**, 77-84.

Krupp, G., Klapper, W. & Parwaresch, R. (2000) *Cell Mol. Life Sci.* **57**, 464-486.

Low, S. W. & Lin, A. W. (2000) *Carcinogenesis* **21**, 485-495.

Maronpot et al., "National Toxicology Program Nomenclature for Hepatoproliferative Lesions for Rats," *Toxicol. Pathol.*, **14**:263-273, 1986.

Miyajima et al., "Spin Trapping Agent, phenyl-N-tert-butyl Nitronc, Inhibits Induction of Nitric Oxide Synthase in Endotoxin-induced Shock in Mice," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **215**:114-121, 1995.

Mizumoto, Y., Nakae, D., Yoshiji, H., Andoh, N., Horiguchi, K., Endoh, T., Kobayashi, E., Tsujiuchi, T., Shimoji, N., Denda, A., Tsujii, T., Nagao, M., Wakabayashi, K. & Konishi, Y. (1994) *Carcinogenesis* **15**, 241-246.

Mori, H., Sugie, S., Yoshimi, N., Hara, Y. & Tanaka, T. (1999) *Mutat. Res.* **428**, 291-298.

Nakae, D., Kotake, Y., Kishida, H., Hensley, K. J., Denda A., Kitayama, W., Tsujiuchi, T., Sang, H., Stewart, C. A., Tabatabaie, T., Floyd, R. A. & Konishi, Y. (1998) *Cancer Res.* **58**, 4548-4551.

Nakae, D., Yoshiji, H., Mizumoto, Y., Horiguchi, K., Shiraiwa, K., Tamura, K., Denda, A. & Konishi, Y. (1992) *Cancer Res.* **52**, 5042-5045.

Nakae, D., Yoshiji, H., Maruyama, H., Kinugasa, T., Denda, A. & Konishi, Y. (1990) *Jpn. J. Cancer Res.* **81**, 1081-1084.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

25

- Nakae, D., Mizumoto, Y., Kobayashi, E., Noguchi, O & Konishi, Y. (1995) *Cancer Lett.* **97**, 233-239.
- Nakae, D., Yamamoto, K., Yoshiji, H., Kinugasa, T., Maruyama, H., Farber, J. L. & Konishi, Y. (1990) *Am. J. Pathol.* **136**, 787-795.
- 5 Nakae, D., Mizumoto, Y., Yoshiji, H., Andoh, N., Horiguchi, K., Shiraiwa, K., Kobayashi, E., Endoh, T., Shimoji, N., Tamura, K., Tsujiuchi, T., Denda, A. & Konishi, Y. (1994) *Jpn. J. Cancer Res.* **85**, 499-505.
- Nakae D., "Endogenous Liver Carcinogenesis in the Rat," *Pathol. Int.*, **49**:1028-1042, 1999.
- 0 Nakae D., "Modulation by Environmental Chemicals of Liver Carcinogenesis in Rats", *Recent Res. Devel. Cancer*, **2**:143-165, 2000.
- Nose, K. (2000) *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 897-903.
- Novelli et al., "Anti-shock Action of Phenyl-*tert*-butyl-nitron, a Spin Trapper," In: *Oxygen Free Radicals in Shock*, edited by G.P. Novelli and F. Ursini, Florence: Karger, Basel,
- 5 1986, page 119-124.
- Ohata et al., "Inhibition by 1'-acetoxychavicol Acetate of Lipopolysaccharide- and Interferon- γ -induced Nitric Oxide production Through Suppression of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression in RAW263 Cells," *Carcinogenesis*, (Lond.), **19**:1007-1012, 1998.
- Pahlmark et al., "Effects of the Spin Trap- α -phenyl-N-*tert*-butyl nitron (PBN) in
- 10 Transient Forebrain Ischaemia in the Rat," *Acta Physiol. Scand.*, **157**:41-51, 1996.
- Pitot, H. C., Campbell, H. A., Matonpot, R., Bawa, N., Rizvi, T. A., Xu, Y. H., Sargent, L., Dragan, Y. & Pyron, M. (1989) *Toxicol. Pathol.* **17**, 594-612.
- Pogrebniak, H., Matthews, W., Mitchell, J., Russo, A., Samuni, A. & Pass, H. (1991) *J. Surg. Res.* **50**, 469-474.
- 15 Pogrebniak et al., "Spin Trap Salvage From Endotoxemia: The Role of Cytokine Down-Regulation," *Surgery*, **112**:130-139, 1992.
- Poirier L.A., "Methyl Group Deficiency in Hepatocarcinogenesis," *Drug Metab. Rev.*, **26**: 185-199, 1994.
- Poyer et al., "Spin Trapping of the Trichloromethyl Radical Produced During Enzymic
- 20 NADPH Oxidation in the Presence of Carbon Tetrachloride or Carbon Bromotrichloromethane," *Biochim. Biophys. Acta*, **539**:402-409, 1978.
- Reed, J. C. (1999) *J. Clin. Oncol.* **17**, 2941-2953.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

