

(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2004-534025

(P2004-534025A)

(43) 公表日 平成16年11月11日(2004.11.11)

| | | |
|------------------------------------|----------------|-------------|
| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
| A 6 1 K 31/09 | A 6 1 K 31/09 | 4 C 0 7 6 |
| A 6 1 K 31/223 | A 6 1 K 31/223 | 4 C 2 0 6 |
| A 6 1 K 47/20 | A 6 1 K 47/20 | |
| A 6 1 P 31/12 | A 6 1 P 31/12 | |
| A 6 1 P 31/14 | A 6 1 P 31/14 | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 106 頁) 最終頁に続く | | |

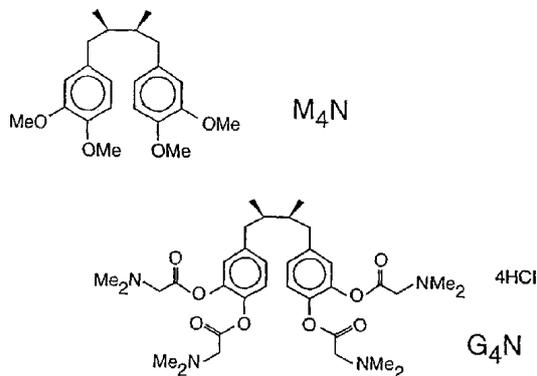
| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2002-586930 (P2002-586930) | (71) 出願人 | 501239206 |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年5月8日 (2002.5.8) | | ジョンズ ホプキンス ユニバーシティー |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成15年11月7日 (2003.11.7) | | アメリカ合衆国 メリーランド 2121 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2002/014374 | | 8, バルティモア, エヌ. チャールズ ス |
| (87) 国際公開番号 | W02002/089795 | | トリート 3400, ワイマン パーク |
| (87) 国際公開日 | 平成14年11月14日 (2002.11.14) | | センター 708エヌ |
| (31) 優先権主張番号 | 09/851, 425 | (74) 代理人 | 100078282 |
| (32) 優先日 | 平成13年5月9日 (2001.5.9) | | 弁理士 山本 秀策 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (74) 代理人 | 100062409 |
| | | | 弁理士 安村 高明 |
| | | (74) 代理人 | 100113413 |
| | | | 弁理士 森下 夏樹 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ノルジヒドログアヤレティック酸誘導体を使用して腫瘍を処置するための方法

(57) 【要約】

本発明は、ノルジヒドログアヤレティック酸 (nordihydroguaiaretic acid) 誘導体の使用、特に、腫瘍およびウイルス感染の処置のために、天然に存在するアミノ酸の置換物を含む誘導体の使用に関する。動物、特に、哺乳動物、そして最も特に、ヒトの癌性腫瘍および非癌性腫瘍の処置における使用のための、化合物および組成物を提供することが、本発明の一つの目的である。本発明のこの局面に従って、腫瘍の増殖を阻害する、新規なノルジヒドログアヤレティック酸誘導体が提供される。ノルジヒドログアヤレティック酸誘導体は、式 (I) の化合物であって、ここで、 R_1 、 R_2 、 R_3 および R_4 は、独立して、 $-OH$ 、 OCH_3 、 $-O(C=O)CH_3$ 、またはアミノ酸残基を表すが、各々は、同時に $-OH$ ではない化合物である。

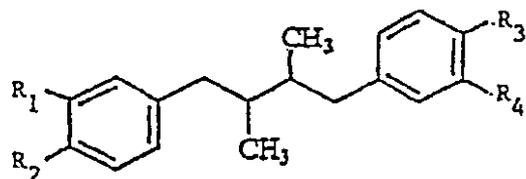


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

真核生物の細胞周期におけるサーベリンの生成を阻害する方法であって、該方法は、有効量の以下の式の化合物：

【化 1】



10

を投与する工程を包含し、ここで、 R_1 、 R_2 、 R_3 および R_4 は、独立して、 $-OH$ 、 OCH_3 、 $-O(C=O)CH_3$ 、またはアミノ酸残基を表すが、各々は、同時に $-OH$ ではない、方法。

【請求項 2】

前記細胞が動物細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 4】

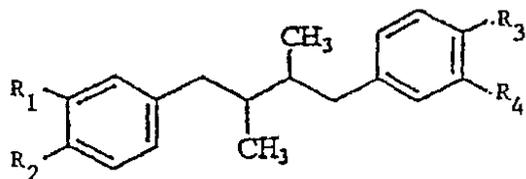
前記細胞がヒト細胞である、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 5】

CDC-2 およびサーベリンを発現する細胞においてアポトーシスを刺激する方法であって、該方法は、有効量の以下の式の化合物：

【化 2】



30

を投与する工程を包含し、ここで、 R_1 、 R_2 、 R_3 および R_4 は、独立して、 $-OH$ 、 OCH_3 、 $-O(C=O)CH_3$ 、またはアミノ酸残基を表すが、各々は、同時に $-OH$ ではない、方法。

【請求項 6】

前記細胞が動物細胞である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 6 に記載の方法。

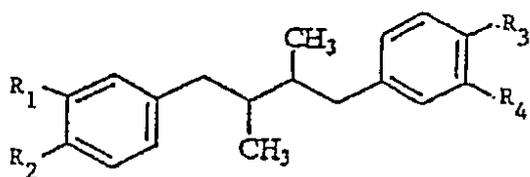
【請求項 8】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

腫瘍を処置するための方法であって、該方法は、有効量の以下の式の化合物：

【化 3】



40

の適用を包含し、ここで、 R_1 、 R_2 、 R_3 および R_4 は、独立して、 $-OH$ 、 OCH_3 、 $-O(C=O)CH_3$ 、またはアミノ酸残基を表すが、各々は、同時に $-OH$ ではない

50

、方法。

【請求項 10】

前記腫瘍が哺乳動物中に存在する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記腫瘍が悪性である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記腫瘍が良性である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記腫瘍が、乳頭腫、奇形腫および腺腫からなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

10

【請求項 14】

前記腫瘍が固形腫瘍である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

前記腫瘍が形質転換された細胞から誘導される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 17】

前記細胞が C3 細胞である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記化合物が、少なくとも 1 種の薬学的に受容可能な賦形剤またはキャリアとともに投与される、請求項 9 に記載の方法。

20

【請求項 19】

前記賦形剤またはキャリアがジメチルスルホキシドである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記誘導体が、テトラ - O - メチルノルジヒドログアヤレティック酸、またはテトラグリシニルノルジヒドログアヤレティック酸である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 21】

テトラグリシニルノルジヒドログアヤレティック酸が、少なくとも 1 つの薬学的に受容可能な賦形剤またはキャリアとともに投与される、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本明細書中に記載され、そして特許請求される発明は、National Institutes of Health の Grant No. AI 32301 および U. S. Army Medical Research Grant DAMD 17-93-C3122 からの財源により一部的なされた。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

40

(1. 発明の分野)

本発明は、ノルジヒドログアヤレティック酸 (nordihydroguaiaretic acid) 誘導体の使用、特に、腫瘍およびウイルス感染の処置のために、天然に存在するアミノ酸の置換物を含む誘導体の使用に関する。

【0003】

(2. 背景情報)

発癌は、種々の遺伝的因子および後成的因子によって影響される多段階事象であり、そして異なる組織から生じる未制御細胞増殖の発生によって代表される。抗癌研究のための普遍的な目的は、腫瘍増殖の減縮、宿主に対する非毒性に高度に効率的であり、そしてほとんどの患者のために提供可能である、臨床的処置の開発にある。分裂した細胞に対して特

50

有である標的の阻害に焦点を当てた薬物は、実質的な副作用の危険性のない効率的な化学療法剤であるべきである。

【0004】

細胞が細胞周期を通じて進行する場合、細胞は、多くのチェックポイントを通過する。これらのチェックポイントの各々を通過させるために、特定の基準を満たさなければならない。G2/M移行において、ほとんどの本質的なレギュレーターは、サイクリン依存性キナーゼCDK2である。このキナーゼは、調節性タンパク質サイクリンBに密に結合し、そして成熟促進因子(MPF)とも呼ばれるこの複合体は、細胞が初期前期に入ること導く種々の事象を刺激することを担う(1)。驚くことではないが、MPFのいずれかの成分の損失または不活化は、G2以外の細胞の進行をブロックする。

10

【0005】

MPFの発現および活性は、異なるレベルで調節される。サイクリンBのタンパク質のレベルは、細胞サイクルのG1期およびS期を通じてゆっくりと上昇し、G2期からM期への移行の間にピークに達し、そして有糸分裂の間に急激に低下する(2)。一方、このCDK2タンパク質は、細胞サイクルの間に常に存在するが、そのレベルは、G2期の最終段階においてわずかに上昇する(3)。タンパク質の活性は、適切なサイクリンとの会合、およびホスファターゼCDK25Cによる抑制部位のその脱リン酸化に依存する(4, 5)。この脱リン酸化の不全は、放射または化学作用によるDNA損傷に反応してG2の停止を開始する。最近の証拠により、任意の残存する活性CDK2が、DNAを損傷後に、核の外側に輸送されることも示唆されている(6)。

20

【0006】

多数の天然に存在する植物リグナンノルジヒドログアヤレティック酸(NDGA)誘導体は、ウイルス転写の阻害を介してウイルスの複製をブロックすることが示されている。この初期の研究は、NDGA誘導体(Larrea tridentataから元々単離され、続いて化学的に合成される)は、それらのSp1依存性プロモーターの脱活性による、HIV(7, 8)、HSV(9)およびHPV転写(10)の産生を阻害し得る。予想外に、これらの誘導体の一つ(テトラ-O-メチルNDGA)はまた、哺乳動物の細胞株における細胞周期の停止を誘導するようである。本明細書の以下に示される証拠は、M₄Nが、毒性が検出されることなく、哺乳動物細胞中でG2停止を誘導し得ることを実証し、そしてこの停止が、サイクリン依存性キナーゼCDK2の阻害に起因するという見方を支持する。

30

【0007】

ヒト乳頭腫ウイルス属(HPV)感染は、多くの型の扁平上皮細胞において未調節の細胞増殖を生じさせ、良性のパリオマエ(papilloma)癌(いぼ)から子宮頸癌、陰茎癌および口腔癌までの範囲の苦痛を生じる。これらの癌とHPVとの強力な会合および感染の広範な発生は、抗HPV治療の開発の重要性を示す。

【0008】

全てではないが、これらの複製活性変異体を含むほとんどのウイルスは、宿主依存性である。これらは、ウイルス増殖を支持するための特定の細胞因子の関与を必要とする。宿主細胞因子(ウイルスタンパク質ではない)は、変異圧力下にはなく、一般的に構造的に不変である。従って、ウイルスのライフサイクルの異なる段階において、これらの細胞因子の利用をブロックする化合物は、変異不感受性抗ウイルス薬物として良好な候補物であるようである。HIV-1の阻害に対する代替の標的として細胞因子を使用する種々の研究が、概説されている(11)。

40

【0009】

本出願人は、Creosoteブッシュ(Larrea tridentata)から単離された3'-O-メチル化NDGA(すなわち、Mal.4)が、ヒト細胞培養物中の、基礎のHIV転写、Tat-調節トランス活性化、およびHIV複製を特異的にブロックし得ることを、以前に報告している(8, 12, 13)。Mal.4は、転写因子Sp1のHIVプロウイルステンプレートのプロモーターへの結合に干渉することによって、

50

その影響を及ぼす。M a l . 4 の標的を、ヌクレオチド - 8 7 ~ - 4 0、H I V 長末端リピート (L T R) の S p 1 結合部位にマッピングする。未改変 N D G A は、インビトロで、H I V 転写を阻害せず、そして S p 1 結合上において影響を有さない (8)。

【 0 0 1 0 】

しかし、植物リグナンの単離および精製は、労働集約的であり、コストがかかる。ヒトにおける S p 1 により調節されたウイルスおよび腫瘍増殖の制御において、植物リグナンの可能な臨床学的使用を見越して、9種の異なるメチル化 N D G A 活性体を、親基質として非メチル化 N D G A を化学的に使用して、低いコストで大量に合成した (7)。3 0 μ M 未満の薬物濃度において、テトラ - O - メチル N D G A は、S p 1 により調節されたプロウイルス転写およびトランス活性化の阻害を介した複製 H I V の制御において最も有効であることが見出された (7)。この研究は、単純疱疹ウイルス (H S V - 1 および H S V - 2) の増殖の制御に拡大されて以来である (9)。単純疱疹最初期 (I E) I C P 4 遺伝子は、H S V 複製のために必要不可欠である (1 4)。そのプロモーター領域は、8つの S p 1 コンセンサス結合部位 (1 5) を有し、それらの5つは、I C P 4 遺伝子発現のために必要とされる。従って、I C P 4 遺伝子は、このような試験のための良好な候補物となる。本出願人は、3 - O - メチル N D G A (M a l . 4) とテトラ - O - メチル N D G A (M 4 N) との両方が、電気泳動移動シフトアッセイによって示されるように、I C P 4 プロモーターに結合する S p 1 タンパク質のプロッキングを介した、V e r o 細胞中での H S V I C P 4 遺伝子発現のための効率的な転写インヒビターであることを見出した (9)。

10

20

【 0 0 1 1 】

M 4 N および M a l . 4 の抗 H S V 活性を試験して、そして感染された V e r o 細胞中のアシクログアノシン (アシクロビル、A C V) の活性と比較したとき、本出願人は、H S V - 1 の 1 0 回の継代および H S V - 2 の 4 回の継代に関して、より高い薬物濃度の必要性のための明確な上昇傾向なしに、M 4 N の I C 5 0 が、1 1 . 7 μ M と 4 μ M との間で変化することを観察した。しかし、A C V の I C 5 0 は、7 μ M (1 回目のウイルス継代) ~ 4 4 4 μ M (H S V - 1 の 1 0 回目の継代)、そして 8 8 μ M を超える (H S V - 2 の 4 回目の継代) まで増加し、V e r o 細胞における A C V に対する薬物耐性の迅速な構築を示した。結果として、選択インデックス S . I . (T C 5 0 / I C 5 0) は、M 4 N に対して比較的安定なままであるが、A C V に関する S . I . は、6 0 倍落ちて、続いてウイルスは、V e r o 細胞中で継代される (9)。従って、M 4 N は、変異非感受性薬物である。この M 4 N は、A C V 耐性 H S V を効率的に阻害し得る (9)。

30

【 0 0 1 2 】

S p 1 が重要な細胞転写因子であるという事実 (1 6) に起因して、S p 1 により制御された細胞遺伝子の発現における化合物のこのクラスの可能な阻害効果が、取り込まれるべきである。一旦、M a l . 4 が、この結合部位に安定に結合されると、M a l . 4 は、S p 1 を置換し得ない (8)。従って、N D G A 誘導体は、静止細胞中の S p 1 により調節されたハウスキーピング遺伝子の発現よりも、増殖細胞中での S p - 1 により調節された遺伝子においてより効果を有するようであった。前者の場合、この薬物は、D N A 合成の間に、遺伝子プロモーターの S p 1 部位に対して S p 1 タンパク質と競合し得るが、後者の場合、この薬物は、ハウスキーピング遺伝子の転写クロマチン上において、それらのプロモーターに既に安定に結合した S p 1 タンパク質とほとんど影響を有し得ない。実際に、このことは、この場合に示されている。以下に示されるように、9 6 0 0 発現遺伝子を用いた遺伝子アレイ研究を使用することによって、本出願人は、ほとんどの S p 1 によって調節された遺伝子の産物が、類似レベルのままであり、そして培養物中での子宮頸癌細胞 C 3 の薬物処理によって影響されないことを見出した (図 5)。それでさえ、M 4 N の比較的低い選択インデックスは、この薬物が全身に使用されなければならない場合、最も低い有効濃度まで、その使用が確実に制限される。一方、ヒトの乳頭腫ウイルスは、最初に、H P V E 6 E 7 遺伝子の S p 1 により調節された発現を介して、固形の子宮頸腫瘍および経口腫瘍を誘導する (1 7)。本出願人は、薬物がインサイチュで送達され得、そ

40

50

して腫瘍領域のみで保持され得る場合、高濃度の薬物を使用して、患者にほとんど損傷なしで、腫瘍を効率的に破壊し得ると判断した。

【0013】

サービピン (survivin) は、正常な成人のヒト組織中ではなく、多くのヒトの癌において大量に発現されるアポトーシスのインヒビターであり (35)、そして細胞死/細胞の生存の最終のエフェクター期の可能なモジュレーターと考えられる (36)。サービピンは、細胞周期依存性様式において $G_2 - M$ において発現され、紡錘体の微小管に直接結合する。Thr 34 上のサービピンのリン酸化は、細胞分裂 (37) において細胞の生存度を維持するために必要とされ得るようであり (37)、そしてリン酸化 - 不完全サービピン変異体の発現により、数種のヒト黒色腫細胞株におけるアポトーシスを引き起こすことが示されている (38)。リン酸化サービピンは、カスパーゼ経路上で作用し、カスパーゼ - 3 およびカスパーゼ - 9 の形成を抑制し、これによってアポトーシスを阻害する (参考文献 39、第 10 頁には、アポトーシスシグナル伝達経路の概略が示されている)。従って、サービピンの発現を減少させる化合物が、アポトーシスおよび細胞死の割合を増加させると予想される。CDC - 2 は、サービピンのリン酸化のために必要とされることが示されている (37)。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0014】

従って、動物、特に、哺乳動物、そして最も特に、ヒトの癌性腫瘍および非癌性腫瘍の処置における使用のための、化合物および組成物を提供することが、本発明の一つの目的である。本発明のこの局面に従って、腫瘍の増殖を阻害する、新規なノルジヒドログアヤレティック酸誘導体が提供される。

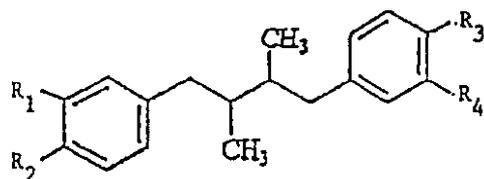
20

【0015】

ノルジヒドログアヤレティック酸誘導体は、以下の構造の化合物：

【0016】

【化 4】



30

(I)

を意味し、ここで、 R_1 、 R_2 、 R_3 および R_4 は、独立して、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 、 $-O(C=O)CH_3$ 、またはアミノ酸残基を表すが、各々は、同時に $-OH$ ではない。アミノ酸置換基は、特に、以下を含むことが意図される：アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパルテート、システイン、グルタメート、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、5 - ヒドロキシリジン、4 - ヒドロキシプロリン、チロキシン、3 - メチルヒスチジン、 $-N$ - メチルリジン、 $-N$ 、 N 、 N - トリメチルリジン、アミノアジピン酸、 $-$ カルボキシグルタミン酸、ホスホセリン、ホスホトレオニン、ホスホチロシン、 N - メチルアルギニン、および N - アセチルリジン。

40

【0017】

本発明に従う使用のための特に好ましい化合物は、 $M_4 N$ および $G_4 N$ であり、これらは、図 1 に示される。

【0018】

50

これらの新規の誘導体の使用によって、および当該分野で公知だが、腫瘍の処置のために以前に使用されることがない類似の誘導体によって、癌性腫瘍および非癌性腫瘍を処置するための方法を提供することが、本発明のさらなる目的である。この方法は、サイクリン依存性キナーゼCDC2を含む、迅速に増殖する細胞型に対して、特に有用である。真核生物、特に、動物の細胞、より特に、哺乳動物の細胞、および最も特に、ヒトの細胞の細胞周期において、CDC2を阻害する方法を提供することが、本発明のさらなる目的である。

【0019】

処置されるべき腫瘍としては、本発明の方法に従って使用される上記の化合物に感受性である任意の腫瘍が挙げられる。特に、これには、サイクリン依存性キナーゼCDC2サイクルの阻害に対して感受性である、迅速に分裂する癌性腫瘍および良性腫瘍が挙げられる。

10

【0020】

用語「癌性腫瘍」とは、転移を受けても受けなくてもよい任意の悪性腫瘍を含むことが意図される。用語「非癌性腫瘍」とは、任意の良性腫瘍を含むことが意図される。これらの当業者によって通常理解されるような用語が、使用される。

【0021】

本発明の組成物および方法によって処置され得る、良性腫瘍および悪性腫瘍の例は、Cancer Biology (Raymond W. Ruddon, Cancer Biology, 第3版, Oxford Univ. Press, 1995 (本明細書中で参考として援用される))の表1-1に見出され得る。処置される腫瘍としては、ウイルス起源である公知の腫瘍、およびウイルス起源でない腫瘍が挙げられる。本発明の組成物および方法は、固形腫瘍の処置において特に有用であることが期待される。

20

【0022】

サイクリン依存性キナーゼCDC2サイクルを阻害する方法を提供することが、本発明のなお別の目的である。この方法は、細胞の増殖、特に迅速に分裂する細胞型の増殖を阻害するのに有用である。

【0023】

好ましい実施形態において、本明細書中に記載される化合物および組成物は、HPV誘導腫瘍の処置において使用される。HPV誘導腫瘍としては、特に、HPV感染に関連する、子宮頸(cervical)癌、経口癌、陰茎癌、頭部癌および頸部(neck)癌が挙げられるが、これらに限定されない。この方法は、癌性および非癌性のHPV誘導腫瘍に対する、ノルジヒドログアヤレティック酸誘導体、特に、テトラ-O-メチルノルジヒドログアヤレティック酸(M₄N)およびテトラグリシナルノルジヒドログアヤレティック酸(G₄N)の局所適用が挙げられる。

30

【0024】

アミノ酸置換基を含む式Iの化合物の投与によって、ウイルスの複製および増殖を阻害する方法を提供することが、本発明のなお別の目的である。この方法における使用のために、アミノ酸置換基R₁、R₂、R₃およびR₄が同一である化合物が、好ましい。

【0025】

サービピンを発現する細胞、特に癌細胞中で、真核細胞周期におけるサービピンの生成を阻害する方法を提供することが、本発明のさらなる目的である。本発明者らは、本発明のノルジヒドログアヤレティック酸誘導体がサービピンmRNAおよびタンパク質レベルを下方制御し、CDC-2経路とカスパーゼ経路との両方を活性化し、これによって、サービピンが発現される細胞集団におけるアポトーシスのレベルを増加させることを見出した。この方法は、サービピンの発現を抑制または排除し、これによってアポトーシスの速度を増大させることによって、サービピンが発現される、腫瘍の処置を提供する。

40

【0026】

M₄N、G₄Nおよび他の誘導体が、一般的に薬学的に受容可能な希釈剤、賦形剤およびキャリアと共に、腫瘍への局部注射により投与されることが企図される。好ましい実施形

50

態において、M₄Nは、DMSO溶液の形態で腫瘍に注射され、そしてG₄Nは、PBS溶液で投与される。G₄Nの使用は、特に大きな腫瘍 (> 2 cm³) において、M₄Nの使用を補い、その水溶性に起因して、腫瘍のより広い領域に広がることを可能にする。他の水溶性ノルジヒドログアヤレティック酸誘導体および水に不溶性のノルジヒドログアヤレティック酸誘導体は、本発明に従って、同様に使用され得る。当該分野で公知であり、かつ使用されるように、これらはまた、全身送達のための脂質ベースの処方物において使用され得る。

【0027】

薬学的に受容可能な希釈剤、賦形剤およびキャリアとは、M₄N、G₄Nおよび他の誘導体と適合性であり、かつ本発明に従うヒトまたは他の哺乳動物への局部投与に適切であると当業者に理解されるような化合物を意味する。本明細書以下の実施例は、局部注射による投与を記載するが、他の局部投与手段 (例えば、局所適用または腫瘍部位への標的化された送達) もまた使用され得る。

10

【0028】

所望の処置効果を得るために投与される化合物の量は、変動するが、当業者により容易に決定され得る。投薬量、投与の頻度および処置の長さは、状況、主に腫瘍の大きさおよび型に依存する。しかし、毎日から毎週の間隔またはより少ない頻度で、M₄N単独かまたは同様の量のG₄Nと共に腫瘍重量1グラムあたり10 mg ~ 20 mgの投薬量は、例示の目的で記述され得る。単独かまたはG₄Nと組み合わせて、200 mg/mlの濃度でDMSO中に溶解された50 μl ~ 100 μlのM₄Nの投与は、1 ~ 1.5 cm³の腫瘍の多くの場合に有効であると予測される。

20

【0029】

(発明の詳細な説明)

実験方法

NDGA誘導体を、化学的に合成した[7]。細胞株C3は、W. Martin Kast of Loyola University Medical Center, Chicago, Illinois, U.S.A.により提供されたC57 BL/6kh起源の、HPV16E+Lおよび活性化Ras形質転換細胞株である。これは、Greenstoneら(18)およびFeltkampら(19, 20)に記載されるように、維持され、そして培養される。

30

【0030】

G₄Nの合成:

meso-1, 4-ビス[3, 4 (ジメチルアミノアセトキシ)フェニル]-(2R, 3S)-ジメチルブタン塩酸塩テトラグリシニルNDGA (G₄N)の調製についての標準的な手順。NDGA (12.8 g、42.3 mmol、1.0当量)およびN,N'-ジメチルグリシン(26.2 g、254 mmol、6.0当量)を含有するジクロロメタン(250 ml)溶液に、DCC (52.4 g、254 mmol、6.0当量)およびDMAP (2.32 g、18.9 mmol、1.0当量)を添加した。この反応混合物を24時間窒素下にて室温で攪拌した。この反応混合物を濾過した後、この溶液を減圧下で濃縮した。次いで、反応フラスコにアセトン(250 ml)を添加し、そしてその溶液に過剰のHCl(g)をバブリングした。水溶性の沈殿物を、H₂Oに溶解し、そして室温でアセトンから2回再沈殿させて、(1) (29.2 g、36.8 mmol)を、白色固体として収率87%で得た。プロトンNMRスペクトルを、D₂O溶媒およびTSPを内部標準として使用することによりVarian Unity-400 (400 MHz)分光計で得た。炭素-13 NMRスペクトルを、Varian Unity 400 (400 MHz)で、D₂Oを溶媒として使用することにより得た。炭素-13化学シフトは、TSP一重線(0.0 ppm)を参照する。

40

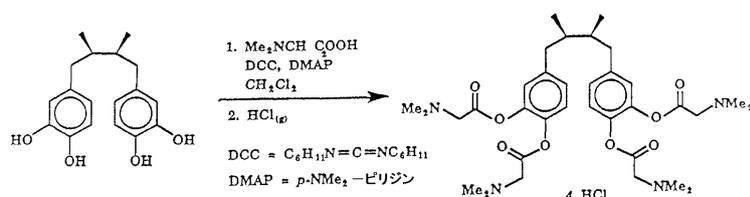
【0031】

この合成をスキーム1に示す。

【0032】

50

【化5】



10

一般的手順。他に示さない限り、全ての反応を、オーブンで乾燥したガラス器具（120）中で窒素雰囲気下にて行った。アセトン、ジクロロメタン、1,4-ジオキサン、酢酸エチル、ヘキサンおよびテトラヒドロフランを、Mallinckrodt Chemical Coから購入した。アセトンを、4Åモレキュラーシーブで乾燥して蒸留した。ジクロロメタン、酢酸エチル、およびヘキサンを乾燥し、そして CaH_2 から蒸留した。1,4-ジオキサンおよびテトラヒドロフランを、ナトリウムおよびベンゾフェノンから窒素雰囲気下で蒸留することにより乾燥した。ノルジヒドログアヤレティック酸を、Fluka Chemical Coから購入した。N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、4-ジメチルアミノピリジン（DMAP）、モルホリン、トリエチルアミン、および炭酸カリウムを、Merck Incから購入した。1-ブromo-3-クロロプロパン、N,N-ジメチルグリシン、およびメチルホスホロジクロリデートをAldrich Chemical Coから購入した。

