



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1525857 B

(45) 授权公告日 2013.06.12

(21) 申请号 02813862.7

A61K 31/225 (2006.01)

(22) 申请日 2002.05.08

A61K 31/075 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

(30) 优先权数据

09/851,425 2001.05.09 US

(56) 对比文件

US 6214874, 2001.04.10, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2004.01.09

审查员 修文

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2002/014374 2002.05.08

(87) PCT申请的公布数据

W002/89795 EN 2002.11.14

(73) 专利权人 约翰斯·霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 黄汝吉 乔纳森·D·赫勒 张智全

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

公司 72003

代理人 杨淑媛 高龙鑫

(51) Int. Cl.

A61K 31/417 (2006.01)

A61K 31/405 (2006.01)

A61K 31/401 (2006.01)

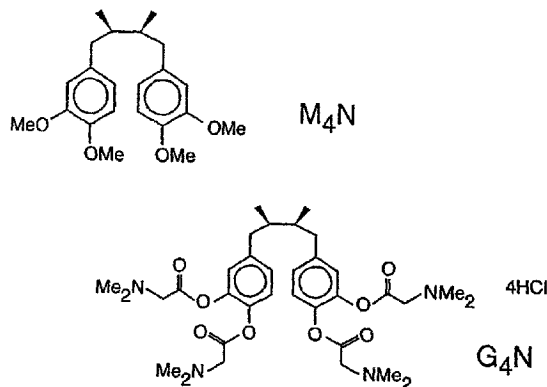
权利要求书1页 说明书22页 附图22页

(54) 发明名称

去甲二氢愈创木酸衍生物在制备治疗肿瘤的药物中的应用

(57) 摘要

去甲二氢愈创木酸衍生物抑制 CDC-2 和 survivin, 促使凋亡和治疗肿瘤的应用。



1. 四 -O- 甲基去甲二氢愈创木酸在制备用于治疗个体白血病的药物中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的应用,其中所述药物进一步包括至少一种药用可接受的赋形剂或载体。
3. 根据权利要求 2 的应用,其中所述赋形剂或载体选自二甲基亚砷,磷酸缓冲盐和脂质体制剂。
4. 根据权利要求 1 的应用,其中所述个体为哺乳动物。
5. 根据权利要求 4 的应用,其中所述哺乳动物为人类。

去甲二氢愈创木酸衍生物在制备治疗肿瘤的药物中的应用

[0001] 本发明部分基金来自国立卫生研究中心 (NIH) 批准的 No. AI 32301 基金和美国军事医学研究批准的 DAMD17-93-C3122 基金。美国政府享有本发明的部分权力。

技术领域

[0002] 本发明涉及去甲二氢愈创木酸衍生物,尤其是含有天然氨基酸取代基的衍生物在治疗肿瘤和病毒感染中的应用。

背景技术

[0003] 癌症是由多种遗传和外在因素所导致,表现为在不同组织中产生了无法控制的细胞生长。抗癌研究的全球目标在于开发临床治疗方法,使该治疗能够缩减肿瘤生长,对宿主无毒,且大多数患者都能够承受。抑制特定细胞分裂的肿瘤药物应该没有明显副作用的有效化疗制剂。

[0004] 细胞在细胞周期过程中要通过许多检查点 (checkpoints)。为了通过这些检查点,需要满足特定标准。在 G2/M 过渡期,最主要的调节子是细胞周期蛋白依赖性激酶 CDC2。该激酶牢固地结合到调控性蛋白细胞周期蛋白 B 上,所形成的复合物被称作促成熟因子 (MPF),它能激发一连串反应导致细胞进入早期的初始阶段 (1)。很正常,当 MPF 的任一部分丢失或失活,都会阻碍细胞进程,而不进入 G2 期。