26

- Reinke, L. A., Moore, D. R., Sang, H., Janzen, E. G. & Kotake, Y. (2000) *Free Radic. Res. Biol. Med.* **28**, 345-350.
- Robinson, K. A., Stewart, C. A., Pye, Q. N., Nguyen, X., Kenney, L., Salzman, S., Floyd, R. A. & Hensley, K. (1999) *J. Neurosci. Res.* **55**, 724-732.
- 5 Sakata et al., "the Prolyl 4-hydroxylase Inhibitor HOE077 Prevents Activation of Ito Cells, Reducing procollagen Gene Expression In Rat Liver Fibrosis Induced by Choline-Deficient L-amino Acid-defined Diet," *Hepatology*, **23**:755-763, 1996.
- Sang, H., Wallis, G. L., Stewart, C. A. & Kotake, Y. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **363**, 341-348.
- 0 Sasaki et al., "Alterations of the Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinomas Induced Endogenously and Exogenously in Rats," *Jpn. J. Cancer Res.*, **92**:16-22, 2001.
- Schulz, J. B., Henshaw, D. R., Siwek, D., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Cipolloni, P. B., Kowali, N. W., Rosen, B. R. & Beal, M. F. (1995) *J. Neurochem.* **64**, 2239-2247.
- 5 Stewart, C. A., Hyam, K., Wallis, G., Sang, H., Robinson, K. A., Floyd, R. A., Kotake, Y. & Hensley, K. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 71-74.
- Tabatabaie et al., "In Vivo Trapping of Nitric Oxide in the Brain of Neonatal Rats Treated with the HIV-1 Envelope Protein gp 120: Protective Effects of α -Phenyl-*tert*-butylnitron.
- Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**:386-39-, 1996.
- 10 Tsutsumi, Y., Serizawa, A. & Kawai, K. (1995) *Pathol. Int.* **45**, 108-115.
- Tsujiuchi, T., Kobayashi, E., Nakae, D., Mizumoto, Y., Andoh, N., Kitada, H., Ohashi, K., Fukuda, T., Kido, A., Tsutsumi, M., Denda, A. & Konishi Y. (1995) *Jpn. J. Cancer Res.* **86**, 1136-1142.
- Wyllie, A. H., Bellamy, C. O., Bubbs, V. J., Clarke, A. R., Corbet, S., Curtis, L., Harrison, D. J., Hooper, M. L., Toft, N., Webb, S. & Bird, C. C. (1999) *Br. J. Cancer* **80**, Suppl. 1, 34-37.
- 15 Yoshiji, H., Nakae, D., Mizumoto, Y., Horiguchi, K., Tamura, K., Denda, A., Tsujii, T. & Konishi, Y. (1992) *Carcinogenesis* **13**, 1227-1233.
- Zeisel S.H., "Nutrients, Signal Transduction and Carcinogenesis," *Adv. Exp. Med. Biol.*, **369**:175-183, 1995.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