20

【0033】

分析用薄層クロマトグラフィー（TLC）を、Merck Incから購入したプレコートプレート（silicagel 60 F-254）で行った。ガスクロマトグラフィー分析を、25-m架橋メチルシリコーンゴムキャピラリーカラム（内径0.32mm）を備えたHewlett-Packard 5890 Series II機器で行った。窒素ガスをキャリアガスとして使用し、そして流量を14.0ml/分に一定に保った。保持時間（ t_R ）を、以下の条件下で測定した：インジェクター温度260、等温カラム温度280。ガスクロマトグラフィーおよび低分解能質量分析を、Hewlett-Packard 5971A質量選択的検出器およびキャピラリーHP-1カラムを備えたHewlett-Packard 5890 Series II機器で行った。中圧液体クロマトグラフィー（MPLC）による分離を、Jasco Model 880-PUインテリジェントHPLCポンプを使用することにより120ml/hの流量で行った。MPLC充填材であるReversed Phase Silica Gel C18（粒径0.035~0.070mm）を、Knauer Coから購入した。Merck Reagents Silica Gel 60（粒径0.063~0.200mm、70-230mesh ASTM）を使用することにより、重力カラムクロマトグラフィーによる精製を行った。

30

【0034】

赤外（IR）スペクトルを、Bomem Michelson Series FT-IR分光計で測定した。報告される波数は、ポリスチレンの 1601 cm^{-1} の吸収を基準とする。吸収強度を、以下の略語により記す：s、強い；m、中程度；w、弱い。プロトンNMRスペクトルを、 D_2O を溶媒として使用し、そして3-(トリメチルシリル)プロピオン酸ナトリウム塩を内部標準として使用することにより、Varian Unity-400（400MHz）分光計で得た。炭素-13 NMRスペクトルを、 D_2O を溶媒として使用することによりVarian Unity-400（100MHz）分光計で得た。炭素-13化学シフトは、3-(トリメチルシリル)プロピオン酸ナトリウム塩の一重線（60.0ppm）の中心を基準とする。多重度を、以下の略号により記録する：s、一重線；d、二重線；t、三重線；q、四重線；m、多重線；J、結合定数（ヘ

40

50

ルツ)。高分解能質量スペクトルを、J E O L J M S - H X 1 1 0 質量分析計により得た。meso-1,4-ビス[3,4-(ジメチルアミノアセトキシ)フェニル]3S-ジメチルブタン(meso-1,4-Bis[3,4(dimethylaminoacetoxy)phenyl]3S-dimethylbutane)塩酸塩(2)。NDGA(1,12.81g、42.37mmol、1.0当量)およびN,N-ジメチルグリシン(26.21g、254.2mmol、6.0当量)のジクロロメタン(250ml)溶液に、DCC(52.45g、254.2mmol、6.0当量)およびDMAPI(5.176g、42.37mmol、1.0当量)を添加した。この反応混合物を24時間窒素下で室温にて攪拌した。この反応混合物中のジシクロヘキシル尿素を濾別した後、得られた溶液を減圧下で濃縮した。次いで、アセトン(250ml)を残渣に加え、そして得られた溶液を過剰のHCl(g)でパブリングした。沈殿物を水に溶解し、そして室温でアセトンを使用することにより再沈殿させて、2(28.97g、36.86mmol)を白色固体として収率87%で得た：

10

【0035】

【数1】

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ 0.78 (d, J = 6.0 Hz, 6 H, 2 x CH₃), 1.73 (m, 2 H, 2 x CH), 2.38 (dd, J = 13.2, 9.6 Hz, 2 H, 2 x ArCH), 2.78 (dd, J = 13.2, 4.4 Hz, 2 H, 2 x ArCH), 3.03 (s, 24 H, 8 x Cl₃N), 4.53 (s, 8 H, 4 x CH₂N), 7.22 (m, 4 H, 4 x ArH), 7.29 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, 2 x ArH); ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz) δ 18.11, 40.82, 41.73, 46.75, 59.59, 125.79, 126.58, 131.63, 140.66, 142.47, 146.11, 167.84; IR (KBr) 3461 (br), 2963 (m), 1777 (s, C=O), 1620 (m), 1478 (m), 1377 (m), 1210 (m), 1106 (m), 961 (w), 852 (w) cm⁻¹; MS (FAB) of (2-4 HCl) m/z (相対強度) 643 (M+, 30), 600 (20), 558 (43), 515 (20), 473 (42), 430 (13), 388 (26), 185 (18), 93 (38), 58 (100), 44 (22); HRMS (FAB) (2-4 HCl) C₃₄H₅₀N₄O₈ 計算値 642.3628, 実測値 642.3614; 元素分析 C₃₄H₅₄N₄O₈Cl₄ 計算値 : C, 51.78; H, 6.90; N, 7.10; O, 16.23. 実測値 : C, 51.70; H, 6.85; N, 7.05; O, 16.21.

20

30

他のN,N-ジメチル置換アミノ酸の適切な置換により、本発明のさらなるアミノ酸置換化合物が合成され得ることが理解される。

【実施例】

【0036】

(実施例1)

(SP1調節HPV E₆/E₇プロモーター活性についてのM₄Nおよびいくつかの他のNDGA誘導体の効果)

40

SP1調節HPV E₆E₇プロモーター活性についてのM₄Nおよびいくつかの他のNDGA誘導体の効果を、レポーターとしてルシフェラーゼを使用して調べた。このアッセイは、リン酸カルシウム方法による、C33A細胞中への、ルシフェラーゼレポーター遺伝子に融合されたHPV16LCR(P₉₇プロモーター)のDNAトランスフェクションに依存する。C33Aは、任意の組み込まれたHPV DNAを含まないが、HPV初期遺伝子プロモーターの強い(robust)発現に必要な転写因子を有する、頸部腫瘍細胞株(ATCC受託番号HTB-31)である。DNAトランスフェクションの1日後、ジメチルスルホキシド(DMSO)を用いて溶解された種々の薬物濃度を、この細胞に添加した。薬物処理の30時間後(その結果、このアッセイは、一過性トランスフェクシ

50

ョン実験に標準的な48時間以内に完了する)、この細胞を溶解し、そして特異的なルシフェラーゼ活性を決定した(Luciferase Assay Systems, Promega、米国特許第5,283,179号)。M₄N薬物濃度が増加するにつれて、特異的なルシフェラーゼ活性は、減少した。

【0037】

結果(図2に示される)は、M₄Nが、ルシフェラーゼアッセイにおいて、HPV E₆/E₇プロモーターにおけるSp1調節転写開始を劇的に減少することを実証する。

【0038】

(実施例2)

(M₄N処理に続く、E₆/E₇mRNA合成の阻害)

M₄N処理に続く、E₆/E₇mRNA合成の阻害を、頸部細胞株C₃において、RT-PCRによって測定した。相対的RT-PCRを、計数された細胞数に対して正規化した全細胞RNAの量を用いて実施した。RT-PCR産物を、2%アガロースゲルで分析した。この結果を図3に示す。RT-PCRの結果は、E7(321bp)およびE6(204bp)についての予期されたサイズの増幅されたcDNAが、増幅のサイクル22という早さで、DMSO処理された細胞において検出されたことを示した。これらの同じ産物は、増幅の30サイクルに続いて、薬物処理されたRNA抽出物において、ほとんど検出可能でなかった。増幅された産物は、プレート無しPCRコントロールについても、HPV16ネガティブC33a細胞株の全RNA抽出物からも、検出されなかった。

【0039】

(実施例3)

(M₄N処理による頸部C₃細胞増殖の阻害)

HPV-16形質転換不死化マウス上皮細胞(C₃細胞)を、1バイアル当たり10⁵個の細胞密度でプレートした。24時間後、バイアルの1/2に、1%DMSO中に溶解された40μM M₄Nを含む増殖培地を与え、一方、他の半分は、1%DMSOのみを含む増殖培地を与えた。この結果を図4Aに示す。24時間以内に、薬物処理されたC₃細胞とコントロールC₃細胞との間の細胞形態学的差異が観測された。薬物処理された細胞の増殖および分裂は、未処理コントロールと比較して顕著に減少し、一方、全細胞数と比較した生存可能な細胞の割合は、薬物処理された細胞とDMSOのみのコントロール細胞との両方について一定のままであった。これは、M₄Nが細胞分裂を劇的に減少することを示す。

【0040】

培地からのM₄Nの除去に続くC₃増殖の効果もまた、調べた。C₃細胞を、1つのバイアル当たり10⁴個の細胞の密度でプレートした。時間=0において、バイアルの2/3に、1%DMSO中40μMのM₄Nを補充した増殖培地を与えた。残りのバイアルに、1%DMSOのみを含む増殖培地を与えた。73時間後、増殖培地においてM₄Nを与えられたバイアルの1/2を洗浄し、そして1%DMSOのみを含む培地を加えた。この細胞バイアルの他の2/3を洗浄し、そして以前に投与された培地と同じ培地で置換した。この結果(図4Bに示される)は、細胞増殖の速度が、薬物を含まない培地への変化に続くM₄N処理サンプルにおいて、顕著に増加しなかったことを示し、このことは、細胞外膜環境からの除去後でさえ、M₄Nが細胞分裂を有意に減少し続けることを示す。

【0041】

(実施例4)

(薬物処理前および薬物処理の72時間後の、C₃細胞における細胞遺伝子発現の分析)

9600遺伝子アレイを用いた遺伝子発現を研究した(図5)。72時間M₄N(40μm)処理(C₃ M₄N)および未処理(C₃ DMSO)からのそれぞれ5μgのポリA⁺RNAを、Genomics 51,313-324 1998に記載される手順に従って、一対のヒト9600遺伝子アレイハイブリダイゼーション研究において使用した。ハイブリダイゼーション画像を、Nikon 55mm AFマイクロNikoreレンズを備えるカラービデオカメラによって撮り、そしてMacintosh LC630コンピ

10

20

30

40

50

ュータによってデジタル化した。単一カラーモードまたは2重カラーモードのいずれかでの色形成酵素の酵素基質反応によるこのような検出は、再現可能であり、そして非常に感受性である（ 10^7 個の細胞から、RNAを用いて、1細胞当たり5未満のコピーの転写物を検出し得る）。

【0042】

差示的に発現された遺伝子（ C_3 M_4 N / C_3 $DMSO > 10$ および C_3 $DMSO / C_3$ M_4 $N > 10$ ）を示すコンピュータープリントアウトを、試験のために列挙する。TIFF形式の画像ファイルおよびMSエクセル形式のデータファイルは、ZIPディスクで保持される。遺伝子名およびクローンID番号は、将来のノザンブロット確認のための画像クローンを得るために利用可能である。

10

【0043】

M_4 N 処理の72時間後、アップレギュレートされるかまたはダウンレギュレートされるかのいずれかである遺伝子の群のうち、以下は、細胞分裂およびアポトーシスに特に関連する遺伝子である。いくつかの他の細胞周期関連遺伝子はまた、 M_4 N に反応して非常にアップレギュレートされる。サイクリン依存性キナーゼCDC2（実施例11）に加えて、例えば、以下である：

| | 増加 |
|--------------------|--------|
| サイクリン依存性キナーゼインヒビター | (100倍) |
| アポトーシス (APO-1) 抗原 | (100倍) |
| 死ドメイン3DR3 | (100倍) |
| Ras関連タンパク質RAP-1 | (60倍) |
| ヒトマップキナーゼ | (40倍)。 |

20

【0044】

以下の細胞周期関連遺伝子は、 M_4 N に反応して、非常にダウンレギュレートされる：

| | 処理 | 未処理 |
|-------------------|------|-------|
| サイクリン依存性キナーゼ7 | (5%) | 100% |
| ヒトサイトカインレセプター | (2%) | 100% |
| 増殖細胞核抗原、PCNA | (1%) | 100% |
| ヒトTNF関連アポトーシスAPO2 | (3%) | 100% |
| システインプロテアーゼ | (7%) | 100%。 |

30

【0045】

より初期の時点（例えば、薬物処理の1時間後）で、 E_6 / E_7 レベルは、コントロール細胞の E_6 / E_7 レベルと類似することが見出されたが、一方、4.5時間後、 E_6 / E_7 は、RT-PCRによってもはや検出可能でなかった（10）。9600遺伝子アレイを用いる遺伝子発現は、薬物の最初の細胞効果をさらに抑えるために、これらの短時間処理細胞（1時間および5時間）から単離されたRNAを用いて繰り返され得る。

40

【0046】

（実施例5）

（ M_4 N の局所注入によるマウスにおける C_3 腫瘍増殖の標的化）

36匹の C_57 $b1 - 16$ NCR マウスに、マウスの背側の肩の間に、 5×10^5 個の C_3 細胞を注射した。24匹のマウスが、20日以内に腫瘍を発生した。毎日の注射（ $50 \mu l \sim 100 \mu l$ の M_4 N または M_4 N / G_4 N ）（ $DMSO$ 中、 $200 mg / ml$ M_4 N 、 PBS 中 $200 mg / ml$ G_4 N ）は、表1および表2、図6および図7に示されるように、動物における腫瘍増殖において顕著な効果を示した。

50

【 0 0 4 7 】

(表 1 . マウスにおいて発生された単一腫瘍の増殖に対する M₄ N および G₄ N の効果)

【 0 0 4 8 】

【 表 1 - 1 】

| マウス 番号 | 処理 期間 日数 1-16 | 病変サイズ (mm) | | | 切除された病 変の重量(g) | | 体重 (g) | | |
|-----------|---------------------|-------------|----------|-----------|-------------------|------|--------|------|------|
| | | 1日目 | 7日目 | 21日目 | 16日目 | 24日目 | 1日目 | 16日目 | 24日目 |
| 1 | DMSO* | 3x8x3.3 | — | 5x7x4 | — | 0.3 | 18.8 | — | 20.2 |
| 2 | DMSO | 4.4x6x3.5 | 10x12x8 | — | 1.56 | — | 19.6 | 20.5 | — |
| 3 | DMSO | 0.8x0.8x1 | — | 10.5x11x9 | — | 1.14 | 18.2 | — | 16.1 |
| 4 | DMSO | 2.8x3.8x2.5 | — | 18x11x9 | — | 2.9 | 17.6 | — | 20.2 |
| | 日数 1-16 | | | | | | | | |
| 6 | M ₄ N | — | 9x8x5 | — | 0.2 | — | 19 | 19.2 | — |
| 7 | M ₄ N | — | 6x7x7 | — | — | 0.1 | 18.2 | — | 20.4 |
| 11 | M ₄ N | 1x1.3x1 | 9.5x10x9 | — | — | 0 | 19.5 | — | 20.2 |
| 14 | M ₄ N | 3.8x3.8x3.5 | 8x9x6 | — | 0.4 | — | 17 | 17.6 | — |
| 15 | M ₄ N | — | 5x4x4 | — | 0.1 | — | 18.9 | 20.0 | — |
| 16 | M ₄ N | 2.8x2.8x2.8 | 9x6x4 | — | 0 | — | 17.2 | 17.6 | — |
| 17 | M ₄ N | 2.3x2.3x2.3 | 6x6x4 | — | 0.2** | — | 17.3 | — | — |

10

20

30

【 0 0 4 9 】

【 表 1 - 2 】

| | 日数 1-10 | 日数 9-17 | | | | | | | | |
|----|------------------|------------------|-------------|--------|---|------|--------|------|------|------|
| 18 | M ₄ N | G ₄ N | 3x2.8x3 | 8x7x5 | — | — | 1.0*** | 18.8 | — | 21.1 |
| 19 | M ₄ N | G ₄ N | — | 5x5x5 | — | 0.2 | — | 18.2 | 19.9 | — |
| 21 | M ₄ N | G ₄ N | 1.8x1.8x1.8 | 9x10x5 | — | 0.2 | — | 17.3 | 19.2 | — |
| 22 | M ₄ N | G ₄ N | — | 7x7x5 | — | — | 0 | 17.9 | — | 19.5 |
| 27 | M ₄ N | G ₄ N | 2.5x5x2.5 | 9x6x6 | — | — | 1.8*** | 20 | — | 20.7 |
| 28 | M ₄ N | G ₄ N | 2.8x2.3x2.8 | 5x5x4 | — | 0.17 | — | 18.1 | 19.8 | — |
| 29 | M ₄ N | G ₄ N | 2.8x2.5x2.8 | 5x6x4 | — | — | 0.2 | 18.8 | — | 19.6 |

10

* D M S O = 薬物に対するピヒクル

* * 15日目に取られた

* * * 病変は、ほとんど壊死した細胞を含み、これはまた、マウス6、7、11、14、15、17、19、21、28、19(図6、7)からの病変において見出された。薬物処理の後、マウス番号11および22には、病変は残っていなかった。コントロールマウス番号1、2、3、4に見出された腫瘍は、増殖している細胞を含んだ(図2)。

【0050】

(実験手順) :

36匹のC57b1-16NCRマウスに、 5×10^5 C3細胞/マウスを注射した。注射は、100 μ Lであり、マウスの背側の肩の間に皮下的に行った。細胞を低塩HBS中懸濁させ、そして懸濁均一性を、穏やかにボルテックスすることによって維持した。

【0051】

24匹のマウスが腫瘍を発生した。それらの病変サイズを、ダイアルカリパーによって測定した。これらのマウスを剃毛し、体重を量り、そして処理を開始した(1日目)。4匹のマウスを、コントロールとして隔離した。コントロールマウスは、腫瘍内に毎日50 μ LのDMSOを注射された。実験マウス(10)は、DMSO(200mg/mL)中に溶解された50 μ L M₄Nを投与された。さらなる10匹のマウスは、8日間のM₄N処理に続いて、8日間毎日のG₄N処理(50 μ L、PBS中200mg/mL)を投与された。注射を、腫瘍のいくつかの領域に行った。マウスを、注射の前に、エーテルまたはメタファンを用いて麻酔した。

【0052】

(表2. 複数の腫瘍を有するマウスにおける、処理された病変の増殖に対する、M₄NおよびG₄Nの効果)

【0053】

【表2】

20

30

40

| マウス 番号 | 処理された期間 | | 病変サイズ (mm) | | 切除された病変の重量 (g) | | 体重 (g) | |
|-----------|------------------|------------------|-------------|----------|-------------------|--------|--------|------|
| | 日数 1-16 | | 1日目 | 7日目 | 処置 * | 未処置 ** | 1日目 | 24日目 |
| 9 | M ₄ N | | 1.3x5x0.75 | 7x9x8 | 0.25 | 0.6 | 20.2 | 17.9 |
| 10 | M ₄ N | | 2.3x2.5x2.3 | 9.5x10x9 | 0.1 | 2.9 | 17.5 | 22.1 |
| 12 | M ₄ N | | 2.5x2.5x2.5 | 8x9x6 | 0.11 | 1.82 | 17.8 | 20.0 |
| | 日数 1-9 | 日数 10-18 | | | | | | |
| 20 | M ₄ N | G ₄ N | 1.8x1.8x1.8 | 9x10x5 | 0.1 | 0.2 | 17 | 20.2 |
| 24 | M ₄ N | G ₄ N | — | 7x9x6 | 0 | 1.7 | 17.2 | 20.8 |
| 26 | M ₄ N | G ₄ N | 5x3.3x2.5 | 7x7x7 | 0.2 | 1.9 | 19.3 | 20.6 |

10

* D M S O 中の薬物を、腫瘍領域に直接注射した。

** 薬物を取り除いた隣接腫瘍から。

20

【 0 0 5 4 】

(表 3 . マウスにおける G₄ N の毒性研究)

【 0 0 5 5 】

【 表 3 】

| | 群 | マウスの 番号 | 経路 | 1日当たりの 処理 | 注射の日数 | 死亡率 |
|---|------------|------------|----|--------------|-------|-----|
| 1 | 187.5mg/kg | 3 | 皮下 | 2X | 6 | 0/3 |
| 2 | 375mg/kg | 3 | 皮下 | 1X | 6 | 0/3 |
| 3 | 750mg/kg | 4 | 皮下 | 1X | 6 | 1/4 |
| 4 | 375mg/kg | 2 | IV | 2X | 6 | 0/2 |

30

N C I からの C 5 7 B L - 1 6 N C R 雌性マウスを、この実験に使用した。テトラグリシナル (t e t r a g l y c i n a l) N D G A (G₄ N) を、毎日、P B S 中で、7 5 m g / m l の濃度で新たに作製した。処理当たり、群 1 について、0 . 0 5 m l 、群 2 および 4 について 0 . 1 m l 、そして群 3 について 0 . 2 m l の注射を、6 日間行った。実験は、7 日間続いた。体重を、注射前および注射の 6 日後に決定した。有意な体重変化は、実験期間の間、観察されなかった。

40

【 0 0 5 6 】

全ての処理されたマウス、コントロール (マウス番号 1 ~ 4) および実験マウス (マウス番号 6 、 7 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 の M₄ N 、番号 1 8 ~ 2 2 、 2 4 、 2 6 ~ 2 9 の M₄ N / G₄ N) は、腫脹を示した。病変サイズの測定を、ダイヤルカリパーによって行った。いくつかのマウスは、注射に起因して穏やかな出血を経験した。処理レジメンおよび結果は、以下の通りであった：

1 0 日目：マウスの体重を再び測定した。全てのマウスが、2 g までの増加を示した。

1 2 日目：処理を行わなかった。

1 3 日目：全てのマウスは、非常に異なる程度で、ふくらんだ皮膚を有する。1 つの M₄

50

N処理マウス(番号7)の皮膚は、「乾いた腫瘍(dried-out tumor)」が出る裂け目を有する。

14日目:注射容積を100 μ lに増加させた。

15日目:1匹のM₄N処理されたマウス(番号17)は、麻酔の過量/操作に起因して死亡した。番号17の病変部位の皮膚は、裂け、「乾いた腫瘍」を示す。このマウスを解剖し、病変を切除し、重さを量った。16日目:さらに4匹のM₄N処理マウス(番号6、14、15、16)、3匹のM₄N/G₄N処理マウス(番号19、21、28)および1匹のコントロールマウス(番号2)を安楽死させ、解剖し、そして重さを量った。残りのコントロールマウス(番号1、3、4)を、非侵襲的に試験し、そして腫瘍を持っていた。

10

21日目:コントロールマウスからの腫瘍サイズを、ダイアルカリパーによって測定した。観測:マウス番号10および番号12の病変部位の皮膚(M₄N処理領域)は、裂けており、「乾いた腫瘍」を示す。

24日目:マウス番号7の皮膚を、完全に回収した。実験をこの日に終えた。全ての残りのマウス、M₄N処理(番号7、9、10、11、12)およびM₄N/G₄N処理(番号18、20、24、26、29)を安楽死させ、解剖し、試験し、そして重さを量った。

【0057】

マウスにおけるC3腫瘍増殖に対するM₄NおよびM₄N/G₄Nの効果、表1および2ならびに図5および6に要約する。表1は、単一の腫瘍を有するマウスのC3細胞増殖に対する薬物の効果を示す。コントロール群の4つの切除された腫瘍の平均重量は、1.48gであったが、一方、M₄N処理およびM₄N/G₄N処理からの病変の重量は、それぞれ、0.142gおよび0.51gであった。薬物処理病変は、主に、乾いた壊死細胞からなった(図6)。コントロール群からの腫瘍は、均一なようであり、そして活性に増殖する細胞を含んだ。表2は、複数の腫瘍を有するマウスにおけるC3腫瘍増殖に対する薬物効果を示す。この研究において、薬物を腫瘍の1つに注射した。未処理腫瘍の平均重量は、1.77gであったが、一方、M₄N処理病変の平均重量は、0.15gであった。類似の結果が、M₄N/G₄N注射に続いて得られた-未処理腫瘍の平均重量は、1.27gであり、一方、薬物処理病変の平均重量は、たった0.103gであった。実験期間全体の間全てのマウスの体重変化は、有意ではなかった(表1および2)。

20

30

【0058】

(実施例6)

2つの群のマウスからの薬物処理(M₄N)腫瘍およびDMSOピヒクル処理腫瘍または未処理腫瘍(CON)を、組織学的試験のために調製した。切除された腫瘍を、すぐに固定し、次いで、リン酸緩衝化生理食塩水中の4%ホルムアルデヒド中で保存した。次いで、固定された組織を一連の段階的なアルコールおよびキシレンによって脱水し、そしてパラフィンに埋め込んだ。パラフィン組織ブロックを薄く切り出し、そしてヘマトキシリンおよびエオシンを用いて顕微鏡のために染色した。組織学的研究は、コントロール腫瘍が、DMSO処理によって影響されず、そして増殖し続けることを示した。これらは、高い核/細胞質比、多形性核変化、高い有糸核分裂像、紡錘体様肉腫形状、および癌細胞に特徴的な周りの組織への浸潤を示す。対照的に、M₄N処理を受けた腫瘍は、処理の開始後すぐに、増殖を中断した。これらは、有意な壊死を示し、そしてもはや生存可能ではない。より高倍率において可視の少量の薬物沈殿があり、そして病巣領域は、慢性の炎症および線維症を示す。この治療効果は、この領域から、これらの減少した腫瘍細胞の発散を導く。同じ結果が、M₄N処理単独と同様のM₄N/G₄N処理で見られる。しかし、G₄Nが水溶性であるので、M₄Nよりも腫瘍のより広い領域に拡散し得る。M₄Nとともに相乗的に使用される場合、G₄Nは、大きなサイズの腫瘍(すなわち、2cm³より大きい)を処置するのにより有効であり得る。

40

【0059】

(実施例7)

50

(モルモットにおけるHSV-1皮膚感染に対するM₄Nの作用)

薬物M₄Nをまた、モルモットにおける皮膚感染でのHSV-1複製の阻害について試験した。モルモットの皮膚をニードルでつまみ、そしてHSV-1抑制剤を各々突き刺した領域に感染させるために局所的に塗布した。次いで、6日間毎日感染させた後に、M₄Nを、突き刺した感染領域に塗布した。

【0060】

モルモットの裸の背中中の皮膚の6つの領域を、5 = DINニードルで無菌的に穿孔した。2つの領域を、HSV-1 (HSV-C、培養上清、または生理食塩水中の単離したHSV、HSV-SC)で感染させた。他の4つの領域を、HSV-SCで感染させた。感染の15分後、30 μlの試験化合物 (DMSO中60 mg/mlのABDS₁、ABDS₂、ACVおよびM₄N (4N))を、1日あたり5回で6日間、領域の各々穿孔した感染領域に塗布した。ABDS₁およびABDS₂を、ネガティブコントロールとして含んだ。図8における写真を6日目に撮り、そして薬物 (HSV-C、HSV-SC)の非存在下、効力のない薬物 (HSV-ABDS₁、HSV-ABDS₂)の存在下、および有効な薬物 (HSV-M₄NおよびHSV-ACV)の存在下でのHSV-1複製の程度を示す。6つの大きなコンフルエントな疱疹は、HSV-C、HSV-SC、HSV-ABDS₁、HSV-ABDS₂によって処理した領域において発生したが、疱疹は、M₄N (4N)処理およびACV処理の後の感染領域では観察されなかったことが見出され得る。皮膚損傷の消失によって、および薬物処理4日後のウイルス発散がないことによって、示されるように、M₄NがHSV複製をブロックし得るという明確な結果を、このモデル系において得た。初期の動物研究もまた、M₄Nが、マウスに対して、腹腔内に投与された場合、300 mg/kgほどの高さの濃度で、そして皮下またはIVのいずれかによって投与された場合、375 mg/kgほどの高さの濃度で、非毒性であることを示した (表3) (6)。

10

20

【0061】

(実施例8)

(インサイチュ注射を用いる臨床処置についてのM₄N)