[0005] MPF 的表达和活性在不同水平上受到调节。细胞周期蛋白 B 水平在细胞周期 G1 至 S 期期间缓慢提高,在 G2 至 M 期的过渡期间达到最高值,在有丝分裂期间急剧下降 (2)。另一方面, CDC2 蛋白一直存在于细胞周期中,而在 G2 期的最后阶段 CDC2 蛋白水平略微升高 (3)。蛋白的活性依赖于与之相关的相应细胞周期蛋白,以及依赖于由磷酸酯酶 CDC25C 引起的蛋白抑制位点的脱磷酸化 (4,5)。已经显示,由辐射或化学反应导致的 DNA 损伤使脱磷酸化失败而引发 G2 停滞。最近,有证据显示任何剩余的 CDC2 可以在 DNA 损伤后被转运到核外 (6)。

[0006] 一些天然存在的植物木酚素去甲二氢愈创木酸 (NDGA) 衍生物已经显示通过抑制病毒转录而阻止病毒复制的功能。这项早期的工作显示了 NDGA 衍生物通过使 Sp1- 依赖性启动子失活而抑制 HIV (7,8), HSV (9) 和 HPV (10) 的转录,这些 NDGA 衍生物最初是从 *Larrea Tridentata* 中分离得到的,其后采用化学方法合成而得。没有预料到的是,其中一个衍生物四 - 氧 - 甲基 NDGA 还表现出能诱导哺乳细胞系的细胞周期停止。以下所述证据表明 M₄N 能够诱导哺乳动物细胞的 G2 停滞,而没有检测到毒性,并且还说明停滞是由于抑制了细胞周期蛋白依赖性激酶 CDC2。

[0007] 人类乳头瘤病毒 (HPV) 感染使得在各种类型的鳞状上皮细胞中产生了无法控制的细胞生长,从而导致各种病症,从良性 *pallilomae* (疣) 到子宫颈癌、阴茎癌和口腔癌。这些与 HPV 密切相关的癌症和广泛存在的感染显示了研制抗 HPV 治疗方法的重要性。

[0008] 即使不是所有病毒,也是大多数病毒都寄生在宿主中,其中包括那些复制的活性突变体。它们需要特定细胞因子的参与以维持病毒的生长。与病毒蛋白质不同,宿主细胞

因子不存在突变压力,通常结构是不变的。因此,能够在病毒生命周期各阶段阻止病毒来利用细胞因子的化合物可能会是很好候选药物,这种抗病毒药物不受突变体的影响。利用细胞因子作为替代靶点用于抑制 HIV-1 的研究已有报道 (11)。

[0009] 申请人早期已报道从 Creosote bush (*Larrea tridentata*) 中分离得到的 3'-氧-甲基 NDGA (即 Ma1.4) 能够在人细胞培养物中明确地阻止基本 HIV 的转录, Tat- 调控的反式激活, 以及 HIV 复制 (8, 12, 13)。Ma1.4 是通过干扰转录因子 Sp1 结合到 HIV 前病毒模板启动子上而发挥作用的。Ma1.4 的靶点被定位在核苷酸 -87 至 -40, 它是 HIV 长末端重复序列 (LTR) 的 Sp1 结合位点。在体外试验中, 未经修饰的 NDGA 并不抑制 HIV 的转录, 且对 Sp1 的结合也没有作用 (8)。

[0010] 然而, 植物木酚素的分离和纯化需要花费大量的工作和费用。由于预见了植物木酚素可能会在临床上用于控制人类 Sp1- 调控的病毒和肿瘤的生长, 因而, 采用非甲基化的 NDGA 作为母体大量低成本地化学合成了九种甲基化的 NDGA (7)。在药物浓度低于 30 μ M 时, 四-氧-甲基 NDGA 通过抑制 Sp1 调控的前病毒转录和反式激活而最大程度地有效控制了 HIV 的复制 (7)。此项研究已被进一步运用到控制单纯疱疹病毒 (HSV-1 和 HSV-2) 的生长中 (9)。单纯疱疹立早 (immediate early (IE)) ICP4 基因是 HSV 复制的关键基因。该基因的启动子区域具有八个 Sp1 相同的结合位点 (15), 其中有五个是 ICP4 基因表达的必需基因。因此使 ICP4 基因成为这项试验的很好候选基因。申请人已经发现 3-氧-甲基 NDGA (Ma1.4) 和四-氧-甲基 NDGA (M_4N) 都是 Vero 细胞中 HSV 的 ICP4 基因表达的有效转录抑制剂, 在电泳迁移率实验 (EMSA) 观察到它们是通过阻断 Sp1 蛋白结合至 ICP4 启动子而产生作用 (9)。