27

What Is Claimed Is:

1. A method for inhibiting initiation or development of cancer, the method comprising administering an effective dose of a nitronc free radical trapping agent to a subject.
2. A method for inhibiting tumor development, the method comprising enterally administering an effective dose of an aryl N-alkyl nitronc free radical trapping agent to a subject.
3. A method for inhibiting initiation or development of cancer, the method comprising dietarily administering an effective dose of a nitronc free radical trapping agent to a subject.
4. The method of claim 1, 2 or 3 where the agent is phenyl N-tert butylnitronc, 3-hydroxyphenyl N-tert-butylnitronc, 2-hydroxyphenyl N-tert-butylnitronc, 2-sulfoxyphenyl N-tert-butylnitronc or 4-hydroxyphenyl N-tert-butylnitronc.
5. The method of claim 1, 2, or 3 where the subject has a familial history of cancer or has been exposed to a carcinogenic environment.
6. A method for inhibiting tumor development, the method comprising enterally administering an effective dose of 3-hydroxyphenyl N-tert-butylnitronc or 4-hydroxyphenyl N-tert-butylnitronc.
7. The method of claim 6 where the effective dose is from about 5 to about 60 mg/kg body wt. per day.
8. A method for inhibiting hepatocarcinogenesis, the method comprising dietarily administering to a subject an effective dose of at least one of phenyl N-tert-butylnitronc, 3-hydroxyphenyl N-tert-butylnitronc or 4-hydroxyphenyl N-tert-butylnitronc.
9. The method of claim 8 where the dietary administration is through supplementation of a food component.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

28

10. The method of claim 8 where the subject has been exposed to or infected with hepatitis B virus or hepatitis C virus.

11. The method of claim 8 where the effective amount is from about 0.005 w/w% to about 0.1 w/w % of the diet being administered.

12. A nitronic free radical trapping agent for use in the preparation of an anti-carcinogenic diet.

13. An aryl N-alkyl nitronic free radical trapping agent for use in the preparation of an anti-carcinogenic diet.

14. A 3-hydroxyphenyl N-tert-butyl nitronic or 4-hydroxyphenyl N-tert-butyl nitronic for use in the preparation of an anti-carcinogenic diet.

15. At least one of phenyl N-tert-butyl nitronic, 3-hydroxyphenyl N-tert-butyl nitronic, 2-hydroxyphenyl N-tert-butyl nitronic, 2-sulfoxyphenyl N-tert-butyl nitronic, or 4-hydroxyphenyl N-tert-butyl nitronic for use in the preparation of an anti-carcinogenic diet.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

FIG. 1

Effects of PBN on the induction of HCA, HCC and fibrosis in rats fed the CDAA diet for 70 weeks

Group	Treatments		Initial number of rats	Effective number of rats	Final body weight (g)	Relative liver weight (g/100 g body weight)	Induction of neoplastic lesions			Grade of fibrosis (Percent area occupied by collagen fiber in the specimen)				
	First 26 weeks						Last 44 weeks							
									HCA		HCC			
1	CDAA	CDAA + PBN	10	7	415 ± 27 ^d	4.45 ± 0.26 ^d	4	57.1	4	57.1	13.32 ± 1.57 ^a			
2	CDAA	CDAA + PBN	10	8	408 ± 34	4.52 ± 0.07	2	25.0 ^b	2	25.0 ^b	9.95 ± 1.17 ^b			
3	CDAA	CDAA + PBN	10	7	406 ± 58	4.40 ± 0.24	2	28.6 ^b	0	0 ^b	8.71 ± 1.12 ^b			
4	CDAA	CDAA + PBN	10	8	399 ± 39	4.23 ± 0.63	5	62.5	0	0 ^b	12.86 ± 1.65			
5	CSAA	CSAA	10	10	475 ± 31 ^b	2.90 ± 0.10 ^b	0	0 ^b	0	0 ^b	1.61 ± 0.22 ^b			
6	CSAA + PBN	CSAA + PBN	10	10	446 ± 15	3.26 ± 0.26	0	0	0	0	1.58 ± 0.13			

^a Values are presented as means ± standard deviations.^b Significantly different from the group 1 value.