薬物送達経路として、腫瘍へのM₄Nの直接的な投与は、いくつかの特有用な利点を提供する。1) M₄Nは、疎水性化合物であり、そしてDMSOに非常に可溶性 (200 mg/ml)である。従って、有効投薬量の薬物を達成するために、ほんのわずかな容量の薬物溶液が、注射について必要とされる。上記実施例5で記述されるマウス研究においては、数日間の50 μl ~ 100 μlの毎日の注射が、マウスにおける腫瘍増殖の完全な停止に十分であった。疾患を処置するために大用量のDMSO (処置あたり30 ml IV)の使用に関するいくつかのこれまでの研究が存在する (21)。これらの結果は、確証的ではなかった (22)。しかし、数千万の人々が、過去において世界的に大量のDMSOで安全に試験されているので、DMSOは、ほんのわずかな容量のDMSOが使用される場合、薬物送達のためのビヒクルとして安全であると考えられる (23)。2) インサイチュで注射することによって、大多数の薬物残渣が、不溶性のままであり、腫瘍領域で濃縮され、そして循環系に入らず、従って全身毒性が避けられる。さらに、十分な薬物が、その増殖を抑制するように腫瘍内に残存するので、薬物の連続注射は、比較的わずかな処置後に不要である。実施例5のマウス研究において、M₄N注射の中断後でさえも、腫瘍細胞は、死滅し続けた。従って、薬物が直接標的化される場合、腫瘍サイズが、投与されるべき薬物の必要量についての決定因子となる。ヒトの全体重とマウスの全体重との差は、無関係である。マウス腫瘍研究において、10日間の20 mg/日は、腫瘍を排除するために十分すぎるほどであった。匹敵するサイズのヒトの腫瘍 (1 ~ 1.5 cm³)を処置するためにこれよりも高い投薬量を使用する必要は存在しないはずである。このことは、ヒト試験における危険性を相当に減少させる。

30

40

【0062】

(実施例9)

(細胞のM₄N処理が細胞性増殖をブロックする)

50

M₄Nに関する本発明者らのこれまでの研究は、Sp1-依存性プロモーターの不活性化によって、ウイルス性転写を阻害し得ることを示した。多くの哺乳動物細胞周期遺伝子もまた、重要なSp1プロモーターを含み、従ってM₄Nは、これらの転写をブロックし得る。この仮説を、多数の異なる細胞株に対するM₄Nの抗増殖性作用を試験することによって試験した。低濃度(10 μM)の親化合物NDGAは、哺乳動物細胞においてアポトーシスを誘導することがこれまでに示されてきた(24)。しかし、この作用は、カテコール酸素の1つをブロックすることによってか、またはNDGAへの親水性基の添加によって、回避され得る(25)。漸増量のNDGA誘導体M₄Nを、増殖を阻害するために必要とされる最適濃度を決定するために、HPV-16/ras形質転換C3細胞株(26)の培養物に対して試験した(図9a)。この細胞は、M₄Nに十分に応答し、40~60 μMの濃度範囲にわたって72時間後に分裂を停止する。これらの濃度での3日後、細胞数が、処理の開始での計数と等しく残存した(0日目、図9)。細胞増殖におけるより緩やかな減少を、より低濃度の薬物で観察し、そしていくつかの細胞死を、60 μMより高い濃度で観察した。

10

【0063】

C3細胞株に対するM₄Nの抗増殖性作用は、Sp1-依存性HPV-16 E6/E7癌遺伝子プロモーターを不活性化する薬物の能力に単に起因せず、同様な増殖阻害を、HPV-16で形質転換されたTC-1細胞株(E6/E7癌遺伝子が非Sp1依存性レトロウイルス性プロモーターの制御下である(27))において観察した(図9d)。C33a細胞株(図9c)、HPV-ネガティブヒト子宮頸癌細胞株、およびCEM-T4株(図9b)の増殖に加えて、ヒト白血病細胞株(28)もまた、M₄Nを用いる処理によってブロックされた。この薬物を用いて処理された4つの細胞株において、ほとんど全て(95%を超える)の分裂停止細胞は、M₄Nの濃度が、「閾値」の値(C3細胞について60 μM、TC-1細胞について40 μMなど)を超えるまで生存可能であった。これらの濃度を超えると、生存可能な細胞の百分率は、急激に減少する。興味深いことに、分裂停止細胞は、薬物に対する延長された曝露後でさえも95%を超える生存度を維持した。C3細胞は、40 μM M₄Nを用いる処理の8日後に細胞死において増加を示さなかった(図9e)。

20

【0064】

(実施例10)

(M₄Nを用いて処理された細胞がG2期において停止する)

一旦、M₄Nを用いて処理された細胞が、生存可能なままで増殖を中止することが確立されると、細胞性DNA含量の分析および細胞構造の蛍光試験は、細胞が停止する細胞周期における点を決定するために使用された。72時間M₄Nに対して曝された細胞は、コントロールに対して増加したG2/M DNA含量を示した(図10a~d)。最も極度な応答は、C3細胞株およびCEMT4細胞株から観察され、ここで、90%を超える細胞が、G2/M DNA含量を示す。

30

【0065】

G2における停止と有糸分裂ブロックとの間を区別するために、チューブリン(緑)およびチューブリン(赤)に対する抗体を、72時間のM₄N処理後のC3細胞株における中心体の状態を決定するために使用した。図11aに示されるように、M₄Nで処理した細胞の中心体は、複製されるが、細胞の核において互いに隣接して位置するままである。中心体は、初期の前期の間に分離しているので、これらの細胞が、有糸分裂を開始しないと結論付けられ得る。対照的に、コントロール細胞を染色するチューブリンは、G1期またはS期に特徴的な拡散パターンを有する(29)。M₄N処理細胞におけるクロマチン凝縮の欠如をまた、DAPI染色を用いて観察し(図12b)、これは、この細胞がG2期より前方へ移動していないさらなる証拠である(30)。

40

【0066】

(実施例11)

(CDC2の産生が40 μM M₄Nによって阻害される)

50

G 2 からの細胞の進行は、M P F の産生に依存するので、そのタンパク質成分の状態を、 $40 \mu\text{M}$ $M_4 N$ を用いて処理した C 3 細胞において試験した。非同期性細胞を、1% D M S O 中の $M_4 N$ 、または 1% D M S O 単独のいずれかを含有する培地中で 24 時間または 72 時間増殖させた。この細胞を収集し、そして等量の全細胞性タンパク質を、ウエスタンブロットによって分析した。C D C 2 の量の顕著な減少を、 $M_4 N$ を用いる処理の 72 時間後に観察した (図 12 a)。しかし、同一の膜をはがし再調査することによって検出されたサイクリン B のレベルは、変化しないことが見出された。これらの結果は、これらの条件下で、停止が p 5 3 に対する応答ではなさそうなことを示す。なぜなら、p 5 3 の過剰発現は、サイクリン B の減少を導くことが示されているからである (31、32)。ウエスタン分析の結果と一致して、C D C 2 キナーゼ活性を、 $M_4 N$ 処理の 72 時間まで排除した (図 12 a)。これらの実験は、この薬物が C D C 2 タンパク質の産生を阻害することによって作用し M P F の活性の損失をもたらすという考えを支持する。

10

【0067】

S p 1 - 依存性ウイルス性転写をブロックする $M_4 N$ の能力を実証する本発明者らのこれまでの研究は、C D C 2 タンパク質の減少についての考えられる機構として、C D C 2 m R N A レベルの減少を示唆する。このことは、サイクリン B タンパク質 (この遺伝子は、その発現について S p 1 を必要としない) が、正常なレベルで産生されるが、C D C 2 タンパク質 (この遺伝子は、そのプロモーターにおいて 2 つの重要な S p 1 部位を有する) が、量において実質的に減少するという知見を支持する。この仮説を試験するために、ノザンブロット分析を、 $40 \mu\text{M}$ $M_4 N$ を用いて 5 ~ 72 時間処理された C 3 細胞から収集した R N A に対して実施した。図 12 b に示されるように、C D C 2 m R N A の量は、 $M_4 N$ で処理してわずか 24 時間後に減少し、そして 72 時間後にほとんど除去される。非 S p 1 調節性ハウスキーピング遺伝子 G A P D H の産生を、R N A ロードコントロールとして使用し、そしてそのレベルは、 $40 \mu\text{M}$ $M_4 N$ まで影響されなかった。

20

【0068】

C 3 細胞株の使用は、本発明者らに $M_4 N$ 媒介性細胞周期停止の機構の分析のためのさらなるコントロールを可能にする。なぜなら、他の S p 1 - 依存性遺伝子プロモーターはまた、 $M_4 N$ 処理によって阻害されるようであるからである。この可能性を、S p 1 依存性 H P V - 1 6 E₆ / E₇ プロモーターからの転写に対する $M_4 N$ の作用を分析することによって C 3 細胞を試験した。 $40 \mu\text{M}$ $M_4 N$ で 5 ~ 72 時間処理した C 3 細胞から単離した R N A の r t P C R 分析は、E₇ 転写物のレベルの明確な減少を示した (図 12 c)。G A P D H をまた、この実験における内部コントロールとして再び使用し、そしてそのレベルは、薬物処理によって影響されなかった。これらの結果は、 $M_4 N$ が S p 1 調節性プロモーターの転写を減少させるというさらなる証拠を提供する。

30

【0069】

(実施例 12)

(ゲル移動度分析における $G_4 N$ による S p 1 結合活性の阻害)

S p 1 ファミリータンパク質は、結合の際に D N A の主溝の方に曲げを誘導する (33)。S p 1 タンパク質のジンクフィンガードメインは、G C ボックス配列 5' - G G G G C G G G G - 3' の結合を担っている。コンピュータ分析から、 $G_4 N$ (N D G A のアミノエステル誘導体) が、主溝におけるこのような配列と安定な複合体を形成し得ることを決定した。 $G_4 N$ が、S p 1 ブロッカーおよび S p 1 ディスプレサー (d i s p l a c e r) として機能を果たし得るか否かを決定するために、本発明者らは、試験のために S p 1 の D N B 結合ドメインのみを用いるゲル移動度シフト分析によって、 $G_4 N$ の存在または非存在下において、S p 1 / エンハンサー相互作用研究を実施した。ブロック化実験において、異なる濃度の $G_4 N$ を、最初に、結合緩衝液中で ^{32}P - 標識化 D N A とともに 25 で 30 分間インキュベートした。次に、組換え S p 1 タンパク質の D N A 結合ドメイン (S p 1 - 167D) を添加し、そして大過剰の B S A タンパク質の存在下でさらに 30 分間インキュベートした。置換研究において、この組換え S P 1 - 167D を、最初に、D N A に結合させ、次いで $G_4 N$ を、インキュベーションの第 2 工程で添加した。G

40

50

G_4N 濃度およびSp1-167D濃度ならびにインキュベーション条件およびゲル電気泳動条件は、両方の研究において同一であった(実験項)。図13に示されるように、いずれの場合においても、 G_4N は、DNAをSp1-167Dタンパク質との相互作用をさせなくし得ることが見出された。Sp1単独のDNA結合ドメインのみが試験された場合、 G_4N は、ゲル移動度シフト分析によって示されるように(図13、A、B、D)、エンハンサーに対する結合からSp1をブロック化するよりも、結合Sp1の置換においてより効率的であると考えられた。本発明者らはまた、結合 G_4N がSp1-167Dによって置換され得るか否かを試験した。この研究において、 G_4N によるSp1-167D結合の阻害は、移動度シフト分析によって初めて確立された(図13C、レーン2およびレーン5)。 G_4N 結合テンプレートが、付加的なSp1-167Dとチャレンジされた場合、本発明者らは、Sp1-167D/DNA複合体のバンド強度の投薬量依存的な増加を観察し(図6C、レーン6、レーン7)、このことは、Sp1-167Dによるテンプレートからの G_4N の置換を示した。

10

【0070】

(実施例13)

(G_4N によるHIVプロモーター活性のSp1調節性Tat-トランス活性化の阻害)
これまでに報告されるように、メチル化NDGA誘導体は、種々のウイルス性プロモーター(HIV、HSVのICP4、HPVのE₆/E₇遺伝子を含む)のエンハンサー部位に対するSp1結合をブロックし得る(8、9、10)。本発明者らは、これまでに記載されるように、SEAPアッセイによってCos細胞におけるHIVプロモーター活性のTat-トランス活性化に対する G_4N 作用をさらに試験した。HIV LTR駆動SEAP発現の基底レベルは、Cos細胞においてほとんど検出可能でないことがこれまでに見出された。Cos細胞がCMVプロモーター駆動Tat遺伝子とともに同時トランスフェクトされた場合、SEAP発現において60倍以上増加した(8)。このようなHIV LTRプロモーター活性のTat駆動性トランス活性化は、Sp1調節性であることがこれまでに示されてきた(7、8)。 G_4N の存在下で、本発明者らは、用量依存的様式でHIVトランス活性化の阻害を観察した(図14)。 G_4N についての平均値IC₅₀値36 μMは、3-O-メチルNDGAの値(Ma1.4(IC₅₀25 μM))に匹敵し、そしてテトラ-メチルNDGAの値(M₄N(IC₅₀11 μM))よりも幾分か高かった。これらの違いは、おそらく、細胞に取り込む薬物に影響する試験化合物の化学的性質に起因する。

20

30

【0071】

(実施例14)

(G_4N による細胞培養物中のSIV-1産生およびHIV-1産生の阻害)
HIV-1およびSIVの両方は、これらの複製を完了するために宿主ゲノムへの組み込みを必要とするレトロウイルスである。両方は、これらのプロウイルスの転写のための宿主転写因子に依存している。Sp1は、ほとんど同一な様式の転写調節を共有するこれら2つのウイルスにおけるこのような発現について中心的な役割を果たしている。 G_4N の抗ウイルス作用を試験するための動物モデルとして、SIV感染アカゲザルを使用することを見越して、本発明者らは、174×CEM細胞におけるSIV阻害における G_4N 作用を研究し、そしてH9細胞におけるHIVのものと比較した。これら2つの細胞株における G_4N の細胞毒性もまた試験した。SIV阻害研究について、10⁷ 174×CEM細胞を、SIVmac239の高力価ストックと37で2時間混合し、次いで冷PBS緩衝液で2回洗浄して、吸収されていないウイルスを除去した。細胞懸濁液を、3つの96ウェルプレートの各々のウェル中に等分した。種々の濃度の G_4N 溶液を、新たに調製したストックから作り、別個にかつ各々、1つの96ウェルプレートの列の6ウェルに等分した。培養上清を、感染後4日毎に収集した。適切な濃度の薬物を含む(P.I.)および新たな培地を、上清の収集に続いて培養物に添加した。ウイルス産生を、示されるように、改変p27コア抗原捕捉ELISAによってアッセイした(図15)。SIV産生は、5CIMを超える濃度で G_4N を使用して検出されなかった。2.5CIM未満

40

50

の G_4N 濃度にて、SIV 産生を、薬物の非存在下でのウイルス産生と比較して、感染後の培養物の4日目および8日目の培養上清において検出した(図15)。 G_4N ($250 \mu M$ 以下)は、MTTアッセイによって決定されるように、感染されていない $174 \times CE M$ 細胞に対して毒性作用を示さなかった(34)。

【0072】

同様な実験をまた、H9細胞において G_4N によって、HIV-1の阻害の研究について実施した。このH9細胞を、 $1 \times 10^5 / ml$ で継代培養し、そしてHIV-1(HIV-1RTMF)のAZT耐性株を用いて感染させた。異なる濃度の G_4N を、感染2時間後に添加した。新鮮な培地交換を、4日間毎に行った。 G_4N の存在下での細胞増殖を、9日の実験期間の間注意深くモニターした。ウイルス産生を、p24コア抗原捕捉ELISAによってアッセイした。示されるように(図16)、80CIMの G_4N 濃度は、H9細胞においてHIV複製を完全に阻害した。HIV-1RTMFの阻害について、 $12 \mu M$ CIM G_4N の IC_{50} が見出された。さらに、アッセイの範囲内(および $250 \mu M$ 未満)で、感染されていないH9細胞に対する検出可能な毒性は、存在しなかった。

10

【0073】

(実施例15)

(C3細胞におけるサービピン(Survivin)遺伝子発現に対する M_4N 処理の作用)

(材料および方法)

20

細胞培養物。C3細胞を、5%ウシ胎仔血清(GIBCO BRL)を補充したIscove's Modified Dulbecco's Medium(GIBCO BRL)中で単層として増殖させ、そして5% CO_2 環境下、 $37^\circ C$ で湿性インキュベーター中で維持した。

【0074】

M_4N 処理。C3細胞(5×10^6)を、 150 -mmプレートに播種し、そしてこのプレートに付着させた。播種から24時間後、培養物をPBSで2回洗浄し、そして増殖培地と混合した1% DMSO中に溶解した M_4N で処理した。

【0075】

細胞抽出物および免疫プロット。細胞を、溶解緩衝液($50 mM$ HEPES (pH 7)、 $250 mM$ NaCl、 0.1% (v/v) Nonidet P-40、 10% グリセロール、 $1 mM$ DTT、および $50 \mu l / ml$ プロテアーゼインヒビターカクテル(Sigma)を含有する)中で溶解させた。抽出物のタンパク質濃度を、ブラッドフォードアッセイ(Bio-Rad Laboratories)によって決定し、次いで $50 \mu g$ のタンパク質を、SDS-PAGEによって分離し、そしてニトロセルロース膜に電気的に移動(electrotransfer)(ECL)した。膜を、サービピン(Survivin)(Santa Cruz Biotechnology)およびカスパーゼ(caspase)-3(Santa Cruz Biotechnology)に対する一次抗体とともにインキュベートした。次いで、プロットを、抗ウサギビオチン結合体化二次抗体とともに、次いでAvidin-APTM ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼとともに、インキュベートし、CSPD(登録商標)基質(Tropix)を用いて検出した。

30

40

【0076】

RT-PCR分析。mRNAを、Molecular Cloningに記載されるように、グアニジニウムチオシアネートおよびフェノールの方法によって、培養細胞から単離した(40)。343-塩基対RT-PCR産物を、サービピンセンスオリゴヌクレオチドプライマー5'-GCATCGCCACCTTCAAGAACTGGCC-3'およびサービピンアンチセンスオリゴヌクレオチドプライマー5'-CGGGTAGTCTTTGCA GTCTCTTCAAACTC-3'を用いることによって生成した。GAPDHセンスプライマー5'-GAATCTACTGGCGTCTTCAACC-3'およびG

50

A P D H アンチセンスプライマー 5' - G T C A T G A G C C C T T C C A C G A T G C - 3' を、コントロールとして 238 -塩基対 RT-PCR 産物を生成するために使用した。mRNA アリコート、20 μ l 反応緩衝液 (1 U の rRNA sin および DNA se を含有する) 中で 75 で 5 分間インキュベートし、続いて MMLV (Promega) を用いて逆転写反応させた。得られた c-DNA 産物を、以下の PCR 条件下で増幅させた: 55 で 55 秒間、60 で 55 秒間、および 72 で 1 分間の 30 サイクル。この PCR 産物を、エチジウムブロマイドを含有する 1.8% アガロースゲル上の電気泳動によって分離し、そして UV 下で撮影した。バンドを、Scion Image によって定量化し、そしてサービピン PCR 反応産物のシグナル強度を、GAPDH PCR 産物のシグナル強度に対して規格化して、サービピン遺伝子のダウンレギュレーショングラフを作成した。

10

【0077】

C3 細胞において Sp1 調節性サービピン遺伝子発現が、M₄N 処理によって減少されるか否かを決定するために、本発明者らは、40 μ M M₄N を用いて 24 時間および 72 時間細胞を処理した。図 1 に示されるように、M₄N を用いる細胞の処理は、時間依存的な様式でサービピン遺伝子発現の有意な減少を生じた。40 μ M M₄N を用いる 24 時間および 72 時間の処理は、それぞれ、65% および 80% のサービピン発現の減少を生じた。未処理細胞は、サービピン遺伝子発現においていずれの減少も示さなかった。

【0078】

サービピンタンパク質はまた、M₄N 処理の 72 時間までにダウンレギュレーションされることが免疫プロットによって示された。このダウンレギュレーションは、投薬量依存性であった (図 2)。

20

【0079】

(実施例 16)

(M₄N 処置でのアポトーシスの誘導)

本発明者らのデータは、M₄N が、サービピンの mRNA およびタンパク質の減少を示したので、本発明者らは、この減少がアポトーシスを誘導するか否かを研究した。なぜなら、サービピンは、抗アポトーシス機能を有するからである。カスパーゼ - 3 の免疫プロットによって示されるように (図 3)、72 時間の M₄N の処理は、カスパーゼ - 3 の活性化をもたらした。この活性化は、M₄N で処理した細胞におけるアポトーシスの増加を生

30

【0080】

本明細書中で引用される参考文献は、便宜のために以下に列挙され、そして本明細書により参考として援用されている。

【0081】

【表 4 - 1】

1. Nurse, P., Universal Control Mechanism Regulating Onset of M-Phase. *Nature*, 344, 503-508 (1990).
2. Fang, F. and J.W. Newport, Evidence That the G1-S and G2-M Transitions Are Controlled by Different cdc2 Proteins in Higher Eukaryotes. *Cell*, 66, 731-742(1991).
3. Dalton, S., Cell Cycle Regulation of the Human cdc2 Gene. *The EMBO Journal*, 11, 1797-1804.(1992.)
4. Morgan, D.O., Principles of CDK Regulation. *Nature*, 374, 131-134.(1995.) 10
5. Murray, A.VV., Creative Blocks: Cell-cycle Checkpoints and Feedback Controls. *Nature*, 359, 599-604 (1992).
6. Kaò, G.D., M. W.G., and R.J. Muschel, p34(Cdc2) Kinase Activity Is Excluded From the Nucleus During the Radiation-induced G(2) Arrest in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.*, 274, 34779-34784 (1999).
7. Hwu, J. R., Tseng, W. N., Gnabre, J., Giza, P. and Huang, R. C. C. Antiviral Activities of Methylated Nordihydroguaiaretic Acids (I) Synthesis, Structure Identification and Inhibition of Tat Regulated HIV Transactivation. *J. Med. Chem.* 41:2994-3000(1998). 20
8. Gnabre, J. N., Brady, J. N., Clanton, D. J., Ito, Y., Dittmer, J., Bates, R. B. and Huang, R. C. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription and Replication by DNA Sequence-Selected Plant Lignans. *Proc. Natl. Acad Sci U.S.A.* 92, 11239 (1995). 30
9. Chen, H., et al., Antiviral Activities of Methylated Nordihydroguaiaretic Acids. 2. Targeting Herpes Simplex Virus Replication by the Mutation Insensitive Transcription Inhibitor Tetra-O-Methyl-NDGA. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41, 3001-3007 (1998).

【 0 0 8 2 】

【 表 4 - 2 】 40

10. Craigo, J., et al., Inhibition of Human Papillomavirus Type 16 Gene Expression by Nordihydroguaiaretic Acid Plant Lignan Derivatives. *Antiviral Research*, 47, 19-28 (2000).
11. Baba, M. Mini Review. Cellular Factors as Alternative Targets for inhibition of HIV- 1. *Antiviral Res.* 33, 144 i –1452 (1997).
12. Gnabre, J. N., Ito, Y., Ma. Y. and Huang, R. C. (1996) Isolation of Anti-HIV-1 Lignans from *Larrea Tridentata* by Counter-Current Chromatography. *J. Chromatogr. A* 719, 353. 10
13. Gnabre, J. N., Huang, R. C., Bates, R. B., Burns, J. J., Calder, S., Malcomson, M. E. and McClure, K. J. (1995) Characterization of Anti-HIV Lignans from *Larrea Tridentata* *Tetrahedron* 51, 12203.
14. Honess, R. W., and Roizman, B. (1988) Regulation of Herpes Virus Macromolecular Synthesis. 1. Cascade Regulation of Synthesis of Three Groups of Viral Proteins. *J. Virol.* 1974. 14, 8. 20
15. Courey, A. J., and Tjian. R. (1988) Analysis of Spl in vivo Reveals Multiple Transcription Domains. Including a Novel Glutamine-rich Activation Motif. *Cell* 55, 887.
16. Some of the Spl-regulated cellular genes: Sartorelli, V.; Webster, K. A.; Kedes, L. Muscle-specific expression of the cardiac alpha-actin gene requires myoD1, CarG-hox binding factor and Spl. *Gene Dev.* 1990, 4, 1811. Dailey, i., Roberts, S. B.; Heintz, N. Purification of the histone H4 gene-specific transcription factors, H4TF-1 and H4TF-2. *Gene Dev.* 1988, 2, 1700. Means, A. L.; Farnham, P. J. Transcription initiation from the dihydrofolate reductase promoter is positioned by HIP-1 binding at the initiation site. *Mol. Cell Biol.* 1990, 10, 653. 30
 Abravaya, K.; Phillips, B.; Morimoto, R. I. Heat shock-induced interaction so heat shock transcription factor and human hsp70 promoter examined by in vive footprinting. *Mol. Cell Biol.* 1991, 11, 586. Leask, A.; Rosenberg, M.; Vassar, R.; Fuchs, E. Regulation fo a human epidermal keratin gene: Sequences and nuclear factors involve din keratinocyte-specific transcription. *Gene Dev.* 1990, 4, 1985. 40
 Desjardins, E.; Hay, N. Repeated CT elements bound by zinc finger

【 0 0 8 3 】

【 表 4 - 3 】

- proteins control the absolute and relative activities of the two principal human c-myc promoter. *Mol. Cell Biol.* 1993, 13, 5710. Sanchez, H. B.; Yieh, i., Osborne, T. F. Cooperation by sterol regulatory element-binding proteins and Sp1 in sterol regulation of low-density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 1161. Lemaigre, F. P.; Lafontaine, D. A.; Courtois, S. J.; Durvieux, S. M.; Rousseau, G. G. Sp1 can displace GHF-1 from its distal binding site and stimulate transcription from growth hormone gene promoter. *Mol. Cell Biol.* 1990, 10, 1811. 10
17. Phelps, W. C., Yee, C. L., Munger, K. and Howley, P. M. (1988) The Human Papilloma Virus Type 16 E7 Gene Encodes Transactivation and Transformation Functions Similar to Those of Adenovirus E/A. *Cell* 53, 539-547.
18. Greenstone, H.L. Nieland, J.D., DeVisser, K.E., DeBruijn, M.L., Kimbauer, R., Roden, R.B., Lowy, D.R., Kast, W.M. and Schiller, J.T. (1998) Chimeric Papillomavirus Virus-Like particles Elicit Antitumor Immunity Against the E7 Oncoprotein in an HPV16 Tumor Model. *PNAS* 95, 1800-1805. 20
19. Feltkamp, M.C., Vreugdenhil, G.R., Vierboom, M.P., Ras, E., Van der Burg, S.H., Schegget, J. Ter, Melief, C.J.M. and Kast, W.M. (1995) CTL Raised Against a Subdominant Epitope Offered as a Synthetic Peptide Eradicate Human Papillomavirus Type 16-induced Tumors. *European Journal of Immunology* 25, 2638-2642. 30
20. Feltkamp, M.C., Smits, H.L., Vierboom, M.P., Minaar, R.P., B.M. Drijfhout, J.W., Schegget, J., Melief, C. and Kast, W.M. (1993) Vaccination with Cytotoxic T Lymphocyte Epitope-Containing Peptide Protects Against a Tumor Induced by Human Papillomavirus Type 16-Transformed Cells. *Eur. J. Immunol.* 23, 2242-2249.
21. Jacob, S. W. and Herschler (1986) *Pharmacology of DMSO*. Academic Press, Inc. 40
22. Jack, C., and Torre, de la (1983) *Biological Actions and Medical*

【 0 0 8 4 】

【 表 4 - 4 】

Applications of Dimethyl Sulfoxide. New York Academy of Sciences, New York, N.Y.