[0011] 在感染的 Vero 细胞中, 通过测试 M_4N 和 Ma1.4 的抗-HSV 活性, 并与无环鸟苷 (acyclovir, ACV) 的活性相比, 申请人观察到作用于第 10 代 HSV-1 和第 4 代 HSV-2 的 M_4N 的 IC_{50} 值在 11.7 μ M 至 4 μ M, 并没有需要更高药物浓度的明显上升趋势。然而, ACV 抑制第一代 HSV-1 和抑制第十代 HSV-1, 其 IC_{50} 值从 7 μ M 升至 444 μ M, 抑制第四代 HSV-2 的 IC_{50} 值 >88 μ M, 显示了 Vero 细胞内快速形成了对 ACV 药物的耐受。 M_4N 的选择指数 S. I. (TC_{50}/IC_{50}) 保持相对稳定; 在 vero 细胞中, 病毒经过十代后, ACV 的 S. I. 下降了 60 倍 (9)。可见, M_4N 是突变非敏感药物, 它可以有效抑制对 ACV 耐药的 HSV (9)。

[0012] 鉴于事实, Sp1 是一种重要的细胞转录因子 (16), 应该寻找对于 Sp1 调控的细胞基因的表达可能具有抑制作用的化合物。一旦 Sp1 牢固地结合在结合位点时, Ma1.4 不能替代 Sp1 (8)。因此, NDGA 衍生物似乎对于增殖细胞中的 Sp1 调控的基因比稳态细胞中 Sp1 调控的看家基因表达的作用更大。对于前者, 药物能够在 DNA 合成期间与 Sp1 蛋白竞争基因启动子中的 Sp1 位点, 而在后者, 药物对于 Sp1 蛋白已经牢固地结合在启动子上的看家基因转录的染色质几乎没有作用。其实这种现象已经被显示。正如下所示, 通过对 9600 个表达的基因阵列进行研究, 申请人发现大多数 Sp1 调控的基因产物保持在相似的水平上, 培养的宫颈癌细胞 C3 并不受药物处理的影响 (图 5)。甚至, 选择指数较低的 M_4N , 如果必需全身用药时, 则使其应用受到限制, 只能使用最低有效浓度。另一方面, 人类乳突瘤病毒最初通过 Sp1 调控的 HPV E₆E₇ 基因的表达导致子宫颈实体瘤和口腔肿瘤的形成 (17)。申请人推理, 如果药物能够原位传输, 并且只维持在肿瘤区域, 则高浓度药物可以有效消灭肿瘤而对于患者几乎没有损伤。

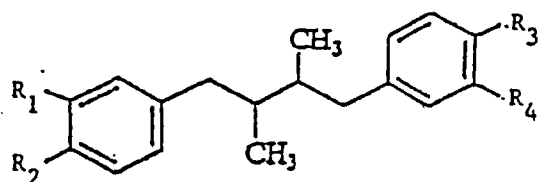
[0013] Survivin 是一种抑制细胞凋亡的物质,它大量存在于人类癌细胞中却不存在于正常成人组织中,被认为是细胞死亡 / 存活的终端效应期可能的调节子 (36)。Survivin 以细胞周期依赖性方式表达于 G2-M 中,直接与有丝分裂纺锤体微管相结合。Survivin 在 Thr-34 上的磷酸化似乎是在细胞分裂时维持细胞生存力的必要步骤 (37),已显示磷酸化缺陷的 survivin 突变体的表达能够激起几种人类黑素瘤细胞系的凋亡 (38)。磷酸化的 survivin 作用于凋亡酶 (caspase) 通路以抑制凋亡酶 -3 和凋亡酶 -9 的形成,通过该途径而抑制细胞凋亡。(Ref. 39, 10 页,给出了凋亡信号通路的概要)。因此,能够减少 survivin 表达的化合物将有可能加快细胞凋亡和死亡的速度。CDC-2 已显示是 survivin 磷酸化的必要物质 (37)。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明的一个目的在于提供用于治疗动物,特别是哺乳动物,更特别是人类的癌性肿瘤和非癌性肿瘤的化合物和组合物。根据本发明的这个技术方案,提供了抑制肿瘤生长的新的去甲二氢愈创木酸衍生物。