1/4

WO 01/74349

PCT/US01/10508

2/4

FIG. 2

Group	Treatment(s)	Effective number of rats	Final body weight (g)	Relative liver weight (g/100 g body weight)	Average food intake (g/kg body weight /day)	Average exposure to PBN derivatives (mg/kg body weight /day)
1	CDAA	5	530 ± 52 ^a	3.81 ± 0.41	63 ± 2	0
2	CDAA + PBN, low	5	506 ± 61	3.47 ± 0.29	64 ± 3	5.74 ± 0.27
3	CDAA + PBN, middle	5	511 ± 24	4.17 ± 0.47	62 ± 2	27.90 ± 1.03
4	CDAA + PBN, high	5	505 ± 45	3.99 ± 0.54	62 ± 2	56.08 ± 2.09
5	CDAA + 4-OH-PBN, low	5	497 ± 45	4.10 ± 0.47	64 ± 3	5.76 ± 0.31
6	CDAA + 4-OH-PBN, middle	5	505 ± 24	4.05 ± 0.56	62 ± 2	27.74 ± 0.75
7	CDAA + 4-OH-PBN, high	5	509 ± 11	3.91 ± 0.52	65 ± 2	58.50 ± 1.89
8	CDAA + 3-OH-PBN, low	5	517 ± 24	4.55 ± 0.59	64 ± 1	5.76 ± 0.13
9	CDAA + 3-OH-PBN, middle	5	504 ± 26	3.89 ± 0.49	63 ± 4	28.33 ± 1.74
10	CDAA + 3-OH-PBN, high	5	520 ± 13	3.61 ± 0.67	63 ± 2	56.49 ± 1.67
11	CDAA + 2-OH-PBN, low	5	564 ± 57	3.53 ± 0.35	62 ± 3	5.62 ± 0.28
12	CDAA + 2-OH-PBN, middle	5	527 ± 38	3.97 ± 0.32	64 ± 4	28.87 ± 1.73
13	CDAA + 2-OH-PBN, high	5	524 ± 70	4.12 ± 0.43	62 ± 3	56.06 ± 2.30
14	CDAA + 2-SPBN, low	5	522 ± 23	3.55 ± 0.78	61 ± 2	5.49 ± 0.17
15	CDAA + 2-SPBN, middle	5	513 ± 10	4.00 ± 0.38	61 ± 1	27.59 ± 0.47
16	CDAA + 2-SPBN, high	5	513 ± 40	3.92 ± 0.46	63 ± 2	56.43 ± 1.82
17	CSAA	5	499 ± 59	2.67 ± 0.46 [†]	60 ± 2	0
18	CSAA + PBN, high	5	511 ± 36	3.05 ± 0.28	61 ± 3	57.61 ± 1.30
19	CSAA + 4-OH-PBN, high	5	512 ± 33	2.56 ± 0.19	62 ± 1	56.42 ± 2.48
20	CSAA + 3-OH-PBN, high	5	502 ± 25	2.59 ± 0.27	60 ± 2	57.75 ± 3.46
21	CSAA + 2-OH-PBN, high	5	488 ± 41	2.64 ± 0.31	63 ± 1	56.22 ± 2.82
22	CSAA + 2-SPBN, high	5	491 ± 36	2.68 ± 0.39	61 ± 3	56.66 ± 3.49

*The values are the means ± standard deviations.

† Significantly different from the group 1 value.