23. Spruance, S. L., McKeough, M. B. and Cardinal, J. R. (1983) Dimethyl Sulfoxide as a vehicle for topical antiviral chemotherapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 411,28-33.
24. Biswal, S.S., et al., Glutathione Oxidation and Mitochondrial Depolarization as Mechanisms of Nordihydroguaiaretic Acid-induced Apoptosis in Lipoygenase-deficient F15.12 Cells. *Toxicol. Sci.*, 53, 77-83.(2000.) 10
25. Schegg, K. M. and W.J. Welch, The Effect of Nordihydroguaiaretic Acid and Related Lignans on Formyltetrahydrofolate Synthetase and Carboxylesterase. *Biochim. Biophys. Acta*, 788, 167-180 (1984).
29. Feltkamp, M.C.W., et al., Vaccination With Cytotoxic T Lymphocyte Epitope-containing Peptide Protects Against a Tumor Induced by Human Papillomavirus Type 16-Transformed Cells. *Eur. J. Immunol.*, 23, 2242-2249 (1993). 20
27. Lin, K., et al., Treatment of Established Tumors With a Novel Vaccine That Enhances Major Histocompatibility Class II Presentation of Tumor Antigen. *Cancer Res*, 56, 21-26.(1996.)
28. Foley, G.E., et al., Continuous Culture of Human Lymphoblasts From Peripheral Blood of a Child With Acute Leukemia. *Cancer*, 18, 522-529(1965). 30
29. Shiebel, E., Gamma-Tubulin Complexes: Binding to the Centrosome, Regulation and Microtubule Nucleation. *Current Opinion Cellular Biology*, 12, 113-118(2000).
30. Marsden, M.P.F., Laemmli, U.K., Metaphase Chromosome Structure: Evidence for a Radial Loop Model. *Cell*, 17, 849-858 (1979).
31. Taylor, W.R., et al., Mechanisms of G2 Arrest in Response to Overexpression of p53. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 3607-3622 (1999). 40
32. Innocente, S.A., et al., p53 Regulates a G2 Checkpoint Through Cyclin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 96, 2147-2152(1999).
33. Sjøttem, E.; Anderson, C.; Johansen, T. Structural and Functional

【 0 0 8 5 】

【 表 4 - 5 】

Analyses of DNA Bending Induced by Sp1 Family Transcription Factors. J. Mol. Bio., 267, 490-504 (1997).

37.

34. Weislow, O.S.; Kiser, R.; Fine, D.L.; Bader, J.; Shoemaker, R. H.;

Boyd, M.R. New Soluble-Formazan Assay for HIV-1 Cytopathic

Effects: Application to High-Flux Screening of Synthetic and Natural

Products for AIDS-Antiviral Activity. J. Natl. Cancer Inst., 81(8),

557-586 (1989).

35. Li, F. and Altieri, D.C., Transcriptional analysis of human survivin gene expression. Biochem. J. 344, 305-311(1999).

36. Li, F. and Altieri, D.C., The Cancer Apoptosis *Survivin* gene:

Characterization of Locus and Transcriptional Requirements of Basal and

Cell Cycle-dependent Expression. Cancer Res. 59,3143-3151 (1999).

37. O'Connor, D.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 97,13103-13107 (2000).

38. Grossman, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 98,635-640(2001).

39. Studzinski, G.P. (ed.), Apoptosis, A Practical Approach (1999), page 10.

40. Sambrook and Russell, Molecular Cloning, 3rd ed.(2001).

10

20

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】M₄NおよびG₄Nの構造。

【図2】図2A。E₆/E₇プロモーター(pPV16P97)の領域およびSp1タンパク質の結合部位を示すHPV-16LCR。図2B。C-33A細胞におけるE₆/E₇プロモーター活性に対するM₄Nの効果(異なる濃度のM₄Nによる、E₆/E₇プロモーター駆動ルシフェラーゼ遺伝子転写の阻害)。

30

【図3A】40μM M₄Nによるウイルス性E₆およびE₇RNA転写物の阻害。40μMのM₄NまたはDMSOのみのいずれかで増殖培地中にて71時間処理されたC₃細胞から単離された全RNAを、相対RTPCRに供した。このRTPCRサンプルを、増幅の増加するサイクルの後に取り出し、そしてアガロースゲルに溶かす。ゲル写真(3Aおよび3B)は、これらのサイクル、増殖培地中のM₄Nの存在(+)または非存在(-)およびサイズマーカーとして使用されるpGMTベクターの2つの消化物を示す。

【図3B】40μM M₄Nによるウイルス性E₆およびE₇RNA転写物の阻害。40μMのM₄NまたはDMSOのみのいずれかで増殖培地中にて71時間処理されたC₃細胞から単離された全RNAを、相対RTPCRに供した。このRTPCRサンプルを、増幅の増加するサイクルの後に取り出し、そしてアガロースゲルに溶かす。ゲル写真(3Aおよび3B)は、これらのサイクル、増殖培地中のM₄Nの存在(+)または非存在(-)およびサイズマーカーとして使用されるpGMTベクターの2つの消化物を示す。

40

【図3C】40μM M₄Nによるウイルス性E₆およびE₇RNA転写物の阻害。40μMのM₄NまたはDMSOのみのいずれかで増殖培地中にて71時間処理されたC₃細胞から単離された全RNAを、相対RTPCRに供した。このRTPCRサンプルを、増幅の増加するサイクルの後に取り出し、そしてアガロースゲルに溶かす。増幅マップ(2C)は、初期ウイルスRNA転写物の交互プライミングから得られる2つの予測されるサイズの増幅産物を示す。

50

【図4A】M₄NによるC3細胞成長の阻害。

【図4B】M₄Nの除去後のC3細胞成長の阻害。

【図5】図5A～5B。遺伝子アッセイ分析により試験された場合のC3細胞における遺伝子発現に対するM₄Nの効果。5A。DMSO処理の>2時間後のC3細胞において発現された遺伝子(C3 DMSO)。5B。溶媒としてDMSOを使用するM₄N処理の>2時間後のC3細胞において発現される遺伝子(C3 M₄N)。

【図6】M₄N処置後の腫瘍保有マウスの視覚的観察。6A。単一の腫瘍を保有するマウスを、DMSO(#3)またはM₄N(#7)のインサイチュ注射で処置した。M₄Nのインサイチュ注射をまた、マウス#9において成長させた2つの腫瘍のうちの1つに作製した。6B。同じマウスからの未処理の腫瘍および表2に記載されるようにM₄N処置された腫瘍(白色瘢痕)。

10

【図7】マウスにおける腫瘍成長に対するM₄NおよびM₄N/G₄Nの組織病理学効果。このパネルの1つめのカラムは、マウス#12、10、27および20由来の比較的小さな薬物処置された(M₄NまたはM₄N/G₄N)病変(M₄N)と比較した場合の、DMSO処置(CON)後の、マウス#4、10、12由来の大きなサイズの腫瘍を示す。続く写真は、100倍の倍率で試験されたこれらの腫瘍の例である(A、B、C、DMSO処置されたマウス、D、未処置のマウス、E、F、G、H、M₄NまたはM₄N/G₄N処置されたマウス)(表1および表2)。

【図8】薬物(HSV-C、HSV-SC)の非存在下、無効な薬物(ABDS₁ [「HSV-ABDS₁」]、ABDS₂ [「HSV-ABDS₂」])の存在下、有効な薬物(M₄N [「HSV-4N」]およびACV [「HSV-ACV」])の存在下でのHSV-1複製。

20

【図9A】M₄Nは、哺乳動物細胞における成長停止を引き起こす。(a～d)C3細胞、CEM-T4細胞、C33a細胞およびTC-1細胞を、異なる濃度のM₄Nで処理した。この実験の開始時に存在する細胞の数は、0日目として示される。3日後、生存細胞の数を計数し、そしてM₄N濃度に対してプロットした。

【図9B】M₄Nは、哺乳動物細胞における成長停止を引き起こす。(a～d)C3細胞、CEM-T4細胞、C33a細胞およびTC-1細胞を、異なる濃度のM₄Nで処理した。この実験の開始時に存在する細胞の数は、0日目として示される。3日後、生存細胞の数を計数し、そしてM₄N濃度に対してプロットした。

30

【図9C】M₄Nは、哺乳動物細胞における成長停止を引き起こす。(a～d)C3細胞、CEM-T4細胞、C33a細胞およびTC-1細胞を、異なる濃度のM₄Nで処理した。この実験の開始時に存在する細胞の数は、0日目として示される。3日後、生存細胞の数を計数し、そしてM₄N濃度に対してプロットした。

【図9D】M₄Nは、哺乳動物細胞における成長停止を引き起こす。(a～d)C3細胞、CEM-T4細胞、C33a細胞およびTC-1細胞を、異なる濃度のM₄Nで処理した。この実験の開始時に存在する細胞の数は、0日目として示される。3日後、生存細胞の数を計数し、そしてM₄N濃度に対してプロットした。

【図9E】M₄Nは、哺乳動物細胞における成長停止を引き起こす。(e)C3細胞を、1つのフラスコあたり5×10³個の細胞でT-25フラスコに分割し、そして倍地中1%のDMSO中のM₄Nまたは倍地中1%のDMSO単独のいずれかを与えた(第1の培地変化)。3日後、M₄N処理された細胞の半分に、同じ条件を有する新鮮な培地を与えた(第2の培地変化)。これらの細胞を、毎日計数し、そして処理時間に対してプロットした。

40

【図10】M₄Nで処理された細胞は、G2/Mで停止する。C3細胞(a)、C33a細胞(b)、CEM-T4細胞(c)、およびTC1細胞(d)を、1% DMSOまたはM₄Nを含む1% DMSO(M₄N)のいずれかを含有する培地中で3日間成長させた。これらの細胞をトリプシン処理し、エタノールで固定し、ヨウ化プロピジウムで染色し、続けてフローサイトメトリーで分析した。データを、細胞数(3～5×10⁴個の全細胞)対ヨウ化プロピジウム染色強度として示す。細胞周期の示された段階は標識されそ

50

して染色強度により決定した場合の相対的細胞DNA全量 (c o m p l i m e n t) に対応する。

【図11A】40 μ M M_4N で処理されたC3細胞は、G2細胞構造を実証する。C3細胞を、1% DMSO (コントロール) または40 μ Mの M_4N を含む1% DMSO (M_4N) のいずれかを含有する培地中で3日間カバースリップ上で成長させた。サンプルをエタノールで固定し、そして (緑色) チューブリンおよび (橙色) チューブリンに対する抗体 (a) またはDAPI DNA染料 (b) と共にインキュベートした。細胞を、蛍光顕微鏡により試験した。

【図11B】40 μ M M_4N で処理されたC3細胞は、G2細胞構造を実証する。C3細胞を、1% DMSO (コントロール) または40 μ Mの M_4N を含む1% DMSO (M_4N) のいずれかを含有する培地中で3日間カバースリップ上で成長させた。サンプルをエタノールで固定し、そして (緑色) チューブリンおよび (橙色) チューブリンに対する抗体 (a) またはDAPI DNA染料 (b) と共にインキュベートした。細胞を、蛍光顕微鏡により試験した。

【図12】CDC2およびウイルスオンコジーンは、 M_4N により減少する。C3細胞を、1% DMSO (D) または40 μ M M_4N を含む1% DMSO (M) のいずれかを含有する培地中で異なる量の時間 (数字は、時間である) 成長させた。特定の時間の後、全タンパク質または全RNAを、これらの細胞から単離した。ウエスタンブロット (上二つのパネル) を、同じにトロセルロースフィルターを用いてCDC2に対する抗体またはサイクリンBに対する抗体を使用して実行した。キナーゼアッセイ (a - 下二つのパネル) を、サイクリンBに対する抗体を用いる免疫沈降の後、 -3^2P ATPおよびヒストンH1とのインキュベーションにより実行した。PAGEゲルのクーマシー染色は、負荷についてのコントロールとして含まれる。24時間および72時間の薬物処理についてのキナーゼアッセイを、別々に行った。ノーザンブロット (b) を、全RNA抽出物に対して行った。フィルターを、ランダムプライム 3^2P 標識DNAと共にCDC2またはGAPDHについて一晩インキュベートし、洗浄し、そして3日間フィルムに写した。同じフィルターを使用して、CDC2およびGAPDH RNAを試験した。rtPCR分析 (c) を、HPV-16 E7またはGAPDHのいずれか内の領域にハイブリダイズしているプライマーを用いて全RNA抽出物に対して行った。両方のプライマー対を、同じ反応に使用し、そしてその産物を、アガロースゲル電気泳動により分析した。

【図13A】HIV Sp1結合部位 (- 87 ~ - 49) との G_4N 相互作用の電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) 。 (A) 3^2P 標識HIV Sp1 DNAテンプレートに対するSp1-167Dの結合の G_4N 阻害。レーン1、テンプレートのみ；レーン2、テンプレートおよび0.1 μ gのSp1-167D；レーン3~9、増加する濃度の G_4N (0.1 μ g Sp1-167Dの添加前、0.25~1.75 mM) と共にインキュベートされたテンプレート。

【図13B】HIV Sp1結合部位 (- 87 ~ - 49) との G_4N 相互作用の電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) 。 (B) HIVテンプレートに結合したSp1-167Dの G_4N 置換。レーン1、テンプレートのみ；レーン2、テンプレートおよび0.1 μ gのSp1-167Dおよび100倍過剰の非標識テンプレート；レーン3、テンプレートおよび0.1 μ gのSp1-167D；レーン4~10、増加する濃度の G_4N (0.25~1.75 mM) でチャレンジしたSp1/DNA複合体；レーン11、1.75 mMの G_4N を含有する反応緩衝液中でインキュベートしたテンプレート。

【図13C】HIV Sp1結合部位 (- 87 ~ - 49) との G_4N 相互作用の電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) 。 (C) テンプレートに結合した G_4N のSp1-167D置換。レーン1、テンプレートのみ；レーン2~4、テンプレートおよび増加する量のSp1-167D (0.075、0.150、0.300 μ g) ；レーン5~8、1.2 mMの G_4N を含有する反応緩衝液中でインキュベートし、次いで増加する量のSp1-167D (0.075、0.150、0.300 μ g) でチャレンジしたテンプレート、レーン8、Sp1-167D投与なし。

10

20

30

40

50

【図13D】HIV Sp1結合部位(-87~-49)とのG₄N相互作用の電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)。(D)使用される(A)...および(B)における増加する濃度のG₄Nに応じて減少するSp1-167D/DNA複合体バンド強度のプロット。使用されるゲルは、5%非変性ポリアクリルアミドであり、各レーンは、実験項および参考文献[1]に記載されるとおりそれぞれ5μlの反応容積を受容する。

【図14】Cos細胞におけるHIV Tat調節トランス活性化(transactivation)のG₄Nによる阻害。

【図15】G₄Nの存在下でのSIV産生。10⁷個の174x細胞(ヒトT細胞リンパ腫細胞株)を、SIV mac 239の24時間収穫ストック(4ngのp27)と2時間37で混合した。細胞を再懸濁し、そして100μlの培地中の1×10⁵個の細胞を、3つの96ウェルプレートの各ウェルに添加した。新たに作製したストックからの種々の濃度のG₄Nを調製し、そして6つの設計したウェルの各々に添加した。培養上清を4日後および8日後にウイルス産生分析のために収集した。ウイルス産生を、実験項に記載されるように、改変p27カプシドタンパク質抗原捕捉ELISAによりアッセイした。

10

【図16】H9細胞におけるHIV p24抗原産生のG₄Nによる阻害。阻害パーセントを、AZT耐性HIV株であるHIV-1RTMFを用いたウイルス感染後9日目の、G₄N処理されたH9細胞およびG₄N処理していないH9細胞の2つの2連培養物の平均からp24レベルを比較することにより計算した。

20

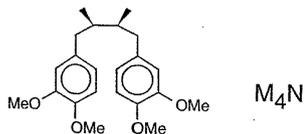
【図17】サービピン(Survivin)遺伝子発現のRT-PCR分析。(a)上:それぞれの24時間および72時間(レーン3および4)40μMのm4Nで処理されたC3細胞、ならびに未処理のコントロール(レーン1および2)におけるサービピン遺伝子発現。下:対応するGAPDHコントロール。バンド強度は、Scion Imageを用いて定量した。(b)サービピンRT-PCR産物シグナルを、GAPDHコントロールのシグナルに対して正規化し、プロットした。

【図18】サービピン(survivin)タンパク質の薬物濃度依存性下方調節。(a)C3細胞を、種々の濃度のM₄Nと共に72時間インキュベートし、そして全細胞溶解物を、サービピンに対して免疫プロットした。(b)相対バンド強度を、Scion Imageにより定量し、そしてM₄N濃度に対してプロットした。

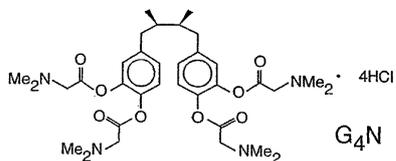
30

【図19】M₄Nで72時間処理されたC3細胞におけるカスパーゼ-3切断の免疫プロット分析。(a)カスパーゼ-3のウエスタンプロットは、32kDのプロカスパーゼ-3の切断および活性な20kDの切断された産物の形成を示した。(b)バンド強度を定量し、そしてM₄N濃度に対してプロットした。

【 図 1 】



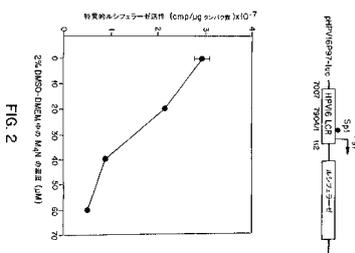
meso-1,4-ビス(3,4-ジメトキシフェニル)-(2R,3S)-ジメチルブタン



meso-1,4-ビス[3,4-(ジメチルアミノアセトキシ)フェニル]-(2R,3S)-ジメチルブタン塩酸塩

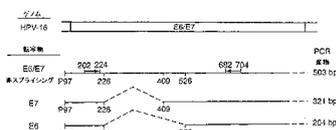
FIG. 1

【 図 2 】



【 図 3 C 】

FIG. 3C



【 図 4 A 】

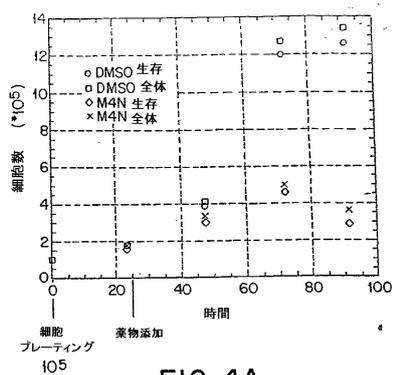


FIG. 4A

【 図 4 B 】

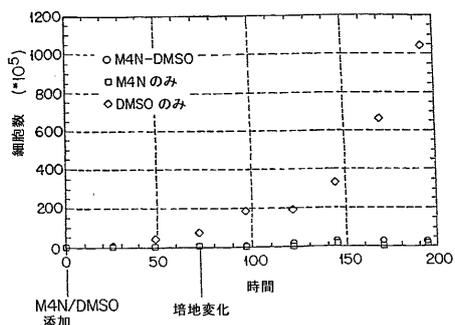
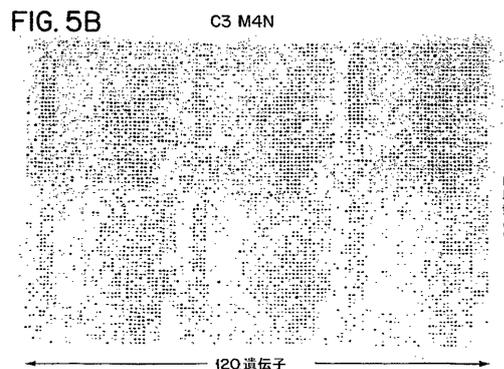
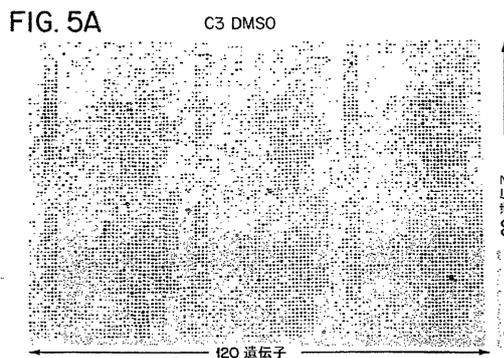
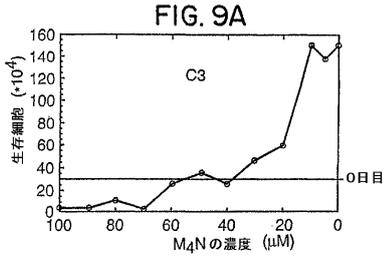


FIG. 4B

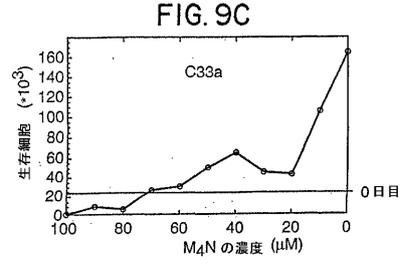
【 図 5 】



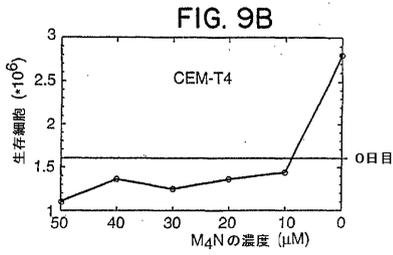
【 図 9 A 】



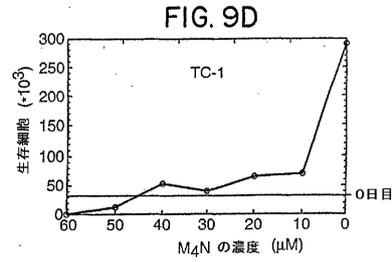
【 図 9 C 】



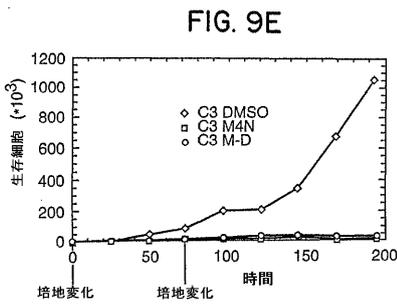
【 図 9 B 】



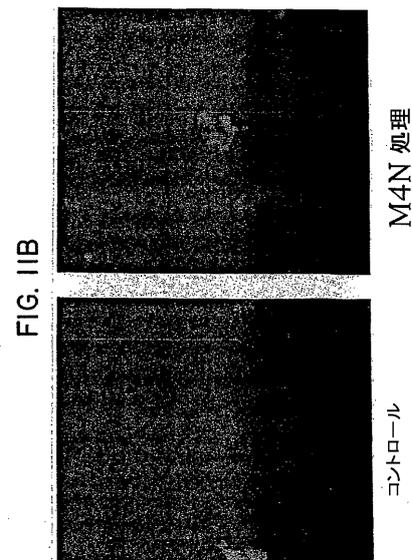
【 図 9 D 】



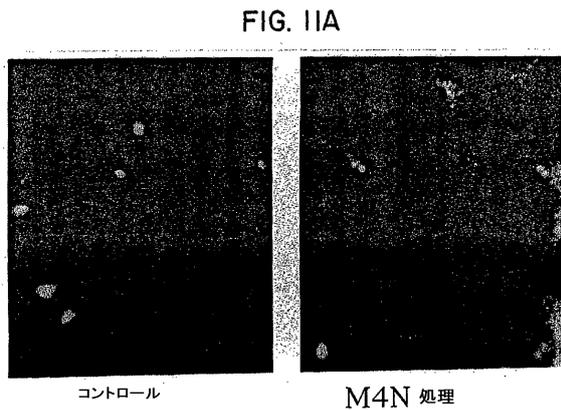
【 図 9 E 】



【 図 1 1 B 】



【 図 1 1 A 】



【 図 1 2 】

FIG. 12A

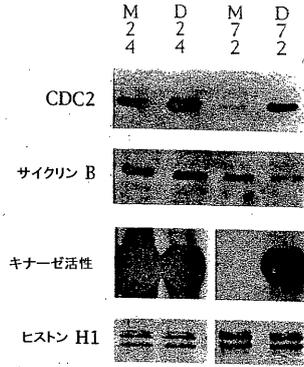


FIG. 12B

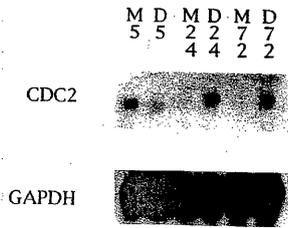
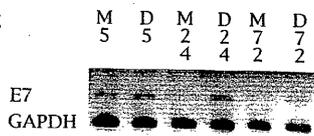


FIG. 12C



【 図 1 3 B 】

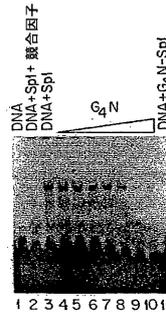
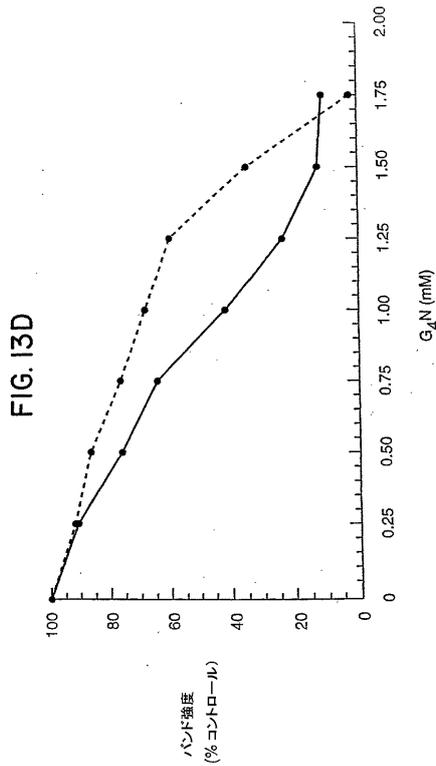
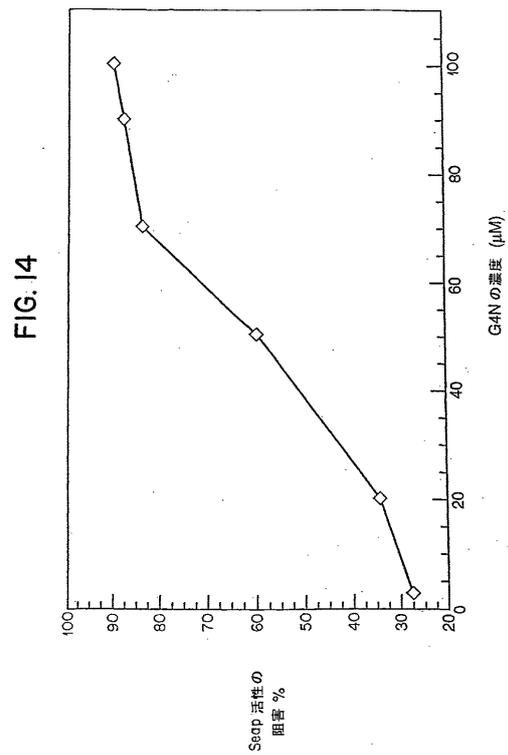


FIG. 13B

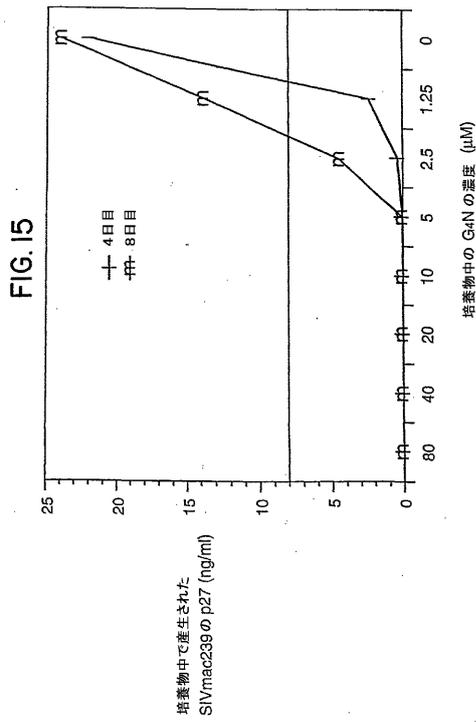
【 図 1 3 D 】



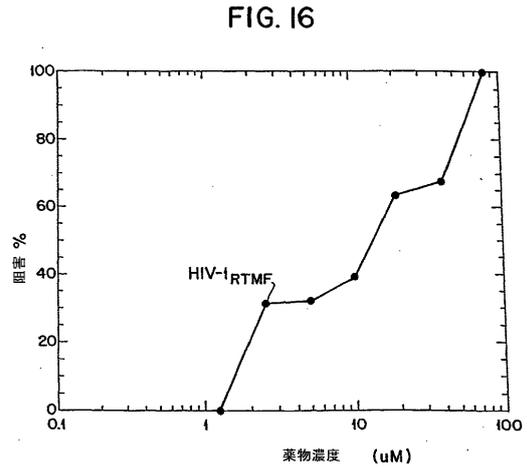
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

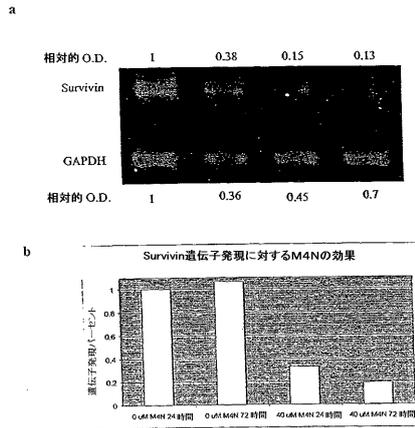


FIG. 17A

FIG. 17B

【 図 1 8 】

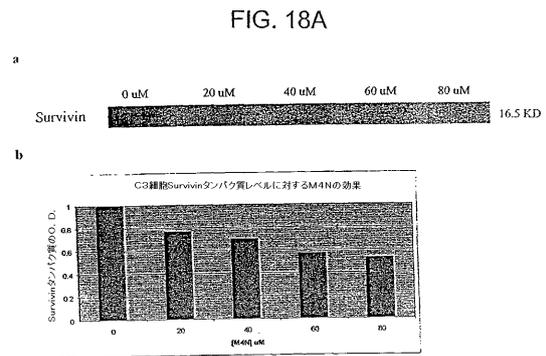


FIG. 18B

【 図 19 】

FIG. 19A

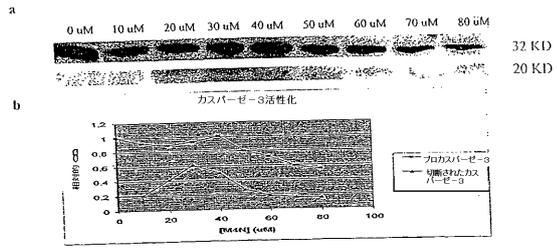


FIG. 19B

【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
14 November 2002 (14.11.2002)

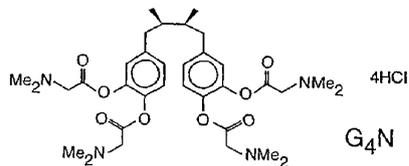
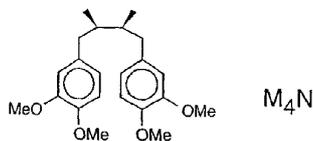
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/089795 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 31/417, 31/405, 31/401, 31/225, 31/075, 31/198
- (74) Agent: HOBBS, Ann, S.; VENABLE, BAETJER, HOWARD & CIVILETTI, J.L.P. 1201 New York Avenue, Suite 1000, P.O. Box 34385, Washington, DC 20043-9998 (US).
- (21) International Filing Number: PCT/US02/14374
- (22) International Filing Date: 8 May 2002 (08.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/851,425 9 May 2001 (09.05.2001) US
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, 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, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): HUANG, Ru Chih, C. [US/US]; 3400 N. Charles Street, Baltimore, MD 21218 (US). HELLER, Jonathan, D. [US/US]; 8208 Beach Drive, Dundalk, MD 21222 (US). CHANG, Chih-Chuan [CN/US]; 3501 St. Paul Street, Apt. 827, Baltimore, MD 21218 (US).
- Published: with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR TREATMENT OF TUMORS USING NORDIHYDROGUAIARETIC ACID DERIVATIVES



(57) Abstract: Use of nordihydroguaiaretic derivatives to suppress CDC-2 and survivin, stimulate apoptosis, and treat tumors.



WO 02/089795 A1

WO 02/089795 A1 

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 "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 02/089795

PCT/US02/14374

**METHOD FOR TREATMENT OF TUMORS USING
NORDIHYDROGUAIARETIC ACID DERIVATIVES**

5 The invention described and claimed herein was made in part with funds
from Grant No. AI 32301 from the National Institutes of Health and U.S. Army
Medical Research Grant DAMD 17-93-C3122. The U.S. Government has certain
rights in the invention.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10

1. Field of the Invention

The invention relates to the use of nordihydroguaiaretic acid
derivatives, in particular derivatives containing substituents of naturally
occurring amino acids, for the treatment of tumors and viral infections.

15

2. Background Information

Carcinogenesis is a multistage event affected by a variety of genetic
and epigenetic factors and is typified by the outbreak of uncontrolled cell
growth originated from different tissues. A universal goal for anticancer
20 research lies in the development of a clinical treatment that is highly effective
in curtailment of tumor growth, non-toxic to the host, and is affordable for
most patients. Drugs that focus on the inhibition of targets that are unique to
dividing cells should be effective chemotherapeutic agents without the risk of
substantial side effects.

25

Cells pass through many checkpoints as they proceed through the cell
cycle. Certain criteria must be met in order to pass each of these
checkpoints. In the G2/M transition, the most essential regulator is the cyclin-
dependent kinase CDC2. This kinase binds tightly to the regulatory protein
cyclin B, and this complex, also called the maturation promoting factor (MPF),
30 is responsible for stimulating a myriad of events that lead to the cell's entry
into early prophase (1). Not surprisingly, the loss or deactivation of either
component of the MPF will block cellular progression out of G2.

WO 02/089795

PCT/US02/14374

The expression and activity of the MPF is regulated at different levels. Cyclin B protein levels slowly rise through the G1 and S phases of the cell cycle, peak during the G2 to M phase transition, and drop sharply during mitosis (2). The CDC2 protein, on the other hand, is always present during the cell cycle, although levels rise slightly in the last stages of the G2 phase (3). The activity of the protein is dependent on the association with the appropriate cyclin, as well as on the dephosphorylation of its inhibitory sites by the phosphatase CDC25C (4,5). It has been shown that the failure of this dephosphorylation initiates G2 arrest in response to DNA damage by radiation or chemical action. Recent evidence also suggests that any remaining active CDC2 may be transported outside the nucleus following DNA damage (6).

A number of naturally occurring derivatives of the plant lignan nordihydroguaiaretic acid (NDGA) have been shown to block viral replication through the inhibition of viral transcription. This earlier work has shown that NDGA derivatives, originally isolated from *Larrea Tridentata* and subsequently synthesized chemically, can inhibit the production of HIV (7,8), HSV (9), and HPV transcripts (10) by the deactivation of their Sp1-dependent promoters. Unexpectedly, one of these derivatives, tetra-O-methyl NDGA, appears to also induce cell cycle arrest in mammalian cell lines. The evidence presented hereinbelow demonstrates that M₂N is capable of inducing G2 arrest in mammalian cells without detected toxicity, and supports the view that this arrest is due to the inhibition of the cyclin-dependent kinase CDC2.

Human papillomavirus (HPV) infection causes unregulated cell growth in many types of squamous epithelial cells, resulting in afflictions ranging from benign papillomae (warts) to cervical, penile and mouth cancer. The strong association of these cancers with HPV and the widespread occurrence of infection denotes the importance of developing an anti HPV therapy.

Most, if not all, viruses, including those replicatively active mutants, are host dependent. They require the participation of certain cellular factors for supporting viral growth. Host cellular factors, unlike viral proteins, are not under mutational pressure and are in general, structurally invariable. Thus, compounds that block the usage of these cellular factors at different stages of

WO 02/089795

PCT/US02/14374

the viral life cycle are likely to be good candidates as mutation insensitive antiviral drugs. Several studies using cellular factors as alternative targets for the inhibition of HIV-1 have been reviewed (11).

Applicants reported earlier that 3'-O-methylated NDGA (i.e. Ma1.4),
5 isolated from Creosote bush (*Larrea tridentata*) can specifically block basal HIV transcription, Tat-regulated transactivation, and HIV replication in human cell culture (8, 12, 13). Ma1.4 exerts its effects by interfering with the binding of transcription factor Sp1 to the promoter of the HIV proviral template. The target of Ma1.4 is mapped to nucleotides -87 to -40, the Sp1 binding sites of
10 the HIV long terminal repeat (LTR). The unmodified NDGA, *in vitro*, does not inhibit HIV transcription and has no effect on Sp1 binding (8).

Isolation and purification of plant lignans, however, is labor intensive and costly. In anticipation of the possible clinical use of plant lignans in controlling Sp1-regulated viral and tumor growth in humans, nine different
15 methylated NDGA activities were synthesized chemically using unmethylated NDGA as the parent substrate in large quantities with low cost (7). At drug concentrations below 30 μM , tetra-O-methyl NDGA was found to be most effective in the control of replication HIV via inhibition of Sp1 regulated proviral transcription and transactivation (7). This study has since been
20 extended to the control of the growth of Herpes simplex virus (HSV-1 and HSV-2) (9). Herpes simplex immediate early (IE) ICP4 gene is essential for HSV replication (14). Its promoter region possesses eight Sp1 consensus binding sites (15), five of which are required for ICP4 gene expression. It thus makes the ICP4 gene a good candidate for such testing. Applicants have found
25 that both 3-O-methyl NDGA (Ma1.4) and tetra-O-methyl NDGA (M4N) are effective transcriptional inhibitors for HSV ICP4 gene expression in Vero cells via the blocking of Sp1 protein binding to the ICP4 promoter as shown by the electrophoretic mobility shift assay (9).

When the anti-HSV activities of M4N and Ma1.4 were tested and
30 compared to that of acycloguanosine (acyclovir, ACV) in infected Vero cells, Applicants observed that the IC_{50} for M4N varied between 11.7 μM to 4 μM for 10 passages of HSV-1 and 4 passages of HSV-2 without obvious uprisings

WO 02/089795

PCT/US02/14374

trend for requirement of higher drug concentration. However, the IC_{50} for ACV increased from 7 μ M for the first viral passage to 444 μ M for the tenth passage of HSV-1 and to >88 μ M for the fourth passage of HSV-2 indicating their rapid build-up of drug resistance against ACV in Vero cells.

- 5 Consequently, while the selective index, S.I. (TC_{50}/IC_{50}) remained relatively stable for M_4N , the S.I. for ACV dropped 60 fold following the viral passages in Vero cells (9). Thus M_4N is a mutation insensitive drug. It can inhibit ACV resistant HSV effectively (9).

- Due to the fact that Sp1 is an important cellular transcription factor (16), the possible inhibitory effect of this class of compounds on the expression of Sp1-regulated cellular genes should be addressed. $Ma1.4$ cannot displace Sp1 once it is stably bound to its binding sites (8). It therefore seemed likely that NDGA derivatives would have a greater effect on Sp1-regulated genes in proliferating cells than on the expression of Sp1-regulated housekeeping genes in stationary cells. In the former case, the drug will be able to compete with Sp1 protein for the Sp1 sites in gene promoters during DNA synthesis, while in the latter case, the drug may have little effect on the transcribing chromatin of housekeeping genes with Sp1 protein already stably bound at their promoters. This, in fact, has been shown to be the case. As will be demonstrated below, by using gene array studies with 9600 expressed genes, Applicants found products of most Sp1 regulated genes remained at similar levels, and not affected by the drug treatment of cervical cancer cells C3 in culture (Figure 5). Even so, the relatively low selective index of M_4N certainly limits its use to the lowest effective concentration if the drug must be used systemically. On the other hand, human papilloma virus induces solid cervical and oral tumors initially through the Sp1 regulated expression of HPV E_6E_7 genes (17). Applicants reasoned that if drug can be delivered *in situ*, and be kept only in the tumor area, the drugs of high concentration may be used to effectively destroy the tumor with little damage to the patients.

Survivin is an inhibitor of apoptosis that is abundantly expressed in many human cancers (35), but not in normal adult human tissue, and is considered a

WO 02/089795

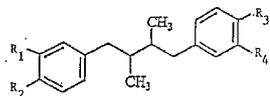
PCT/US02/14374

possible modulator of the terminal effector phase of cell death/survival. (36). Survivin is expressed in G₂-M in a cell cycle-dependent manner, binding directly to mitotic spindle microtubules. It appears that survivin phosphorylation on Thr34 may be required to maintain cell viability at cell division (37), and expression of a phosphorylation-defective survivin mutant has been shown to trigger apoptosis in several human melanoma cell lines (38). Phosphorylated survivin acts on the caspase pathway to suppress the formation of caspase-3 and caspase-9, thereby inhibiting apoptosis. (Ref. 39, page 10 presents an outline of apoptosis signalling pathways.) Thus, compounds that reduce the expression of survivin will be expected to increase the rate of apoptosis and cell death. CDC-2 has been shown to be necessary for survivin phosphorylation (37).

SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, it is one object of the invention to provide compounds and compositions for use in the treatment of cancerous and noncancerous tumors in animals, particularly in mammals, and most particularly in humans. According to this aspect of the invention, novel nordihydroguaiaretic acid derivatives are provided that inhibit tumor growth.

By nordihydroguaiaretic acid derivatives is meant compounds of the structure



(I)

wherein R₁, R₂, R₃ and R₄ independently represent -OH, -OCH₃, -O(C=O)CH₃, or an amino acid residue, but are not each -OH simultaneously. Amino acid substituents are intended to include, *inter alia*, alanine, arginine, asparagine, aspartate, cysteine, glutamate, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine,

WO 02/089795

PCT/US02/14374

proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine, 5-hydroxylysine, 4-hydroxyproline, thyroxine, 3-methylhistidine, ϵ -N-methyllysine, ϵ -N,N,N-trimethyllysine, aminoadipic acid, γ -carboxyglutamic acid, phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosine, N-methylarginine, and N-acetyllysine.

5 Particularly preferred compounds for use according to the invention are M_2N and G_4N , which are shown in Figure 1.

It is a further object of the invention to provide a method for treating cancerous and noncancerous tumors by the use of these novel derivatives, and by similar derivatives that are known in the art, but have not heretofore
10 been used for the treatment of tumors. The method should be especially effective against rapidly proliferating cell types containing the cyclin dependent kinase CDC2. It is a further object of the invention to provide a method of inhibiting CDC2 in a eukaryotic cell cycle, particularly in an animal cell, more particularly in a mammalian cell, and most particularly in a human
15 cell.

Tumors to be treated include any tumor that is sensitive to the above-mentioned compounds used according to the methods of the invention. In particular, this includes rapidly dividing cancerous and benign tumors that are sensitive to inhibition of the cyclin-dependent kinase CDC2 cycle.

20 The term "cancerous tumor" is intended to include any malignant tumor that may or may not have undergone metastasis. The term "noncancerous tumor" is intended to include any benign tumor. These terms are used as customarily understood by persons of skill in the art.

Examples of benign and malignant tumors which may be treated by the
25 compositions and methods of the invention can be found in Table 1-1 of Cancer Biology (Raymond W. Ruddon, Cancer Biology, 3rd Ed., Oxford Univ. Press, 1995, incorporated herein by reference). Tumors to be treated include those that are known to be of viral origin, as well as those that are not of viral origin. The compositions and methods of the invention are expected to be
30 particularly useful in the treatment of solid tumors.

It is yet another object of the invention to provide a method of inhibiting the cyclin-dependent kinase CDC2 cycle. This method will be useful in

WO 02/089795

PCT/US02/14374

inhibiting cell proliferation, particularly in rapidly dividing cell types.

In a preferred embodiment, the compounds and compositions described herein are used in the treatment of HPV-induced tumors. HPV-induced tumors include in particular, but are not limited to, cervical, oral, penile and head and neck cancers that are associated with HPV infection. The method comprises local application of nordihydroguaiaretic acid derivatives, in particular tetra-O-methylnordihydroguaiaretic acid (M_4N) and tetraglycinal nordihydroguaiaretic acid (G_4N), to cancerous and non-cancerous HPV-induced tumors.

It is yet another object of the invention to provide a method of inhibiting viral replication and growth by the administration of the compounds of formula I containing amino acid substituents. Preferred for use in this method are compounds in which the amino acid substituents R_1 , R_2 , R_3 and R_4 are identical.

It is a further object of the invention to provide a method of inhibiting survivin production in a eukaryotic cell cycle in a cell that expresses survivin, particularly in a cancer cell. The inventors have found that the nordihydroguaiaretic acid derivatives of the invention downregulate survivin mRNA and protein levels and activate both CDC-2 and the caspase pathway, thereby increasing the level of apoptosis in cell populations where survivin is expressed. This method should provide a treatment for cancers where survivin is expressed by suppressing or eliminating survivin expression, thereby increasing the rate of apoptosis.

It is contemplated that M_4N , G_4N and other derivatives will be administered by local injection into the tumors, generally along with pharmaceutically acceptable diluents, excipients and carriers. In preferred embodiments, M_4N is injected into tumors in the form of a DMSO solution, and G_4N is administered in PBS solution. The use of G_4N will complement the use of M_4N , particularly in larger tumors ($> 2 \text{ cm}^3$), due to its water solubility, which allows it to spread to a larger region of the tumor. Other water-soluble and water-insoluble nordihydroguaiaretic acid derivatives can be similarly employed, according to the invention. These may also be employed in lipid based formulations for systemic delivery, as known and

WO 02/089795

PCT/US02/14374

used in the art.

By pharmaceutically acceptable diluents, excipients and carriers is meant such compounds as will be known to persons of skill in the art as being compatible with M₄N, G₄N and other similar derivatives and suitable for local administration to a human or other mammal according to the invention.

Although the examples hereinbelow describe administration by means of local injection, other means of local administration, such as topical application or targeted delivery to the tumor site, may also be used.

The amount of compound administered to obtain the desired treatment effect will vary but can be readily determined by persons of skill in the art. The amount of dosage, frequency of administration, and length of treatment are dependent on the circumstances, primarily on the size and type of tumor. However, dosages of from 10 mg to 20 mg of either M₄N alone or with similar amounts of G₄N per gram tumor weight at intervals from daily to weekly or less frequently may be mentioned for purposes of illustration. Administration of 50 μ l to 100 μ l of M₄N dissolved in DMSO at a concentration of 200 mg/ml, either alone or in combination with G₄N, is expected to be effective in many cases for tumors of 1-1.5 cm³.

20 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Structures of M₄N and G₄N

Figure 2A. HPV-16 LCR showing region of E₆/E₇ promoter (pPV16P97) and the binding site for Sp1 protein.

Figure 2B. The effect of M₄N on the E₆/E₇ promoter activity in C-33A cells. (Inhibition of E₆/E₇ promoter driven luciferase gene transcription by different concentration of M₄N)

Figures 3A-3C. Inhibition of Viral E₆ and E₇ RNA Transcripts by 40 μ M M₄N. Total RNA isolated from C₃ cells treated with either 40 μ M M₄N or

WO 02/089795

PCT/US02/14374

DMSO alone in growth media for 71 hours was subjected to relative RTPCR. The RTPCR samples were removed after increasing cycles of amplification and resolved on an agarose gel. The gel photographs (3A and 3B) indicate these cycles, the presence of (+) or absence (-) of M₄N in the growth media, and two digests of a pGMT vector used as size markers. The amplification map (2C) indicates the two expected size products of the amplification, resulting from the alternate splicing of the early viral RNA transcript.

Figure 4A. Inhibition of C3 Cell Growth by M₄N.

Figure 4B. Inhibition of C3 Cell Growth Following the Removal of M₄N.

Figures 5A-5B. Effect of M₄N on gene expression in C3 cells as examined by the GENE Assay analysis. 5A. GENE expressed in C3 cells after > 2 hours of DMSO treatment (C3 DMSO). 5B. GENE expressed in C3 cells after > 2 hours of M₄N treatment using DMSO as solvent (C3 M₄N).

Figures 6A-6B. Visual observations of tumor-bearing mice following M₄N treatment. 6A. Mice bearing single tumors were treated with in situ injection of DMSO (#3) or M₄N (#7). *In situ* injection of M₄N was also made to one of the two tumors grown in mouse #9. 6B. M₄N treated tumor (white scar) with untreated tumor from the same mouse, #9 as described in Table 2.

Figure 7. Histopathology Effect of M₄N and M₄N/G₄N on Tumor Growth in Mice. First column from the panel presents the large size of tumors from mouse #4, 10, 12, following DMSO treatment (CON) as compared to the relatively small drug treated (M₄N or M₄N/G₄N) lesions from mouse #12, 10, 27 and 20 (M₄N). The subsequent photographs are examples of these tumors examined at 100X magnification (A, B, C, DMSO treated, D untreated, E, F, G, H, M₄N or M₄N/G₄N treated) mice (Table 1 and Table 2).

Figure 8. HSV-1 replication in the absence of drugs (HSV-C, HSV-SC), in the

WO 02/089795

PCT/US02/14374

presence of ineffective drugs (ABDS₁ ["HSV-ABDS₁"], ABDS₂ ["HSV-ABDS₂"]) and in the presence of effective drugs (M₄N ["HSV-4N"] and ACV ["HSV-ACV"]).

- 5 Figure 9. M₄N Causes Growth Arrest in Mammalian Cells. (a-d) C3, CEM-T4, C33a, and TC-1 cells were treated with different concentrations of M₄N. The number of cells present at the initiation of the experiment is indicated as Day 0. After three days the number of viable cells were counted and plotted versus the M₄N concentration. (e) C3 cells were split into T-25
- 10 flasks with 5×10^3 cells per flask and given either M₄N in 1% DMSO in media or 1% DMSO in media alone (first media change). After 3 days, one-half of the M₄N treated cells were given fresh media containing only 1% DMSO (M-D), while the rest of the cells were given fresh media with the same conditions (second media change). The cells were counted daily and plotted versus the
- 15 time of treatment.

- Figure 10. Cells Treated With M₄N Arrest in G2/M. C3 cells (a), C33a cells (b), CEM-T4 cells (c), and TC1 cells (d) were grown for three days in media containing either 1% DMSO or 1% DMSO with M₄N (M₄N). The cells
- 20 were trypsinized, fixed with ethanol, stained with propidium iodide, and were subsequently analyzed by flow cytometry. The data is displayed as number of cells ($3-5 \times 10^4$ total cells) versus propidium iodide stain intensity. The indicated stages of the cell cycle are labeled and correspond to the relative cellular DNA complement as determined by staining intensity.

- 25 Figure 11. C3 Cells Treated With 40 μ M M₄N Demonstrate G2 Cell Structures. C3 cells were grown on coverslips for three days in media containing either 1% DMSO (Control) or 1% DMSO with 40 μ M M₄N (M₄N). Samples were fixed with ethanol and incubated with antibodies against α (green) and γ (orange) tubulin (a)
- 30 or with the DAPI DNA stain (b). Cells were examined by fluorescence microscopy.

WO 02/089795

PCT/US02/14374

- Figure 12. CDC2 and Viral Oncogenes are Reduced by M₄N. C3 cells were grown for different amounts of time (numbers are in hours) in media containing either 1% DMSO (D) or 1% DMSO with 40 μM M₄N (M). After the specified times, total protein or total RNA was isolated from the cells.
- 5 Western blots (a - top two panels) were performed using antibodies against CDC2 or cyclin B with the same nitrocellulose filter. Kinase assays (a - bottom two panels) were performed, following immunoprecipitation with antibodies to cyclin B, by incubation with γ-³²P ATP and histone H1. The coomassie stain of the PAGE gel is included as control for loading.
- 10 assays for 24 and 72 hour drug treatments were performed separately. Northern blots (b) were performed on total RNA extracts. Filters were incubated overnight with random-primed ³²P-labeled DNA for CDC2 or GAPDH, washed, and exposed to film for three days. The same filter was used to test CDC2 and GAPDH RNA. rtPCR analysis (c) was performed on total RNA extracts with
- 15 primers hybridizing to regions within either HPV-16 E7 or GAPDH. Both primer pairs were used in the same reactions, and the products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

- Figure 13. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of G₄N interaction with the HIV Sp1-binding sites (-87 to -49). (A) G₄N inhibition of Sp1-167D binding to ³²P labeled HIV Sp1 DNA template. Lane 1, template alone; lane 2,
- 20 template plus 0.1 μg Sp1-167D; lanes 3-9, template incubated with increasing concentrations of G₄N (0.25 to 1.75 mM prior to the addition of 0.1 μg Sp1-167D). (B) G₄N displacement of Sp1-167D bound to HIV template. Lane 1,
- 25 template alone; lane 2, template plus 0.1 μg Sp1-167D plus 100-fold excess of unlabeled template; lane 3, template plus 0.1 μg Sp1-167D; lanes 4-10, Sp1/DNA complex challenged with increasing concentrations of G₄N (0.25 to 1.75 mM); lane 11, template incubated in reaction buffer containing 1.75 mM G₄N. (C) Sp1-167D displacement of G₄N bound to template. Lane 1, template
- 30 alone; lanes 2-4, template plus increasing amounts of Sp1-167D (0.075, 0.150, 0.300 μg); lanes 5-8, template incubated in reaction buffer containing

WO 02/089795

PCT/US02/14374

1.2 mM G₄N followed by challenge with increasing amounts of Sp1-167D (0.075, 0.150, 0.300 μg), lane 8 received no Sp1-167D. (D) Plot of diminishing Sp1-167D/DNA complex band intensities in response to increasing concentrations of G₄N used in (A) --- and (B) →. The gels used were 5% non-denaturing polyacrylamide with each lane receiving 5 μl of each reaction volume as described in experimental section and Ref. [1].

Figure 14. Inhibition of HIV Tat-regulated transactivation in Cos cells by G₄N.

10 Figure 15. SIV production with presence of G₄N. 10⁷ 174 x cells, a human T-cell lymphoma cell line, were mixed with a 24 hrs. harvest stock of SIV mac 239 (4 ng of p27) for two hours at 37. Cells were resuspended and 1 x 10⁵ cells in 100 μl medium were added to each well of three 96-well plates. Various concentrations of G₄N from a freshly made stock were prepared and added to each of the six
15 designed well. Culture supernatants were collected after four and eight days for viral production analysis. Viral production was assayed by a modified p27 capsid protein antigen capture ELISA as described in experimental section.

Figure 16. Inhibition of HIV p24 antigen production in H9 cells by G₄N.

20 Inhibition in percentage was calculated by comparing p24 level from an average of two duplicate cultures of G₄N treated and not treated H9 cells 9 days following viral infection with a AZT resistant HIV strain, HIV-1RTMF.

Figure 17. RT-PCR Analysis of Survivin Gene Expression. (a) Top: Survivin gene expression in C3 cells treated with 40 μM M₄N for 24 hours and 72 hours, respectively (lanes 3 and 4) and in the untreated controls (lanes 1 and 2). Bottom: the corresponding GAPDH controls. Band intensities were quantitated with Scion Image. (b) Survivin RT-PCR product signals were normalized to those of the GAPDH controls and plotted.