WO 01/74349

PCT/US01/10508

3/4

FIG. 3

Numbers and sizes of GST-P-positive liver lesions and levels of oxidative hepatocytic injuries

Group	Treatment(s)	Effective number of rats	GST-P-positive lesions		8-OHdG levels (/10 ⁶ cells)	TBARS levels (nmol MDA eq. /mg protein)
			Numbers (cm ²)	Sizes (mm ²)		
1	CDA	5	11.54 ± 9.25*	0.140 ± 0.111	16.76 ± 5.51	448 ± 139
2	CDA + PBN, low	5	6.45 ± 2.79	0.057 ± 0.036	2.94 ± 0.58 [†]	442 ± 54
3	CDA + PBN, middle	5	6.20 ± 2.11	0.106 ± 0.064	2.59 ± 0.30 [†]	429 ± 68
4	CDA + PBN, high	5	6.04 ± 2.63 [†]	0.027 ± 0.021 [†]	3.38 ± 0.61 [†]	235 ± 132 [†]
5	CDA + 4-OHPBN, low	5	13.58 ± 5.19	0.033 ± 0.034 [†]	3.79 ± 1.59*	272 ± 101 [†]
6	CDA + 4-OHPBN, middle	5	11.98 ± 0.99	0.027 ± 0.011 [†]	4.94 ± 2.03*	217 ± 81 [†]
7	CDA + 4-OHPBN, high	5	9.91 ± 7.57	0.025 ± 0.010*	2.73 ± 1.16 [†]	204 ± 66 [†]
8	CDA + 3-OHPBN, low	5	8.90 ± 4.01	0.165 ± 0.176	3.60 ± 1.20 [†]	411 ± 73
9	CDA + 3-OHPBN, middle	5	7.84 ± 2.81	0.067 ± 0.036	3.18 ± 0.36 [†]	457 ± 88
10	CDA + 3-OHPBN, high	5	9.39 ± 4.60	0.013 ± 0.007 [†]	3.18 ± 0.36 [†]	281 ± 55 [†]
11	CDA + 2-OHPBN, low	5	8.62 ± 3.76	0.068 ± 0.036	14.80 ± 3.74	448 ± 139
12	CDA + 2-OHPBN, middle	5	11.52 ± 3.63	0.144 ± 0.147	18.94 ± 5.10	448 ± 139
13	CDA + 2-OHPBN, high	5	7.62 ± 2.95	0.034 ± 0.013	14.46 ± 2.80	445 ± 82
14	CDA + 2-SPBN, low	5	11.46 ± 5.72	0.064 ± 0.094	16.78 ± 3.61	448 ± 139
15	CDA + 2-SPBN, middle	5	9.38 ± 1.61	0.187 ± 0.131	16.50 ± 6.01	448 ± 139
16	CDA + 2-SPBN, high	5	7.62 ± 2.88	0.061 ± 0.071	16.26 ± 6.55	424 ± 117
17	CSA	5	0	-	3.85 ± 1.52 [†]	13 ± 11 [†]
18	CSA + PBN, high	5	0	-	5.12 ± 0.81	14 ± 12
19	CSA + 4-OHPBN, high	5	0	-	3.32 ± 1.07	16 ± 10
20	CSA + 3-OHPBN, high	5	0	-	2.55 ± 1.59	12 ± 10
21	CSA + 2-OHPBN, high	5	0	-	3.44 ± 0.53	12 ± 8
22	CSA + 2-SPBN, high	5	0	-	2.27 ± 1.25	14 ± 9

*The values are the means ± standard deviations.

[†]Significantly different from the group 1 value.