30

Figure 18. Drug concentration-dependent down-regulation of survivin protein. (a) C3 cells were incubated with various concentrations of M₄N for 72 hours and the

WO 02/089795

PCT/US02/14374

total cell lysate was immunoblotted against survivin. (b) Relative band intensities were quantitated by Scion Image and plotted against M_4N concentration.

Figure 19. Immunoblot analysis of caspase-3 cleavage in C3 cells treated with M_4N for 72 hours. (a) Western blot of caspase-3 showed cleavage of the 32 KD procaspase-3 and the formation of the active 20 KD cleaved product. (b) Band intensities were quantitated and plotted against M_4N concentration.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

10 Experimental Methods

NDGA derivatives were synthesized chemically (7). Cell line C3 is a HPV16E + L plus activated Ras transformed cell line of C57 BL/6kh origin provided by W. Martin Kast of Loyola University Medical Center, Chicago, Illinois, U.S.A. It is maintained and cultivated as described by Greenstone et al. (18) and Feltkamp et al. (19, 20).

Synthesis of G_4N :

Standard Procedure for the Preparation of *meso*-1,4-Bis [3,4 - (dimethylaminoacetoxy) phenyl]- (2R,3S)- dimethylbutane Hydrochloride Salt
20 Tetraglycyl NDGA, G_4N . To a dichloromethane (250 ml) solution containing NDGA (12.8 g, 42.3 mmol, 1.0 equiv) and N,N'-dimethylglycine (26.2 g, 254 mmol, 6.0 equiv) were added DCC (52.4 g, 254 mmol, 6.0 equiv) and DMAP (2.32 g, 18.9 mmol, 1.0 equiv). The reaction mixture was stirred for 24 h under nitrogen at room temperature. After the reaction mixture was filtered,
25 the solution was concentrated under reduced pressure. Acetone (250 ml) was then added into the reaction flask and the solution was bubbled with excess HCl(g). The water-soluble precipitate was dissolved in H₂O and re-precipitated twice at room temperature from acetone to give (1) (29, 2 g, 36.8 mmol) as a white solid in 87% yield. Proton NMR spectra were obtained on a
30 Varian Unity-400 (400 MHz) spectrometer by use of D₂O solvent and TSP as Internal standard. Carbon-13 NMR spectra were obtained on a Varian Unity-

WO 02/089795

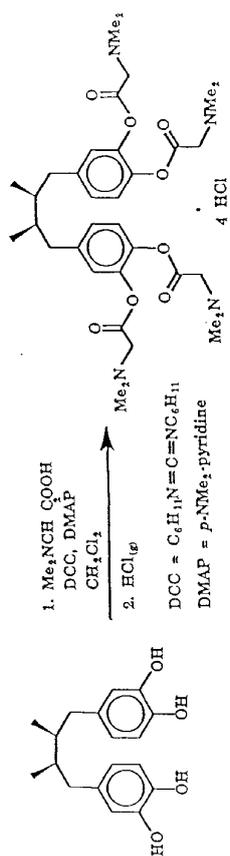
PCT/US02/14374

400 (400 MHz) spectrometer by use of D₂O as solvent. Carbon-13 chemical shifts are referenced to the TSP singlet (80.0 ppm).

The synthesis is depicted in Scheme 1.

WO 02/089795

PCT/US02/14374



WO 02/089795

PCT/US02/14374

General Procedure. All reactions were carried out in oven-dried glassware (120°C) under an atmosphere of nitrogen, unless as indicated otherwise. Acetone, dichloromethane, 1,4-dioxane, ethyl acetate, hexanes, and tetrahydrofuran were purchased from Mallinckrodt Chemical Co. Acetone was dried with 4A molecular sieves and distilled. Dichloromethane, ethyl acetate, and hexanes were dried and distilled from CaH₂. 1,4-Dioxane and tetrahydrofuran were dried by distillation from sodium and benzophenone under an atmosphere of nitrogen. Nordihydroguaiaretic acid was purchased from Fluka Chemical Co. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), morpholine, triethylamine, and potassium carbonate were purchased from Merck Inc. 1-Bromo-3-chloropropane, N,N-dimethylglycine, and methylphosphorodichloridate were purchased from Aldrich Chemical Co.

Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed on precoated plates (silica gel 60 F-254), purchased from Merck Inc. Gas chromatographic analyses were performed on a Hewlett-Packard 5890 Series II instrument equipped with a 25-m cross-linked methyl silicone gum capillary column (0.32 mm i.d.). Nitrogen gas was used as a carrier gas and the flow rate was kept constant at 14.0 ml/min. The retention time (t_R) was measured under the following conditions: injector temperature 260°C, isothermal column temperature 280°C. Gas chromatography and low resolution mass spectral analyses were performed on a Hewlett-Packard 5890 Series II instrument equipped with a Hewlett-Packard 5971A Mass Selective Detector and a capillary HP-1 column. Separations by medium-pressure liquid chromatography (MPLC) were performed at a flow rate of 120 ml/h by use of a Jasco Model 880-PU intelligent HPLC pump. The MPLC packing material, Reversed Phase Silica Gel C18 (particle size 0.035-0.070 mm), was purchased from Knauer Co. Purification by gravity column chromatography was carried out by use of Merck Reagents Silica Gel 60 (particle size 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM).

Infrared (IR) spectra were measured on a Bomem Michelson Series

WO 02/089795

PCT/US02/14374

FT-IR spectrometer. The wave numbers reported are referenced to the polystyrene 1601 cm^{-1} absorption. Absorption intensities are recorded by the following abbreviations: s, strong; m, medium; w, weak. Proton NMR spectra were obtained on a Varian Unity-400 (400 MHz) spectrometer by use of D_2O as solvent and 3-(trimethylsilyl)propionic acid, sodium salt as internal standard. Carbon-13 NMR spectra were obtained on a Varian Unity-400 (100 MHz) spectrometer by use of D_2O as solvent. Carbon-13 chemical shifts are referenced to the center of the 3-(trimethylsilyl)propionic acid, sodium salt singlet (6 0.0 ppm). Multiplicities are recorded by the following abbreviations: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; J, coupling constant (hertz). High-resolution mass spectra were obtained by means of a JEOL IMS-HX110 mass spectrometer.

meso-1,4Bis[3,4(dimethyleminoacetoxy)phe 3S-dimethylbutane Hydrochloride Salt (2). To a solution of NDGA (1, 12.81 g, 42.37 mmol, 1.0 equiv) and N,N-dimethylglycine (26.21 g, 254.2 mmol, 6.0 equiv) in dichloromethane (250 ml) was added DCC (52.45 g, 254.2 mmol, 6.0 equiv) and DMAP (5.176 g, 42.37 mmol, 1.0 equiv). The reaction mixture was stirred for 24 h under nitrogen at room temperature. After dicyclohexylurea in the reaction mixture was filtered off, the resultant solution was concentrated under reduced pressure. Acetone (250 ml) was then added into the residue and the resultant solution was bubbled with excess HCl (g). The precipitate was dissolved in water and re-precipitated twice by use of acetone at room temperature to give 2 (28.97 g, 36.86 mmol) as a white solid in 87% yield: ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ 0.78 (d, J = 6.0 Hz, 6 H, 2 x CH_3), 1.73 (m, 2 H, 2 x CH), 2.38 (dd, J=13.2, 9.6 Hz, 2 H, 2 x ArCH), 2.78 (dd, J = 13.2, 4.4 Hz, 2 H, 2 x ArCH), 3.03 (s, 24 H, 8 x CH_3N), 4.53 (s, 8 H, 4 x CH_2N), 7.22 (m, 4 H, 4 x ArH), 7.29 (d, J= 8.4 Hz, 2 H, 2 x ArH); ^{13}C NMR(D_2O , 100 MHz) δ 18.11, 40.82, 41.73, 46.75, 59.59, 125.79, 126.58, 131.63, 140.66, 142.47, 146.11, 167.84; IR (KBr) 3461 (br), 2963 (m), 1777 (s, C=O), 1620 (m), 1478 (m), 1377 (m), 1210(m), 1106 (m), 961 (w), 852 (w) cm^{-1} ; MS (FAB) of (2-4 HCl) m/z (relative intensity) 643 (M+, 30), 600 (20), 558 (43), 515 (20), 473 (42), 430 (13), 388 (26), 185 (18), 93 (38), 58 (100), 44 (22); HRMS (FAB) of

WO 02/089795

PCT/US02/14374

(2 - 4 HCl) calcd for $C_{34}H_{50}N_4O_8$ 642.3628, found 642.3614; Anal. Calcd for $C_{34}H_{54}N_2O_8Cl_4$: C, 51.78; H, 6.90; N, 7.10; O, 16.23. Found: C, 51.70; H, 6.85; N, 7.05; O, 16.21.

It will be appreciated that by suitable substitution of other N,N-dimethyl-substituted amino acids, additional amino acid substituted compounds of the invention can be synthesized.

Example 1

Effect of M_4N and several other NDGA derivatives of SP1-regulated HPV E_6/E_7 promoter activity.

The effect of M_4N and several other NDGA derivatives of SP1-regulated HPV E_6/E_7 promoter activity was examined using luciferase as a reporter. The assay depends upon DNA transfection of the HPV16 LCR (P_{97} promoter) fused to the luciferase reporter gene into C33A cells by calcium phosphate methods. C33A is a cervical tumor cell line (ATCC accession no. HTB-31) that does not contain any integrated HPV DNA, but has transcription factors necessary for a robust expression of the HPV early gene promoter. One day following DNA transfection various drug concentrations dissolved with the help of dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to the cells. Thirty hours after drug treatment (so that the assay is complete within the standard forty-eight hours for transient transfection experiments), the cells were lysed and specific luciferase activity was determined (Luciferase Assay Systems, Promega, U.S. Pat. No. 5,283,179). As the M_4N drug concentration was increased the specific luciferase activity decreased.

The results (shown in Figure 2) demonstrate that M_4N dramatically reduces Sp1 regulated transcription initiation at the HPV E_6/E_7 promoter in luciferase assay.

Example 2

Inhibition of E_6/E_7 mRNA synthesis following M_4N treatment

Inhibition of E_6/E_7 mRNA synthesis following M_4N treatment was

WO 02/089795

PCT/US02/14374

measured by RT-PCR in cervical cell line C₃. Relative RT-PCR was performed with quantities of total cellular RNA standardized to the cell numbers counted. The RT-PCR product was analyzed on a 2% agarose gel. The results are shown in Fig. 3. The RT-PCR results indicated that the amplified cDNAs of the expected size for E7 (321 bp) and E6 (204 bp) were detected in the DMSO treated cells as early as cycle 22 of amplification. These same products were barely detectable in the drug treated RNA extracts following 30 cycles of amplification. No amplified products were detected for the no template PCR control or from total RNA extracts of the HPV16-negative C33a cell line.

Example 3

Inhibition of cervical C3 cell growth by M₄N treatment

HPV-16 transformed immortal mouse epithelial cells (C3 cells) were plated at a density of 10⁵ cells per vial. After 24 hours, ½ of the vials were given growth media containing 40 μM M₄N dissolved in 1% DMSO while the other half were given growth media containing only 1% DMSO. The results are shown in Figure 4A. Within 24 hrs a difference in cell morphology between drug treated and control C3 cells was observed. The growth and division of the drug treated cells was markedly reduced in comparison to the untreated control, while the fraction of viable cells compared to the total cell count remained constant for both drug treated and DMSO only control cells. This indicates that M₄N dramatically reduces cell division.

The effect on C3 growth following removal of M₄N from the medium was also examined. C3 cells were plated at a density of 10⁴ cells per vial. At time=0, 2/3 of the vials were given growth media supplemented with 40 μM M₄N in 1% DMSO. The remaining vials were given growth media containing only 1% DMSO. After 73 hours, ½ of the vials that had received M₄N in their growth media were washed and media containing only 1% DMSO was added. The other 2/3 of the cell vials were washed and replaced with the same media administered before. The results, shown in Figure 4B, indicate that the rate of cell growth was not notably increased in M₄N treated sample following the

WO 02/089795

PCT/US02/14374

change to drug-free media, indicating that M₄N continues to significantly reduce cell division even after its removal from the extracellular environment.

Example 4

- 5 Analysis of cellular gene expression in C3 cells before and after 72 hrs of drug treatment.

Gene expression with 9600 gene arrays was studied (Fig. 5). Five micrograms each of poly A⁺ RNA from 72 hrs. M₄N (40 μm) treated (C₃ M₄N) and non-treated (C₃ DMSO) was used in a pair of human 9600 gene array hybridization study according to the procedure described in Genomics 51, 10 313-324 1998. The hybridization image was captured by a color video camera with a Nikon 55 mm AF micro Nikko lens and digitized by a Macintosh LC630 computer. Such detection via enzyme substrate reaction of color-forming enzymes in either single or dual-color mode is reproducible and 15 extremely sensitive (can detect <5 copies of transcript per cell with RNAs from 10⁷ cells).

The computer print outs showing differentially expressed genes (C₃ M₄N/C₃ DMSO >10 and C₃ DMSO/C₃ M₄N >10) were listed for examination. Image files in TIFF format and data files in MS excel format are kept on ZIP 20 diskette. Gene names and clone ID numbers are available for obtaining Image clones for future northern blot confirmation.

Among a group of genes that are either up-regulated or down-regulated 72 hrs after M₄N treatment, the following are those specifically related to cell division and apoptosis. Several other cell cycle 25 related genes are also greatly upregulated in response to M₄N. In addition to cyclin-dependent kinase CDC2 (Example 11), for example:

| | |
|---------------------------------------|----------|
| | Increase |
| Cyclin-dependent kinase inhibitor | (100X) |
| Apoptosis (APO-1) antigen | (100X) |
| 30 Death Domain Three DR ₃ | (100X) |

WO 02/089795

PCT/US02/14374

Ras-related protein RAP-1 (60X)

Human Map Kinase (40X)

The following cell cycle related genes are greatly downregulated in response to M₄N:

| | Treated | Untreated |
|--|---------|-----------|
| 5 Cyclin-dependent kinase 7 | (5%) | 100% |
| Human cytokine receptor | (2%) | 100% |
| Proliferating cell nuclear antigen, PCNA | (1%) | 100% |
| Human TNF-related Apoptosis AP0 ₂ | (3%) | 100% |
| 10 Cysteine protease | (7%) | 100% |

At earlier time points, such as after one hour drug treatment, E₆/E₇ level was found to be similar with those in control cells while after 4.5 hrs, E₆/E₇ were no longer detectable by RT-PCR (10). Gene expressions with 15 9600 gene arrays can be repeated with RNA isolated from these short-time treated cells (1 hour and 5 hours) in order to further pin down the initial cellular effects of the drug.

Example 5

20 Targeting C3 tumor growth in mice by local injection of M₄N
 Thirty six C57bl-16 NCR mice were injected with 5×10^5 C3 cells between the shoulders on the backs of the mice. Twenty four of the mice developed tumors within 20 days. Daily injection (50 μ l-100 μ l of M₄N or M₄N/G₄N) (200 mg/ml M₄N in DMSO, 200mg/ml G₄N in PBS) showed 25 profound effect in tumor growth in animals, as shown in Tables 1 and 2, Fig. 6 and 7.

WO 02/089795

PCT/US02/14374

Table 1. M₄N and G₄N Effect on Growth of Single Tumors Developed in Mice

| Mouse # | Treatment Period Days 1-16 | Lesion Size (mm) | | | Wt. Of Excised Lesion (g) | | Body wt. (g) | | |
|---------|-------------------------------|------------------|----------|-----------|---------------------------|--------|--------------|--------|--------|
| | | Day 1 | Day 7 | Day 21 | Day 16 | Day 24 | Day 1 | Day 16 | Day 24 |
| 1 | DMSO* | 3x8x3.3 | — | 5x7x4 | — | 0.3 | 18.8 | — | 20.2 |
| 2 | DMSO | 4.4x6x3.5 | 10x12x8 | — | 1.56 | — | 19.6 | 20.5 | — |
| 3 | DMSO | 0.8x0.8x1 | — | 10.5x11x9 | — | 1.14 | 18.2 | — | 16.1 |
| 4 | DMSO | 2.8x3.8x2.5 | — | 18x11x9 | — | 2.9 | 17.6 | — | 20.2 |
| 6 | Days 1-16 M ₄ N | — | 9x8x5 | — | 0.2 | — | 19 | 19.2 | — |
| 7 | M ₄ N | — | 6x7x7 | — | — | 0.1 | 18.2 | — | 20.4 |
| 11 | M ₄ N | 1x1.3x1 | 9.5x10x9 | — | — | 0 | 19.5 | — | 20.2 |
| 14 | M ₄ N | 3.8x3.8x3.5 | 8x9x6 | — | 0.4 | — | 17 | 17.6 | — |
| 15 | M ₄ N | — | 5x4x4 | — | 0.1 | — | 18.9 | 20.0 | — |
| 16 | M ₄ N | 2.8x2.8x2.8 | 9x6x4 | — | 0 | — | 17.2 | 17.6 | — |
| 17 | M ₄ N | 2.3x2.3x2.3 | 6x6x4 | — | 0.2** | — | 17.3 | — | — |

WO 02/089795

PCT/US02/14374

| | Days 1-10 | Days 9-17 | | | | | | | | |
|----|------------------|------------------|-------------|--------|---|------|--------|------|------|------|
| 18 | M ₄ N | G ₄ N | 3x2.8x3 | 8x7x5 | — | — | 1.0*** | 18.8 | — | 21.1 |
| 19 | M ₄ N | G ₄ N | — | 5x5x5 | — | 0.2 | — | 18.2 | 19.9 | — |
| 21 | M ₄ N | G ₄ N | 1.8x1.8x1.8 | 9x10x5 | — | 0.2 | — | 17.3 | 19.2 | — |
| 22 | M ₄ N | G ₄ N | — | 7x7x5 | — | — | 0 | 17.9 | — | 19.5 |
| 27 | M ₄ N | G ₄ N | 2.5x5x2.5 | 9x6x6 | — | — | 1.8*** | 20 | — | 20.7 |
| 28 | M ₄ N | G ₄ N | 2.8x2.3x2.8 | 5x5x4 | — | 0.17 | — | 18.1 | 19.8 | — |
| 29 | M ₄ N | G ₄ N | 2.8x2.5x2.8 | 5x6x4 | — | — | 0.2 | 18.8 | — | 19.6 |

*DMSO = Vehicle for Drug

** Taken on Day 15

*** Lesion contained mostly necrotic cells as also found in lesions from mouse 6, 7, 11, 14, 15, 17, 19, 21, 28, 19 (Fig. 6,7). There were no lesions left in mouse #11 and #22 following drug treatments. Tumors found in control mouse #1, 2, 3, 4 contained growing cells (Fig. 2).

Experimental Procedures:

36 C57bl-16NCR mice were injected with 5×10^5 C3 cells/mouse.
 30 Injections were 100 μ L made subcutaneously between the shoulders on the backs of the mice. Cells were suspended in low-salt HBSS and suspension uniformity was maintained by gentle vortexing.

24 mice developed tumors. Their lesion sizes were measured by dial caliper. These mice were shaved, weight and treatment begun (Day 1). Four mice were sequestered as controls. Control mice received 50 μ l DMSO injected intratumorally daily. Experimental mice (10) received 50 μ l M₄N dissolved in DMSO(200mg/mL). An additional 10 mice received M₄N treatments for 8 days followed by G₄N treatments (50 μ l, 200mg/ml in PBS) daily for 8 days. Injections were made to several regions of tumor. Mice

WO 02/089795

PCT/US02/14374

anesthetized with ether or metaphane prior to injection.

Table 2. M₄N and G₄N Effect on Growth of Treated Lesions in Mice Carrying Multiple Tumors

| Mouse # | Treatment Period | | Lesion Size (mm) | | Wt. Of Excised Lesion (g) | | Body wt. (g) | |
|---------|------------------|------------------|------------------|----------|---------------------------|---------------|--------------|--------|
| | Days 1-16 | | Day 1 | Day 7 | Treated* | Not Treated** | Day 1 | Day 24 |
| 9 | M ₄ N | | 1.3x5x0.75 | 7x9x8 | 0.25 | 0.6 | 20.2 | 17.9 |
| 10 | M ₄ N | | 2.3x2.5x2.3 | 9.5x10x9 | 0.1 | 2.9 | 17.5 | 22.1 |
| 12 | M ₄ N | | 2.5x2.5x2.5 | 8x9x6 | 0.11 | 1.82 | 17.8 | 20.0 |
| | Days 1-9 | Days 10-18 | | | | | | |
| 20 | M ₄ N | G ₄ N | 1.8x1.8x1.8 | 9x10x5 | 0.1 | 0.2 | 17 | 20.2 |
| 24 | M ₄ N | G ₄ N | — | 7x9x6 | 0 | 1.7 | 17.2 | 20.8 |
| 26 | M ₄ N | G ₄ N | 5x3.3x2.5 | 7x7x7 | 0.2 | 1.9 | 19.3 | 20.6 |

*Drug in DMSO was injected directly to the tumor regions

20 ** From adjacent tumors deprived of drug

Table 3. Toxicity Studies of G₄N in Mice

| | Group | # of Mice | Route | Treatment per day | Days of Injection | Mortality |
|---|------------|-----------|--------------|-------------------|-------------------|-----------|
| 1 | 187.5mg/kg | 3 | Subcutaneous | 2X | 6 | 0/3 |
| 2 | 375mg/kg | 3 | Subcutaneous | 1X | 6 | 0/3 |
| 3 | 750mg/kg | 4 | Subcutaneous | 1X | 6 | 1/4 |
| 4 | 375mg/kg | 2 | IV | 2X | 6 | 0/2 |

C57BL-16NCR female mice from NCI were used in this experiment.

35 Tetraglycinal NDGA (G₄N) was freshly made everyday in PBS in concentrations of 75mg/ml. Injections of 0.05 ml for group 1, 0.1 ml for groups

WO 02/089795

PCT/US02/14374

2 and 4, and 0.2 ml for group 3 per treatment were made for a period of 6 days. Experiments lasted seven days. Body weights were determined before and after six days of injection. No significant weight changes were observed during the experimental period.

5

All treated mice, controls (mouse numbers 1-4) and experimental mice (mouse numbers 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17 M₄N numbers 18-22, 24, 26-29 M₄N/G₄N) exhibited swelling. Measurements of lesion sizes were made by dial caliper. Some mice experienced mild bleeding due to injection.

10 The treatment regimen and results were as follows:

Day 10: Mice weighed again. All mice exhibited growth up to two grams.

Day 12: No treatments made.

Day 13: All mice have raised skin but to very different degrees. The skin of one M₄N treated mouse (#7) has split open through which the "dried-out tumor" fell out.

15

Day 14: Injection volume raised to 100 μ l.

Day 15: One M₄N treated mouse (#17) died due to overdose of anesthesia/handling. The skin at the lesion site of #17 cracked with the "dried-out tumor" showing. It was dissected, and lesion excised and weighed. Day

20

16: Four more M₄N treated mice (#6, 14, 15, 16), three M₄N/G₄N treated mice (#19,21,28) and one control mouse (#2) were euthanized, dissected and weighed. Remaining control mice (#1, 3, 4) were examined non-invasively and were carrying tumors.

Day 21: Tumor sizes from control mice were measured by dial caliper.

25

Observation: The skin at the lesion sites of mouse #10 and #12 (M₄N treated regions) cracked with the "dried-out tumor" showing.

Day 24: Mouse #7 skin recovered completely. The experiment was terminated on this date. All remaining mice, M₄N treated (#7, 9, 10, 11, 12) and M₄N/G₄N treated (#18, 20, 24, 26, 29) were euthanized, dissected, examined and

30

weighed.
The effects of M₄N and M₄N/G₄N on C3 tumor growth in mice are summarized in Tables 1 and 2 and Figures 5 and 6. Table 1 shows the drug

WO 02/089795

PCT/US02/14374

effect on C3 cell growth in mice carrying single tumors. The average weight of four excised tumors of the control group was 1.48 g while weights of lesions from M_4N treated and M_4N/G_4N treated were 0.142 and 0.51 g respectively. Drug treated lesions consisted mainly of dried out necrotic cells (Fig. 6). Tumors from the control group appeared homogenous and contained actively growing cells. Table 2 shows the drug effect on C3 tumor growth in mice carrying multiple tumors. In this study, drug was injected into one of the tumors. The average weight of untreated tumors was 1.77 g while that of M_4N treated lesions was 0.15 g. Similar results were obtained following M_4N/G_4N injection—the average weight of untreated tumors was 1.27 g, while that of the drug treated lesions was only 0.103 g. The body weight changes of all mice during the entire experimental period appeared insignificant (Table 1 and 2).

15 Example 6

Drug treated (M_4N) and DMSO vehicle-treated or untreated tumors (CON) from two groups of mice were prepared for histopathology examination. The excised tumors were immediately fixed and then stored in 4% formaldehyde in phosphate buffered saline. The fixed tissue was then dehydrated through a series of graded alcohols and xylene and embedded in paraffin. The paraffin tissue blocks were thin sectioned and stained for microscopy with hematoxylin and eosin. Histopathology studies showed that the control tumors were unaffected by DMSO treatment and continued to grow. They show the high nuclear/cytoplasmic ratio, pleomorphic nuclear changes, high mitotic figures, spindle like sarcoma shape, and infiltration into the surrounding tissue characteristic of cancer cells. In contrast, those tumors receiving M_4N treatment discontinued growth shortly after treatment began. They demonstrate significant necrosis and are no longer viable. There is a small amount of drug precipitate visible at higher magnification, and focal areas show chronic inflammation and fibrosis. This healing effect leads to the shedding of these deceased tumor cells from the area. The same results are seen with M_4N/G_4N treatment as with the M_4N treatment alone. However, since G_4N is water-soluble, it

WO 02/089795

PCT/US02/14374

can spread to a larger area of the tumor than M₄N. It is expected that G₂N when used with M₄N synergistically may be more effective in treating tumors of large sizes (i.e. greater than 2 cm³).

5 Example 7

Effect of M₄N on HSV-1 Skin Infection in Guinea pig

The drug M₄N was also tested in inhibition of HSV-1 replication in skin infections in guinea pigs. Guinea pig skin was pinched with needles and HSV-1 suppression was applied topically to infect each pricked area. M₄N was then applied to the pricked infected area following infection daily for 6 days.

Six areas of bared back skin of a guinea pig were punched sterily with a 5-DIN needle. Two areas were infected with HSV-1 (HSV-C, culture supernatant, or isolated HSV in saline, HSV-SC). The other four areas were infected with HSV-SC. Fifteen minutes after infection, 30 μ l of test compounds (ABDS₁, ABDS₂, ACV and M₄N (4N) in 60 mg/ml of DMSO were applied to each punched infected region of an area, five times per day for six days. ABDS₁ and ABDS₂ were included as negative controls. The photograph in Figure 8 was taken at day 6 and shows the extent of HSV-1 replication in the absence of drugs (HSV-C, HSV-SC), in the presence of ineffective drugs (HSV-ABDS₁, HSV-ABDS₂) and in the presence of effective drugs (HSV-M₄N and HSV-ACV). It can be seen that six large confluent blisters were developed in areas treated by HSV-C, HSV-SC, HSV-ABDS₁, HSV-ABDS₂, while no blisters were observed in infected areas following M₄N (4N) and ACV treatments. Clearcut results that M₄N can block HSV replication were obtained in this model system as shown by the disappearance of the skin lesions and by no shedding of the virus 4 days after the drug treatment. Initial animal studies also showed M₄N to be non-toxic to mice at concentrations as high as 300mg/kg when given intraperitoneally, and as high as 375 mg/kg when given either subcutaneously or by IV (Table 3) (6).

WO 02/089795

PCT/US02/14374

Example 8

M₄N for Clinical Treatment using *in situ* Injection

Administration of M₄N directly into tumors as a drug delivery route provides several distinctive advantages. 1) M₄N is a hydrophobic compound and is exceedingly soluble in DMSO (200 mg/ml). Therefore only a small volume of the drug solution is needed for injection in order to achieve effective dosage of the drug. In the mouse study described in Example 5, above, daily injection of 50 μ l to 100 μ l for several days was sufficient to completely stop tumor growth in mice. There have been several previous studies on the use of large dosages (30 ml IV per treatment) of DMSO for treating diseases (21). The results were not conclusive (22). However, since tens of millions of people have been safely tested with large amounts of DMSO worldwide in the past, it appears that DMSO should be safe as a vehicle for drug delivery when only small volume of it will be used (23).

2) By injection *in situ*, a majority of the drug residue remains insoluble and concentrated in the tumor areas, and does not enter the circulatory system, thus whole body toxicity is avoided. In addition, since enough drug remains within the tumor to suppress its growth, continued injection of drug is unnecessary after relatively few treatments. In the mouse study of Example 5, tumor cells continued to die even after discontinuation of M₄N injections. Thus when drug is directly targeted, tumor size becomes the determining factor for the required amount of drug to be administered. The difference between whole body weights of a human vs. a mouse becomes irrelevant. In the mouse tumor studies, 20 mg/day for 10 days were more than sufficient to eliminate tumors. There should be no reason to use a higher dosage than this for treating a human tumor of comparable size (1-1.5 cm³). This should reduce the risk considerably in human trials.

Example 9

M₄N Treatment of Cells Blocks Cellular Proliferation

Our previous research on M₄N indicated that it could inhibit viral transcription by deactivation of Sp1-dependent promoters. Many mammalian

WO 02/089795

PCT/US02/14374

cell cycle genes also contain essential Sp1 promoters and M₄N may therefore block their transcription. This hypothesis was tested by examining the antiproliferative effect of M₄N on a number of different cell lines. Low concentrations (10 μ M) of the parent compound, NDGA, have previously been shown to induce apoptosis in mammalian cells (24). This effect, however, can be circumvented by blocking one of the catechol oxygens or the addition of a hydrophilic group to NDGA (25). Increasing amounts of the NDGA derivative M₄N were tested on cultures of the HPV-16/ras transformed C3 cell line (26) to determine the optimal concentration required to inhibit proliferation (Figure 9a). The cells respond well to M₄N, ceasing division after 72 hours over the range of concentration from 40 to 60 μ M. After three days at these concentrations the number of cells remained equal to the count at the initiation of treatment (day 0, Fig 9). A more modest reduction in cell growth was observed at lower concentrations of the drug and some cell death was seen at concentrations greater than 60 μ M.

The antiproliferative effect of M₄N on the C3 cell line is not solely due to the drug's ability to deactivate the Sp1-dependent HPV-16 E6/E7 oncogene promoter, as similar growth inhibition was observed in the HPV-16 transformed TC-1 cell line whose E₆/E₇ oncogenes are under control of a non-Sp1 dependent retroviral promoter(27) (Figure 9d). In addition, growth of the C33a cell line (Figure 9c), an HPV-negative human cervical cancer cell line, and the CEM-T4 line (Figure 9b), a human leukemia cell line (28), was also blocked by treatment with M₄N. In the four cell lines that were treated with the drug, nearly all (>95%) of the arrested cells were viable until the concentration of M₄N exceeded a "threshold" value (60 μ M for C3 cells, 40 μ M for TC-1 cells, etc.). Above these concentrations the percentage of viable cells decreases precipitously. Interestingly, arrested cells maintained >95% viability even after prolonged exposure to the drug. The C3 cells exhibited no increase in cell death after eight days of treatment with 40 μ M M₄N (Figure 9e).

WO 02/089795

PCT/US02/14374

Example 10

Cells Treated With M₄N Arrest in G2 Phase

Once it was established that cells treated with M₄N cease proliferation yet remain viable, analysis of cellular DNA content and fluorescence examination of cell structures were used to determine the point in the cell cycle where the cells arrest. Cells exposed to M₄N for 72 hours demonstrated increased G2/M DNA content relative to the controls (Figure 10a-d). The most extreme responses were seen from the C3 and CEMT4 cell lines, in which >90% of the cells show G2/M DNA content.

In order to distinguish between an arrest in G2 or a mitotic block, antibodies against α tubulin (green) and γ tubulin (red) were used to determine the status of the centrosomes in the C3 cell line following 72 hours M₄N treatment. As shown in Figure 11a, the centrosomes of M₄N treated cells are duplicated but still located next to each other in the nucleus of the cell. Since centrosomes separate during early prophase, it can be concluded that these cells have not begun mitosis. In contrast, the gamma tubulin staining of the control cells has the diffuse pattern characteristic of G1 or S phase (29). A lack of chromatin condensation in the M₄N treated cells was also observed with DAPI staining (Figure 12b), additional evidence that the cells have not moved forward out of G2 phase (30).

Example 11

Production of CDC2 is Inhibited by 40 μ M M₄N

Since progression of cells out of G2 is dependent on the production of the MPF, the status of its protein components was examined in C3 cells treated with 40 μ M M₄N. Asynchronous cells were grown for 24 or 72 hours in media containing either M₄N in 1% DMSO, or 1% DMSO alone. The cells were harvested, and equal amounts of total cellular protein were analyzed by western blotting. A marked reduction in the amount of CDC2 was observed after 72 hours treatment with M₄N (Figure 12a). However, levels of cyclin B, detected by stripping and reprobing the same membrane, were found to be unchanged. These results indicate that, under these conditions, the arrest is

WO 02/089795

PCT/US02/14374

not likely a response to p53 since it has been shown that overexpression of p53 leads to a decrease in cyclin B (31, 32). Consistent with the results of the western analysis, CDC2 kinase activity was eliminated by 72 hours of M₄N treatment (Figure 12a). These experiments support the view that the drug acts by inhibiting the production of the CDC2 protein, resulting in a loss of activity of the MPF.

Our previous studies demonstrating the ability of M₄N to block Sp1-dependent viral transcription suggest reduction of CDC2 mRNA levels as a possible mechanism for the decrease of CDC2 protein. This is consistent with the finding that the cyclin B protein, whose gene does not require Sp1 for its expression, is produced at normal levels while the CDC2 protein, whose gene has two essential Sp1 sites in its promoter, is substantially reduced in quantity. To test this hypothesis, northern blot analysis was performed on RNA harvested from C3 cells treated with 40 μM M₄N for 5 to 72 hours. As shown in Figure 12b, the amount of CDC2 mRNA is reduced after only 24 hours treatment with M₄N and nearly eliminated after 72 hours. Production of the non-Sp1 regulated housekeeping gene GAPDH was used as an RNA loading control, and its levels were not effected by 40 μM M₄N.

The use of the C3 cell line allows us an additional control for analysis of the mechanism of M₄N mediated cell cycle arrest since other Sp1-dependent gene promoters are also likely to be inhibited by M₄N treatment. This possibility was examined in C3 cells by analyzing the effect of M₄N on transcription from the Sp1 dependent HPV-16 E₆/E₇ promoter. rtPCR analysis of RNA isolated from C3 cells treated with 40 μM M₄N for 5 to 72 hours demonstrated a clear reduction in the levels of the E₇ transcript (Figure 12c). GAPDH was again used as an internal control in this experiment, and its levels were unaffected by drug treatment. These results provide additional evidence that M₄N reduces the transcripts of Sp1 regulated promoters.

30 Example 12

Inhibition of Sp1-Binding Activity by G₄N in a Gel Mobility-Shift Analysis.

Sp1 family proteins induce bends toward the major groove of DNA upon

WO 02/089795

PCT/US02/14374

binding (33). The zinc finger domain of the Sp1 protein is responsible for the binding of the GC Box sequence 5'-GGGGCGGGG-3'. From computational analysis, it was determined that G₄N, the aminoester derivative of NDGA, could form a stable complex with such a sequence in the major groove. To determine whether G₄N can serve as an Sp1 blocker as well as an Sp1 displacer, we performed Sp1/enhancer interaction studies in the presence or absence of G₄N by the gel mobility-shift analysis using only the DNB binding domain of Sp1 for testing. In the blocking experiment, different concentrations of G₄N were first incubated with ³²P-labelled DNA in the binding buffer for 30 min at 25°C. DNA binding domain of recombinant Sp1 protein (Sp1-167D) was next added and incubated for additional 30 min in the presence of a large excess of BSA protein. In the displacement study, the recombinant Sp1-167D was first allowed to bind DNA, G₄N was then added at the second step of the incubation. The G₄N and Sp1-167D concentrations and, the incubation and gel electrophoresis conditions were identical in both studies (experimental section). As shown in Figure 13, in either case, G₄N was found to be able keep DNA from interacting with Sp1-167D protein. When only the DNA binding domain of Sp1 alone was tested, G₄N appeared to be more efficient in displacement of the bound Sp1 than blocking Sp1 from binding to the enhancer, as shown by the gel mobility-shift analysis (Figure 13, A,B,D). We have also examined whether the bound G₄N can be replaced by Sp1-167D. In this study, the inhibition of Sp1-167D binding by G₄N was first established by the mobility-shift analysis (Fig 13C, lanes 2 and 5). When the G₄N bound template was challenged with additional Sp1-167D, we observed a dosage dependent increase of the band intensities of the Sp1-167D/DNA complex (Fig 6C, Lanes 6,7) indicating the displacement of G₄N by Sp1-167D from the template.

Example 13
30 Inhibition of Sp1 Regulated Tat-Transactivation of HIV Promoter Activity by G₄N.

As reported previously, methylated NDGA derivatives can block Sp1

WO 02/089795

PCT/US02/14374

binding to the enhancer sites of a variety of viral promoters including HIV, ICP4 of HSV, E₆/E₇ gene of HPV (8, 9, 10). We further tested the G₄N effect on the Tat-transactivation of HIV promoter activity in Cos cells by the SEAP assay as previously described. Basal level of the HIV LTR driven SEAP expression was previously found to be barely detectable in Cos cells. There were 60-fold or more increase in SEAP expression when Cos cells were cotransfected with the CMV promoter driven Tat gene (8). Such Tat-driven transactivation of the HIV LTR promoter activity was previously shown to be Sp1 regulated (7, 8). In the presence of G₄N, we observed inhibition of HIV transactivation in a dose-dependent fashion (Figure 14). An average value IC₅₀ value of 36 μ M for G₄N was comparable to that of 3-O-methyl NDGA, Ma1.4 (IC₅₀ 25 μ M) and somewhat higher than that of tetra-methyl NDGA, M₄N (IC₅₀ 11 μ M). The differences perhaps are due to the chemical nature of the test compounds affecting the drug uptake to the cells.

15

WO 02/089795

PCT/US02/14374

Example 14

Inhibition of SIV-1 and HIV-1 Production in Cell Cultures by G₄N.

Both HIV-1 and SIV are retroviruses that require integration into the host genome to complete their replication. Both rely on host transcription factors for their proviral transcriptions. Sp1 plays a central role for such expression in these two viruses sharing an almost identical mode of transcription regulation. In anticipation of using SIV infected rhesus monkeys as animal model for testing the antiviral effect of G₄N, we have studied and compared the G₄N effect in inhibition of SIV in 174 x CEM cells with that of HIV in H9 cells. Cellular toxicities of G₄N in these two cell lines were also examined. For SIV inhibition study, 10⁷ 174 x CEM cells were mixed with high titer stock of SIVmac 239 at 37°C for two hours and then washed twice with cold PBS buffer to remove the unabsorbed virus. Cell suspension was aliquoted into each well of three 96 well plates. Various concentrations of the G₄N solutions were made from freshly prepared stock and aliquoted separately and each to six wells in a column of one 96 well plate. Culture supernatants were collected every four days post infection. (P.I.) and fresh medium containing appropriate concentrations of the drug were added to the culture following supernatant collections. Viral production was assayed by a modified p27 core antigen capture ELISA as shown (Figure 15). There was no SIV production detected using G₄N in concentrations above 5 CIM. At G₄N concentrations below 2.5 CIM, SIV production was detected (Fig. 15) in culture supernatants from 4th and 8th days post infected cultures as compared to viral production in the absence of the drug. G₄N (250 μM or less) showed no toxic effect on uninfected 174 x CEM cells, as determined by the MTT assay (34).

A similar experiment was also carried out for the study of inhibition of HIV-1 by G₄N in H9 cells. The H9 cells were subcultured at 1 x 10⁵/ml and were infected with an AZT resistant strain of HIV-1(HIV-1RTMF). G₄N in different concentrations was added two hours after infection. Fresh medium change was made every four days. Cell growth in the presence of G₄N was monitored carefully during the nine-day experimental period. Viral production was

WO 02/089795

PCT/US02/14374

assayed by a p24 core antigen capture ELISA. As shown (Figure 16), G₄N concentration of 80 CIM completely inhibited HIV replication in H9 cells. An IC₅₀ of 12 μM CIM G₄N for the inhibition of HIV-1 RTMF was found. Again, there

- 5 was no detectable toxicity to uninfected H9 cells within the range of the assay (and below 250 μM).

Example 15

Effect of M₄N Treatment on Survivin Gene Expression in C3 Cells

10 Materials and methods

Cell Culture. C3 cells were grown as monolayers in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (GIBCO BRL) supplemented with 5% fetal bovine serum (GIBCO BRL) and maintained in a humid incubator at 37°C in a 5% CO₂ environment.

- 15 M₄N Treatment. C3 cells (5x10⁶) were seeded in 150-mm plates and allowed to attach to the plates. Twenty-four hours after seeding, cultures were washed twice with PBS and treated with M₄N dissolved in 1% DMSO mixed with the growth medium.

- Cell extracts and immunoblotting. Cells were lysed in lysis buffer containing 50 mM HEPES pH 7.2, 50 mM NaCl, 0.1% (v/v) Nonidet P-40, 10% glycerol, 1mM DTT, and 50 μl/ml protease inhibitor cocktail (Sigma). Protein concentration of the extract was determined by the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories), and then 50 μg of protein was separated by SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membrane (ECL). Membranes were incubated with primary antibodies against Survivin (Santa Cruz Biotechnology) and caspase-3 (Santa Cruz Biotechnology). Blots were then incubated with anti-rabbit biotin-conjugated secondary antibody and then with Avidin-APT™ streptavidin-alkaline phosphatase, and detected with CSPD® substrate (Tropix).

- 20 RT-PCR analysis. mRNA was isolated by the guanidinium thiocyanate and phenol method from the cultured cells as described in Molecular Cloning (40). A 343-base pair RT-PCR product was generated by using the survivin-sense

WO 02/089795

PCT/US02/14374

oligonucleotide primer 5'-GCATCGCCACCTTCAAGAACTGGCCC-3' and the survivin-antisense oligonucleotide primer 5'-CGGGTAGTCTTTGCAGTCTCTTCAAACCTC-3'. GAPDH sense and anti-sense primers 5'-GAATCTACTGGCGTCTTACC-3' and 5'-GTCATGAGCCCTTCCACGATGC-3' were used to generate a 238-base pair RT-PCR product as a control. mRNA aliquots were incubated in 20 μ l reaction buffer containing 1 U of rRNasin and DNase at 75°C for 5 minutes followed by reverse transcription reaction with MMLV (Promega). The c-DNA products obtained were amplified under the PCR conditions: 55°C for 55 seconds, 60°C for 55 seconds, and 72°C for 1 minute for 30 cycles. The PCR products were separated by electrophoresis on a 1.8% agarose gel containing ethidium bromide and photographed under UV. The bands were quantitated by Scion Image and the signal intensities of the survivin PCR reaction products were normalized to those of the GAPDH PCR products to generate a survivin gene down-regulation graph.

To determine whether the Sp1-regulated survivin gene expression in C3 cells is reduced by M_4N treatment, we treated the cells with 40 μ M M_4N for 24 hours and 72 hours. As shown in Figure 1, treatment of cells with M_4N resulted in a significant decrease in survivin gene expression in a time-dependent manner. Treatment with 40 μ M M_4N for 24 hours and 72 hours resulted in 65% and 80% reduction in survivin expression, respectively. Untreated cells did not show any reduction in survivin gene expression.

Survivin protein was also shown by immunoblotting to be downregulated by 72 hours of M_4N treatment. This downregulation was dosage-dependent (Figure 2).

25

Example 16

Induction of Apoptosis with M_4N treatment

Because our data showed that M_4N resulted in survivin mRNA and protein reduction, we investigated whether this reduction induces apoptosis since survivin has anti-apoptosis function. As shown by immunoblotting of caspase-3 (Figure 3), treatment of M_4N for 72 hours resulted in caspase-3 activation. This activation

30

WO 02/089795

PCT/US02/14374

would be expected to result in an increase in an increase in apoptosis in cells treated with M₄N.

WO 02/089795

PCT/US02/14374

- References cited herein are listed below for convenience and are hereby
5 incorporated by reference.
1. Nurse, P., Universal Control Mechanism Regulating Onset of M-Phase.
Nature, 344, 503-508 (1990).
 2. Fang, F. and J.W. Newport, Evidence That the G1-S and G2-M
Transitions Are Controlled by Different cdc2 Proteins in Higher
10 Eukaryotes. Cell, 66, 731-742(1991).
 3. Dalton, S., Cell Cycle Regulation of the Human cdc2 Gene. The EMBO
Journal, 11, 1797-1804.(1992.)
 4. Morgan, D.O., Principles of CDK Regulation. Nature, 374, 131-
134.(1995.)
 - 15 5. Murray, A.VV., Creative Blocks: Cell-cycle Checkpoints and Feedback
Controls. Nature, 359, 599-604 (1992).
 6. Kao, G.D., M. W.G., and R.J. Muschel, p34(Cdc2) Kinase Activity Is
Excluded From the Nucleus During the Radiation-induced G(2) Arrest
in HeLa Cells. J. Biol. Chem., 274, 34779-34784 (1999).
 - 20 7. Hwu, J. R., Tseng, W. N., Gnabre, J., Giza, P. and Huang, R. C. C. Antiviral
Activities of Methylated Nordihydroguaiaretic Acids (I) Synthesis, Structure
Identification and Inhibition of Tat Regulated HIV Transactivation. J. Med.
Chem. 41:2994-3000(1998).
 8. Gnabre, J. N., Brady, J. N., Clanton, D. J., Ito, Y., Dittmer, J., Bates, R.
25 B. and Huang, R. C. Inhibition of Human Immunodeficiency
Virus Type 1 Transcription and Replication by DNA
Sequence-Selected Plant Lignans. Proc. Natl. Acad Sci U.S.A. 92,
11239 (1995).
 9. Chen, H., et al., Antiviral Activities of Methylated Nordihydroguaiaretic
30 Acids. 2. Targeting Herpes Simplex Virus Replication by the Mutation
Insensitive Transcription Inhibitor Tetra-O-Methyl-NDGA. Journal of
Medicinal Chemistry, 41, 3001-3007 (1998).

WO 02/089795

PCT/US02/14374

10. Craigo, J., et al., Inhibition of Human Papillomavirus Type 16 Gene Expression by Nordihydroguaiaretic Acid Plant Lignan Derivatives. *Antiviral Research*, 47, 19-28 (2000).
- 5 11. Baba, M. Mini Review. Cellular Factors as Alternative Targets for inhibition of HIV- 1. *Antiviral Res.* 33, 144 i -1452 (1997).
12. Gnabre, J. N., Ito, Y., Ma. Y. and Huang, R. C. (1996) Isolation of Anti-HIV-1 Lignans from *Larrea Tridentata* by Counter-Current Chromatography. *J. Chromatogr. A* 719, 353.
- 10 13. Gnabre, J. N., Huang, R. C., Bates, R. B., Burns, J. J., Calder, S., Malcomson, M. E. and McClure, K. J. (1995) Characterization of Anti-HIV Lignans from *Larrea Tridentata* *Tetrahedron* 51, 12203.
14. Honess, R. W., and Roizman, B. (1988) Regulation of Herpes Virus Macromolecular Synthesis. 1. Cascade Regulation of Synthesis of Three Groups of Viral Proteins. *J. Virol.* 1974. 14, 8.
- 15 15. Courey, A. J., and Tjian, R. (1988) Analysis of Spl in vivo Reveals Multiple Transcription Domains. Including a Novel Glutamine-rich Activation Motif. *Cell* 55, 887.
16. Some of the Spl-regulated cellular genes: Sartorelli, V.; Webster, K. A.; Kedes, L. Muscle-specific expresison of the cardiac alpha-actin gene requires myoD1, CarG-hox binding factor and Spl. *Gene Dev.* 20 1990, 4, 1811. Dailey, I., Roberts, S. B.; Heintz, N. Purification of the histone H4 gene-specific transcription factors, H4TF-1 and H4TF-2. *Gene Dev.* 1988, 2, 1700. Means, A. L.; Farnham, P. J. Transcription initiation form the dihydrogolate reductase promoter is positioned by HIP-1 binding at the initiation site. *Mel. Cell Biol.* 1990, 10, 653.
- 25 26. Abravaya, K.; Phillips, B.; Morimoto, R. I. Heat shock-induced interaction so heat shock transcription factor and human hsp70 promoter examined by in vive footprinting. *Mel. Cell Biol.* 1991, 11, 586. Leask, A.; Rosenberg, M.; Vassar, R.; Fuchs, E. Regulation fo a human epidermal keratin gene: Sequences and nuclear factors involve 30 din keratinocyte-specific transcription. *Gene Dev.* 1990, 4, 1985.
27. Desjardins, E.; Hay, N. Repeated CT elements bound by zinc finger

WO 02/089795

PCT/US02/14374

- proteins control the absolute and relative activities of the two principal human cmyc promoter. *Mol. Cell Biol.* 1993, 13, 5710. Sanchez, H. B.; Yieh, i., Osborne, T. F. Cooperation by sterol regulatory element-binding proteins and Sp1 in sterol regulation of low-density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 1161. Lemaigre, F. P.; Lafontaine, D. A.; Courtois, S. J.; Durviaux, S. M.; Rousseau, G. G. Sp1 can displace GHF-1 from its distal binding site and stimulate transcription from growth hormone gene promoter. *Mol. Cell Biol.* 1990, 10, 1811.
- 10 17. Phelps, W. C., Yee, C. L., Munger, K. and Howley, P. M. (1988) The Human Papilloma Virus Type 16 E7 Gene Encodes Transactivation and Transformation Functions Similar to Those of Adenovirus E/A. *Cell* 53, 539-547.
- 15 18. Greenstone, H.L., Nieland, J.D., DeVisser, K.E., DeBruijn, M.L., Kimbauer, R., Roden, R.B., Lowy, D.R., Kast, W.M. and Schiller, J.T. (1998) Chimeric Papillomavirus Virus-Like particles Elicit Antitumor Immunity Against the E7 Oncoprotein in an HPV16 Tumor Model. *PNAS* 95, 1800-1805.
- 20 19. Feltkamp, M.C., Vreugdenhil, G.R., Vierboom, M.P., Ras, E., Van der Burg, S.H., Schegget, J. Ter, Melief, C.J.M. and Kast, W.M. (1995) CTL Raised Against a Subdominant Epitope Offered as a Synthetic Peptide Eradicate Human Papillomavirus Type 16-induced Tumors. *European Journal of Immunology* 25, 2638-2642.
- 25 20. Feltkamp, M.C., Smits, H.L., Vierboom, M.P., Minaar, R.P., B.M. Drijfhout, J.W., Schegget, J., Melief, C. and Kast, W.M. (1993) Vaccination with Cytotoxic T Lymphocyte Epitope-Containing Peptide Protects Against a Tumor Induced by Human Papillomavirus Type 16-Transformed Cells. *Eur. J. Immunol.* 23, 2242-2249.
- 30 21. Jacob, S. W. and Herschler (1986) *Pharmacology of DMSO*. Academic Press, Inc.
22. Jack, C., and Torre, de la (1983) *Biological Actions and Medical*

WO 02/089795

PCT/US02/14374

- Applications of Dimethyl Sulfoxide. New York Academy of Sciences, New York, N.Y.
23. Spruance, S. L., McKeough, M. B. and Cardinal, J. R. (1983) Dimethyl Sulfoxide as a vehicle for topical antiviral chemotherapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 411,28-33.
 24. Biswal, S.S., et al., Glutathione Oxidation and Mitochondrial Depolarization as Mechanisms of Nordihydroguaiaretic Acid-induced Apoptosis in Lipoygenase-deficient F15.12 Cells. *Toxicol. Sci.*, 53, 77-83.(2000.)
 25. Schegg, K. M. and W.J. Welch, The Effect of Nordihydroguaiaretic Acid and Related Lignans on Formyltetrahydrofolate Synthetase and Carbodylesterase. *Biochim. Biophys. Acta*, 788, 167-180 (1984).
 29. Feltkamp, M.C.W., et al., Vaccination With Cytotoxic T Lymphocyte Epitope-containing Peptide Protects Against a Tumor Induced by Human Papillomavirus Type 16-Transformed Cells. *Eur. J. Immunol.*, 23, 2242-2249 (1993).
 27. Lin, K., et al., Treatment of Established Tumors With a Novel Vaccine That Enhances Major Histocompatibility Class II Presentation of Tumor Antigen. *Cancer Res*, 56, 21-26.(1996.)
 28. Foley, G.E., et al., Continuous Culture of Human Lymphoblasts From Peripheral Blood of a Child With Acute Leukemia. *Cancer*, 18, 522-529(1965).
 29. Shiebel, E., Gamma-Tubulin Complexes: Binding to the Centrosome, Regulation and Microtubule Nucleation. *Current Opinion Cellular Biology*, 12, 113-118(2000).
 30. Marsden, M.P.F., Laemmli, U.K., Metaphase Chromosome Structure: Evidence for a Radial Loop Model. *Cell*, 17, 849-858 (1979).
 31. Taylor, W.R., et al., Mechanisms of G2 Arrest in Response to Overexpression of p53. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 3607-3622 (1999).
 32. Innocente, S.A., et al., p53 Regulates a G2 Checkpoint Through Cyclin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 96, 2147-2152(1999).
 33. Sjøttem, E.; Anderson, C.; Johansen, T. Structural and Functional

WO 02/089795

PCT/US02/14374

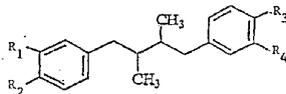
- Analyses of DNA Bending Induced by Sp1 Family Transcription Factors. J. Mol. Bio., 267, 490-504 (1997).
37.
34. Weislow, O.S.; Kiser, R.; Fine, D.L.; Bader, J.; Shoemaker, R. H.;
5 Boyd, M.R. New Soluble-Formazan Assay for HIV-1 Cytopathic
Effects: Application to High-Flux Screening of Synthetic and Natural
Products for AIDS-Antiviral Activity. J. Natl. Cancer Inst., 81(8),
557-586 (1989).
35. Li, F. and Altieri, D.C., Transcriptional analysis of human survivin gene
10 expression. Biochem. J. 344, 305-311(1999).
36. Li, F. and Altieri, D.C., The Cancer Apoptosis *Survivin* gene:
Characterization of Locus and Transcriptional Requirements of Basal and
Cell Cycle-dependent Expression. Cancer Res. 59,3143-3151 (1999).
37. O'Connor, D.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 97,13103-13107 (2000).
- 15 38. Grossman, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 98,635-640(2001).
39. Studzinski, G.P. (ed.), Apoptosis, A Practical Approach (1999), page 10.
40. Sambrook and Russell, Molecular Cloning, 3rd ed.(2001).