4/4

FIG. 4

Apoptotic indices, proliferating indices and grade of fibrosis in the livers

Group	Treatment(s)	Effective number of rats	Apoptotic indices (%)			Proliferating indices			Grades of fibrosis (% rats considered by collagen fibers)
			In the lesions	In the surroundings	In the lesions	In the surroundings	In the lesions	In the surroundings	
1	CDAA	5	3.17 ± 0.83 ^{a†}	6.70 ± 0.43	6.36 ± 0.59 [†]	3.02 ± 0.39	3.02 ± 0.39	0.788 ± 0.280	
4	CDAA + PBN, high	5	12.75 ± 1.31 ^{†*}	2.39 ± 0.24 [#]	6.18 ± 0.35 [†]	2.70 ± 0.50	2.70 ± 0.50	0.402 ± 0.06 [±]	
7	CDAA + 4-OH-PBN, high	5	9.07 ± 1.03 ^{†*}	2.65 ± 0.65 [±]	1.99 ± 0.28 ^{†*}	1.49 ± 0.19 [±]	1.49 ± 0.19 [±]	0.485 ± 0.078 [#]	
10	CDAA + 3-OH-PBN, high	5	10.08 ± 1.28 ^{†*}	2.52 ± 0.53 [±]	5.85 ± 0.34 [†]	3.04 ± 0.40	3.04 ± 0.40	0.458 ± 0.112 [±]	
13	CDAA + 2-OH-PBN, high	5	3.48 ± 0.51 [†]	6.12 ± 0.58	6.78 ± 0.30 [†]	2.94 ± 0.49	2.94 ± 0.49	0.622 ± 0.237	
16	CDAA + 2-SPEN, high	5	2.75 ± 0.41 [†]	6.36 ± 0.33	6.20 ± 0.14 [†]	2.57 ± 0.23	2.57 ± 0.23	0.351 ± 0.155	
17	CSEA	5	-	0.22 ± 0.02 [±]	-	0.52 ± 0.16 [±]	0.52 ± 0.16 [±]	0.347 ± 0.076 [#]	

^a The values are the means ± standard deviations.[†] Significantly different from the value in the surroundings.[±] Significantly different from the group 1 value.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		National Application No. rct/US 01/10508
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K31/15 A61P35/00 A61K31/135		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, CANCERLIT		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; ENAMI, TOMONORI: "Effects of phenyl N-tert-butyl nitron and its derivatives on hepatocarcinogenesis in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet" retrieved from STN Database accession no. 134:275470 HCA XP002177357 abstract & J. NARA MED. ASSOC. (2000), 51(6), 468-482 , --- -/-	1-5, 8, 15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited in establishing the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "S" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step which the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International Search		Date of meeting of the International Search report
13 September 2001		27/09/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1818, 8018 Paludarium 2 NL - 2260 RV P.O. Box 1818 Tel: (+31-70) 340-2940, Te: NL 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3015		Authorized officer Beys, E

Form PCT/ISA290 (patent sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/10508

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; NAKAE, DAI ET AL: "Inhibition by phenyl N-tert-butyl nitrate of early phase carcinogenesis in the livers of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet" retrieved from STN Database accession no. 130:47212 HCA XP002177358 abstract & CANCER RES. (1998), 58(20), 4548-4551 ,</p>	1-5,8,15
X	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; RUSHMORE T H ET AL: "Probable free radical effects on rat liver nuclei during early hepatocarcinogenesis with a choline-devoid low methionine diet." retrieved from STN Database accession no. 88052668 XP002177359 abstract & CANCER RESEARCH, (1987 DEC 15) 47 (24 PT 1) 6731-40. ,</p>	1-5,8,15

Form PCT/AF/210 (continued from recent sheet) July 1992

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 フロイド, ロバート エイ.

アメリカ合衆国 オクラホマ 73118, オクラホマ シティ, ハーデン ドライブ 6201

(72)発明者 古武 弥成

アメリカ合衆国 オクラホマ 73162, オクラホマ シティ, ニューマン ドライブ 6823

(72)発明者 ヘンズリー, ケネス

アメリカ合衆国 オクラホマ 73071, ノーマン, エイ. クレストランド ドライブ 125

(72)発明者 中江 大

奈良県橿原市土橋町265-1-613

Fターム(参考) 4C084 AA17 MA52 NA14 ZB261 ZC022

4C086 AA01 AA02 BC60 MA01 MA04 MA52 NA14 ZB26 ZC02