WO 02/089795

PCT/US02/14374

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of inhibiting survivin production in a eukaryotic cell cycle comprising administering an effective amount of a compound of formula

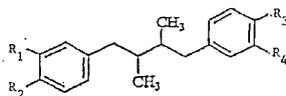


5

wherein R₁, R₂, R₃ and R₄ independently represent -OH, OCH₃, -O(C=O)CH₃, or an amino acid residue, but are not each -OH simultaneously.

2. The method of claim 1 wherein said cell is an animal cell.
3. The method of claim 3 wherein said cell is a mammalian cell.
4. The method of claim 4 wherein said cell is a human cell.
5. A method of stimulating apoptosis in a cell expressing CDC-2 and survivin comprising administering an effective amount of a compound of formula

10



15

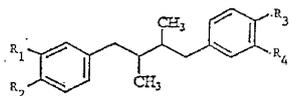
wherein R₁, R₂, R₃ and R₄ independently represent -OH, OCH₃, -O(C=O)CH₃, or an amino acid residue, but are not each -OH simultaneously.

6. The method of claim 5 wherein said cell is an animal cell.
7. The method of claim 6 wherein said cell is a mammalian cell.
8. The method of claim 7 wherein said cell is a human cell.
9. A method for treating a tumor, said method comprising application of an effective amount of a compound of formula

20

WO 02/089795

PCT/US02/14374

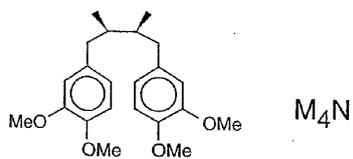


wherein R₁, R₂, R₃ and R₄ independently represent -OH, OCH₃-, O(C=O)CH₃, or an amino acid residue, but are not each -OH simultaneously.

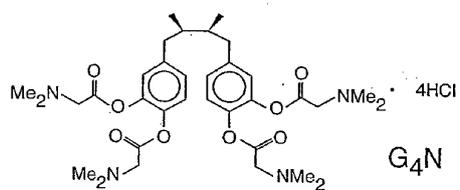
10. The method of claim 9 wherein said tumor is present in a mammal.
- 5 11. The method of claim 10 wherein said tumor is malignant.
12. The method of claim 10 wherein said tumor is benign.
13. The method of claim 12 wherein said tumor is selected from the group consisting of papilloma, teratoma and adenoma.
14. The method of claim 10 wherein said tumor is a solid tumor.
- 10 15. The method of claim 10 wherein said mammal is a human.
16. The method of claim 10 wherein said tumor is derived from transformed cells.
17. The method of claim 16 wherein said cells are C3 cells.
18. The method of claim 9 wherein said compound is administered along
- 15 with at least one pharmaceutically acceptable excipient or carrier.
19. The method of claim 18 wherein said excipient or carrier is dimethylsulfoxide.
20. The method of claim 9 wherein said derivative is tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid or tetraglycinylnordihydroguaiaretic acid.
- 20 21. The method of claim 1 wherein tetraglycinylnordihydroguaiaretic acid is administered along with at least one pharmaceutically acceptable excipient or carrier.

WO 02/089795

PCT/US02/14374



meso-1,4-Bis(3,4-dimethoxyphenyl)-(2*R*,3*S*)-dimethylbutane



meso-1,4 - Bis [3,4 - (dimethylaminoacetoxy)phenyl]- (2*R*,3*S*)-
dimethylbutane Hydrochloride Salt

FIG. 1

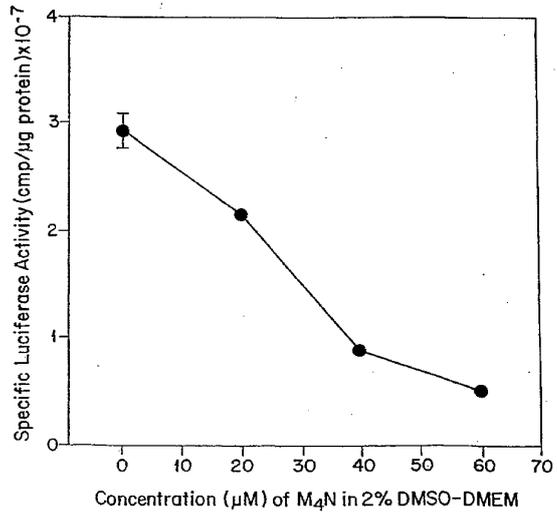
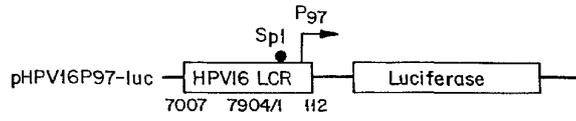
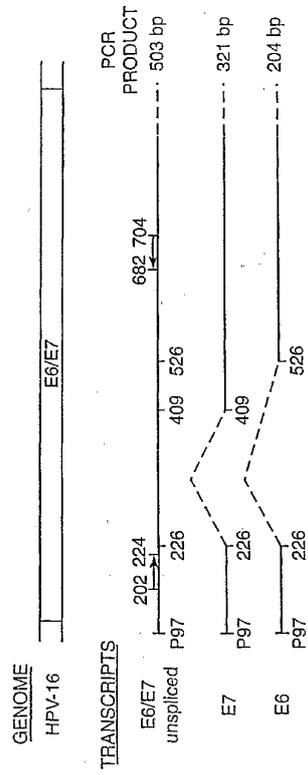


FIG. 2

FIG. 3C



WO 02/089795

PCT/US02/14374

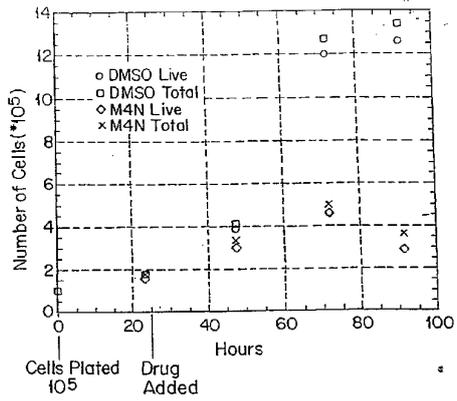


FIG. 4A

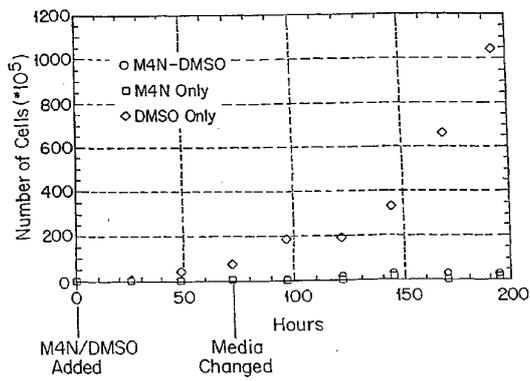
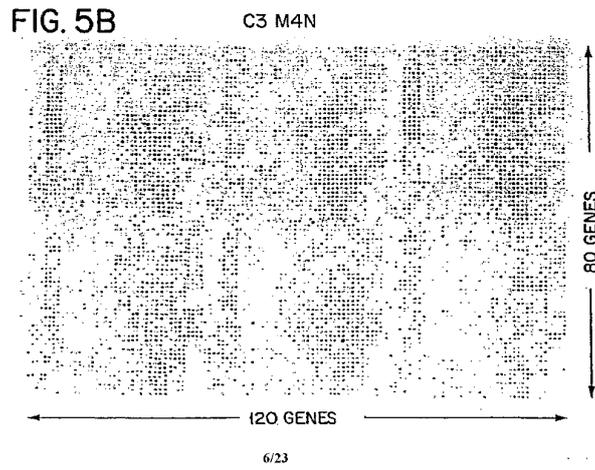
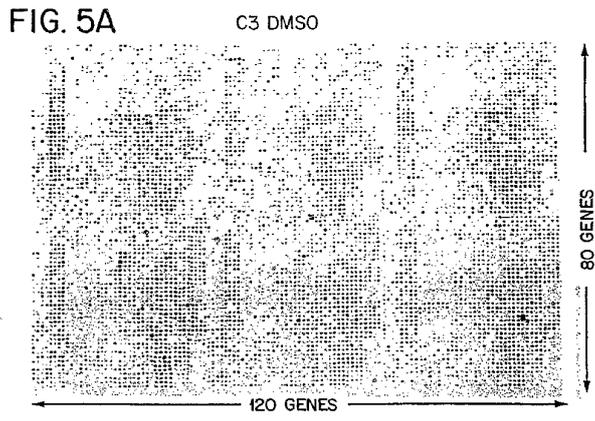


FIG. 4B



WO 02/089795

PCT/US02/14374

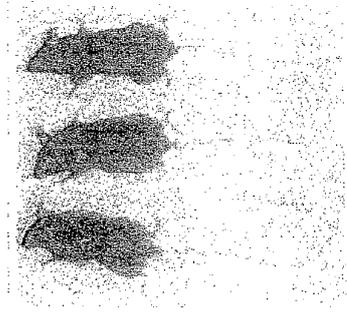


FIG. 6



WO 02/089795

PCT/US02/14374

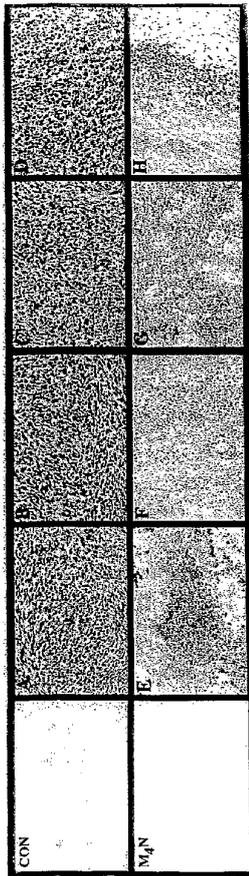


FIG. 7

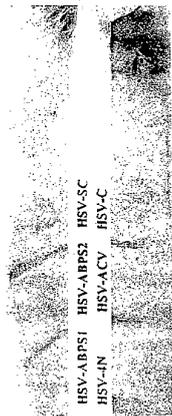
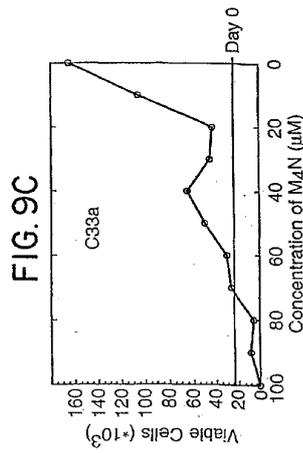
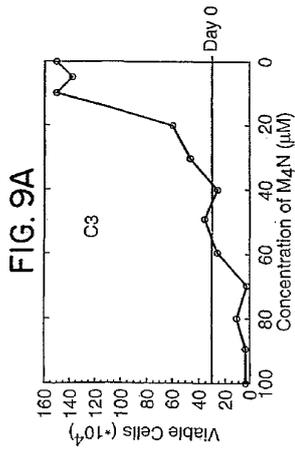
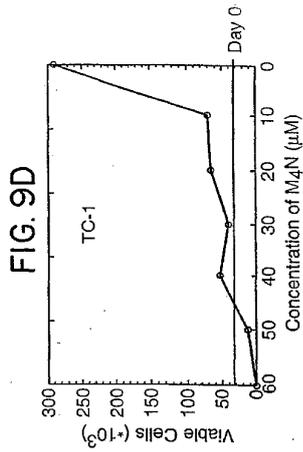
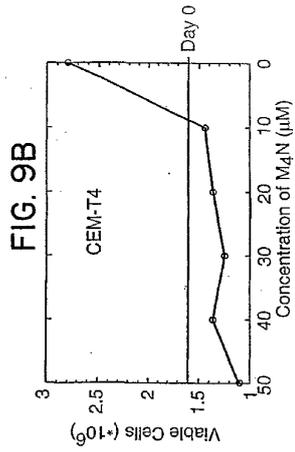


FIG. 8

WO 02/089795

PCT/US02/14374



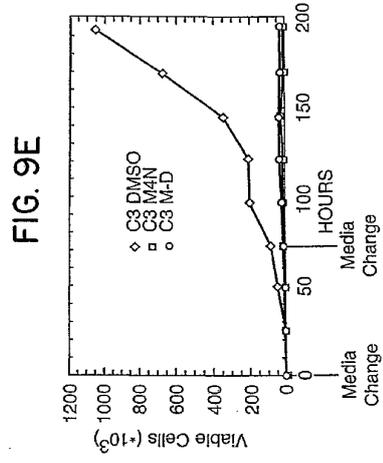


FIG. 10A

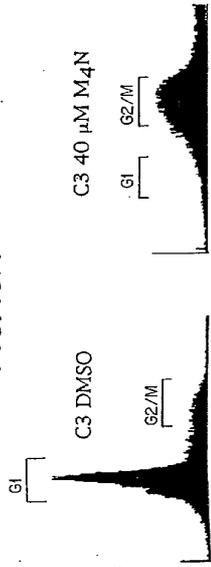


FIG. 10B



FIG. IOC

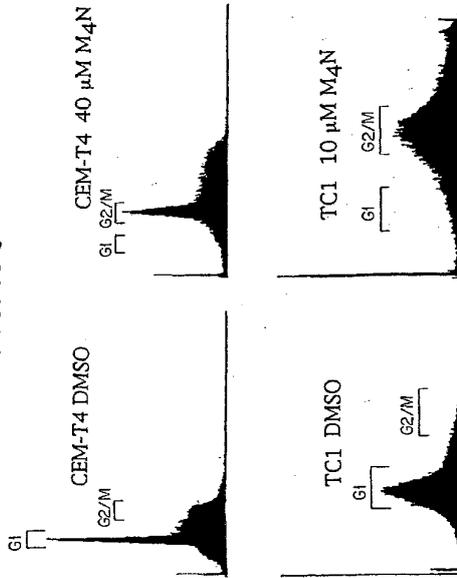


FIG. IOD

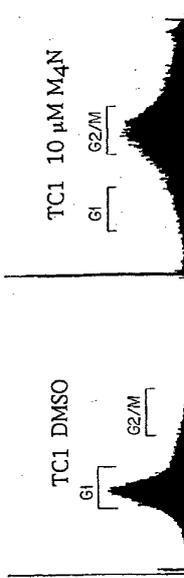
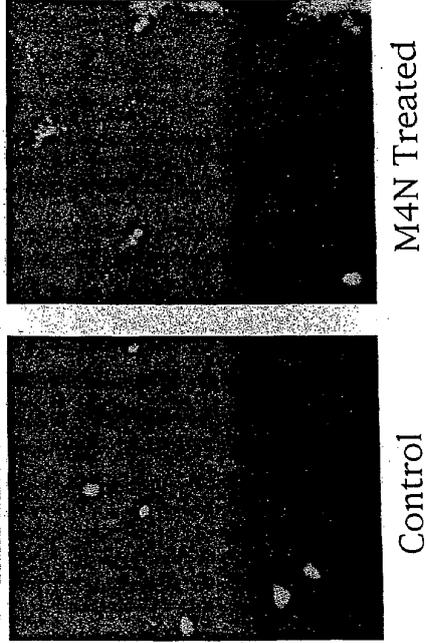


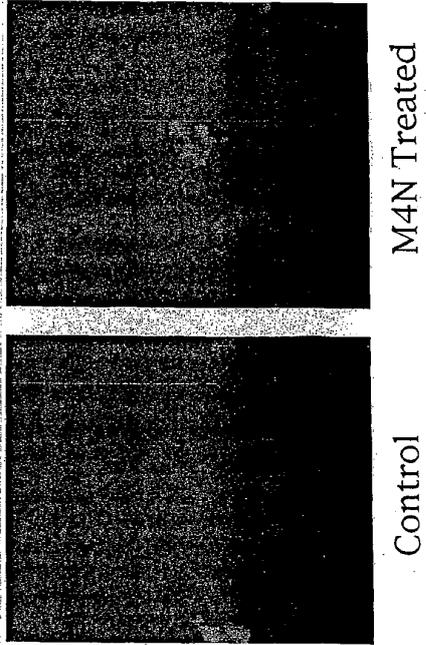
FIG. IIA



WO 02/089795

PCT/US02/14374

FIG. 1B



WO 02/089795

PCT/US02/14374

FIG. 12A

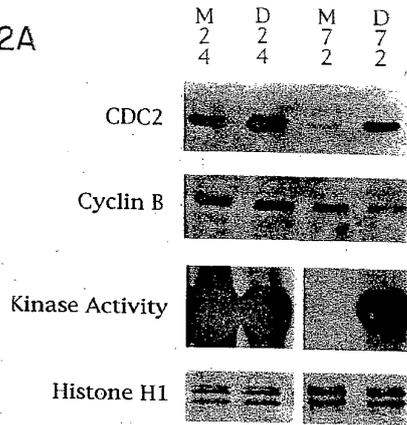


FIG. 12B

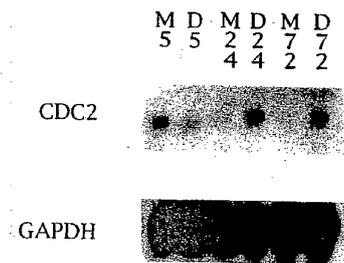
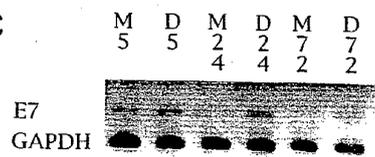


FIG. 12C



WO 02/089795

PCT/US02/14374

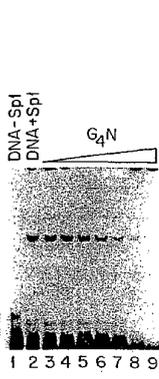


FIG. 13A

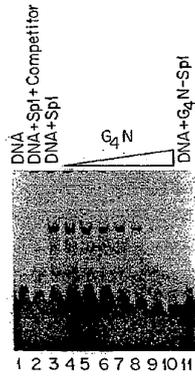


FIG. 13B

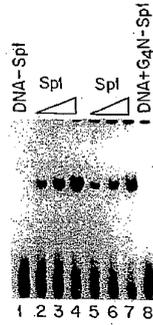
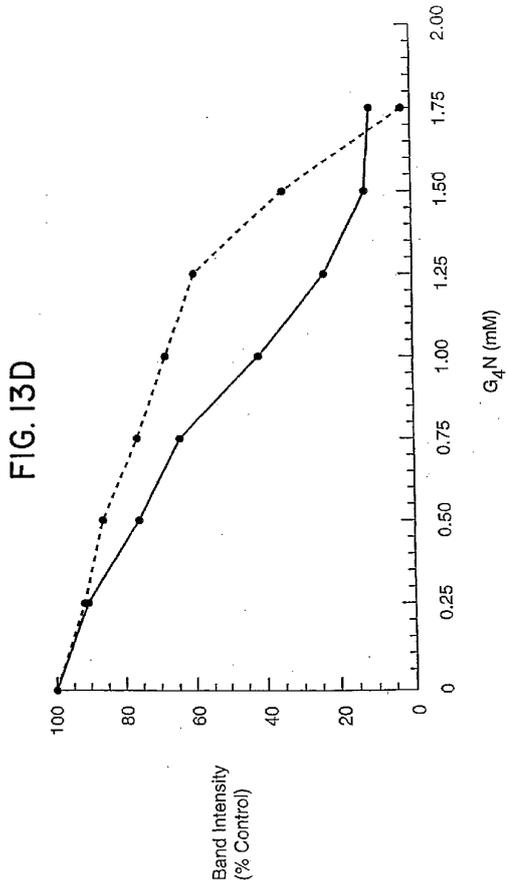


FIG. 13C

WO 02/089795

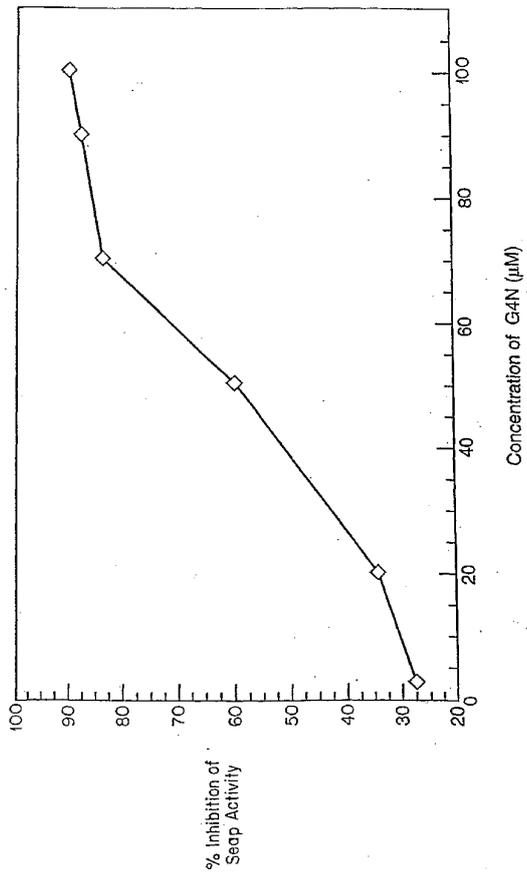
PCT/US02/14374



WO 02/089795

PCT/US02/14374

FIG. 14



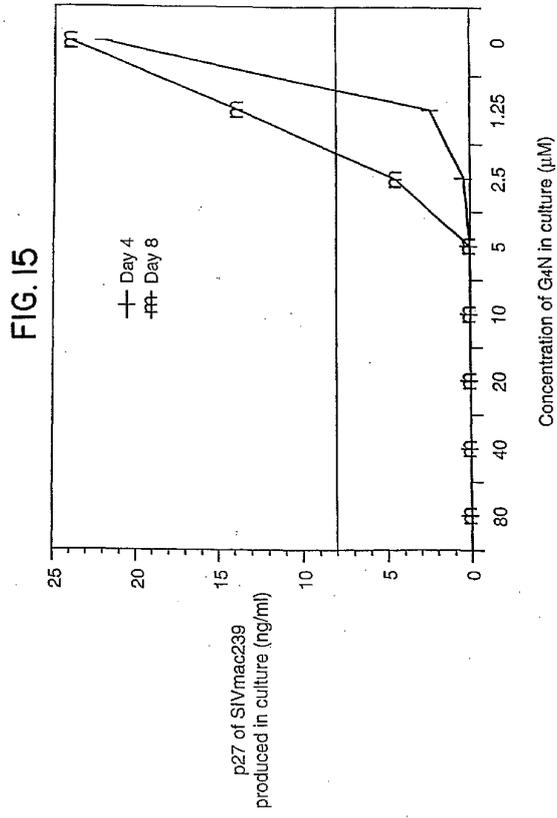
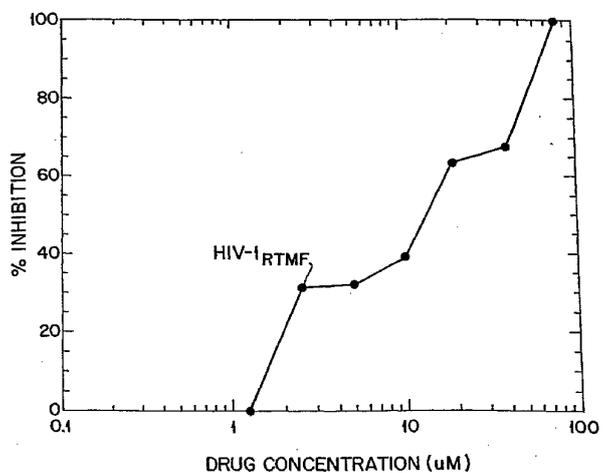


FIG. 16



WO 02/089795

PCT/US02/14374

a

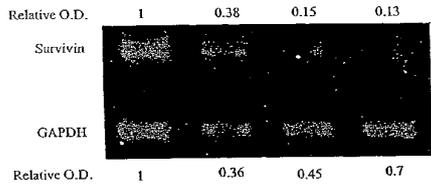


FIG. 17A

b

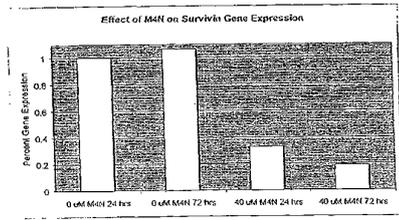


FIG. 17B

WO 02/089795

PCT/US02/14374

FIG. 18A

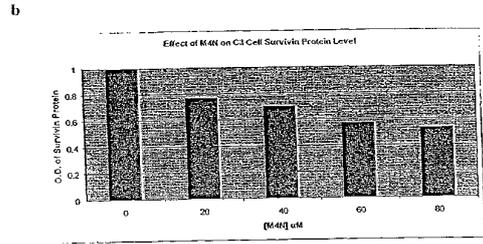
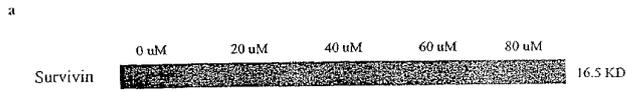


FIG. 18B

WO 02/089795

PCT/US02/14374

FIG. 19A

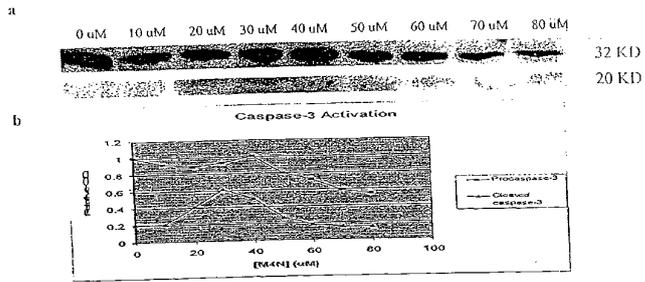


FIG. 19B

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US02/14374 |
|---|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC(7) : A61K 31/417, 31/405, 31/401, 31/225, 31/075, 31/198 US CL : 514/400, 423, 419, 548, 561, 718 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) U.S. : 514/400, 423, 419, 548, 561, 718 | | |
| 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 practicable, search terms used) CHEMICAL ABSTRACTS, MED LINE, EAST | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | US 4,774,229 A (JORDAN) 27 September 1988, see entire document. | 1-21 |
| A | US 5,008,294 (JORDAN et al) 16 April 1991, see entire document. | 1-21 |
| A | US 5,276,060 A (NEISS et al) 04 January 1994, see entire document. | 1-21 |
| A | US 6,071,949 A (MULSHINE et al) 06 June 2000, see entire document. | 1-21 |
| A | US 6,214,874 B1 (HUANG et al) 10 April 2001, see entire document. | 1-21 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: | | |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" Document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone | "T" 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 |
| "E" earlier document published on or after the international filing date | "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 | |
| "L" document which may throw doubt on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "U" document member of the same patent family | |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other matter | | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| Date of the actual completion of the international search 19 JUNE 2002 | Date of mailing of the international search report 17 SEP 2002 | |
| Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 806-8290 | Authorized officer <i>Valerie Bell Harris for</i> JAMES H. REAMER Telephone No. (703) 808-1955 | |

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 P 31/18 | A 6 1 P 31/18 | |
| A 6 1 P 31/22 | A 6 1 P 31/22 | |
| A 6 1 P 35/00 | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 43/00 | A 6 1 P 43/00 | 1 0 5 |

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, GQ, 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, EC, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

M a c i n t o s h

(72) 発明者 ファング, ル チウ シー.
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 1 8, バルチモア, エヌ. チャールズ ストリート
 3 4 0 0

(72) 発明者 ヘラー, ジョナサン ディー.
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 2 2, ダンダルク, ビーチ ドライブ 8 2 0 8

(72) 発明者 チャン, チウ-テュアン
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 1 8, バルチモア, アパ-トメント 8 2 7, セン
 ト ポウル ストリート 3 5 0 1

Fターム(参考) 4C076 AA13 BB11 CC27 CC35 DD55E FF12
 4C206 AA01 AA02 CA34 FA51 FA53 KA01 MA01 MA02 MA04 MA05
 MA36 MA86 NA14 ZB21 ZB26 ZB33 ZC55