[0016] 去甲二氢愈创木酸衍生物是指具有以下结构的化合物

[0017]



(I)

[0018] 其中, R_1 , R_2 , R_3 和 R_4 各自独立代表 -OH, -OCH₃, -O(C=O)CH₃, 或氨基酸残基,但是不能同时都是 -OH。氨基酸取代基包括丙氨酸,精氨酸,天冬酰胺,天冬氨酸,半胱氨酸,谷氨酸,谷氨酰胺,甘氨酸,组氨酸,异亮氨酸,亮氨酸,赖氨酸,蛋氨酸,苯基丙氨酸,脯氨酸,丝氨酸,苏氨酸,色氨酸,酪氨酸,缬氨酸,5-羟赖氨酸,4-羟脯氨酸,甲状腺素,3-甲基组氨酸,ε-N-甲基赖氨酸,ε-N,N,N-三甲基赖氨酸,氨基脂肪酸,γ-羧基谷氨酸,磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸,磷酸酪氨酸,N-甲基精氨酸和 N-乙酰赖氨酸。

[0019] 本发明尤其优选的化合物是 M₄N 和 G₄N,见图 1。

[0020] 本发明进一步的目的在于提供一种治疗癌性肿瘤和非癌性肿瘤的方法,该方法利用了这些新的衍生物以及已知的、但从前还没有用于治疗肿瘤的类型衍生物。该方法对于抑制含有细胞周期蛋白依赖性激酶 CDC2 的快速增殖细胞特别有效。本发明的进一步目的在于提供一种抑制真核细胞周期中的 CDC2 的方法,优选动物细胞,更优选哺乳动物细胞,最优选人类细胞。

[0021] 根据本发明方法治疗的肿瘤包括对于上述化合物敏感的任何肿瘤,尤其包括对于细胞周期蛋白依赖性激酶 CDC2 周期的抑制敏感的快速分裂的癌性肿瘤和良性肿瘤。

[0022] 术语“癌性肿瘤”包括任何可能已经转移或还没有转移的恶性肿瘤。术语“非癌性肿瘤”包括任何良性肿瘤。这些术语是本领域技术人员通常使用和理解的术语。

[0023] 可通过本发明的组合物和方法治疗的良性和恶性肿瘤的例子在 Cancer Biology (Raymond W. Ruddon, Cancer Biology, 3rd Ed., Oxford Univ. Press, 1995, 作

为参考文献引用)中的表 1-1 给出。用于治疗肿瘤包括已知的起源于病毒的肿瘤,以及不是起源于病毒的肿瘤。本发明的组合物和方法尤其有益于治疗实体瘤。

[0024] 本发明的另一个目的在于提供一种抑制细胞周期蛋白依赖性激酶 CDC2 周期的方法。该方法在抑制细胞增殖,尤其是在抑制快速分裂的细胞增殖方面非常有用。

[0025] 在一个优选的实施方案中,本发明所述化合物和组合物被用于治疗 HPV- 诱导的肿瘤。HPV- 诱导的肿瘤尤其包括,但不受限于,与 HPV 感染相关的宫颈癌、口腔癌、阴茎癌和头颈癌。本方法包括局部使用去甲二氢愈创木酸衍生物,尤其是使用四-O- 甲基去甲二氢愈创木酸 (M_4N) 和四甘氨酸基去甲二氢愈创木酸 (G_4N) 治疗癌性和非癌性 HPV- 诱导的肿瘤。

[0026] 本发明的另一个目的在于提供一种通过施用含有氨基酸取代基的式 I 化合物来抑制病毒复制和生长的方法。该方法优选采用氨基酸取代基 R_1 , R_2 , R_3 和 R_4 都相同的化合物。

[0027] 本发明的另一个目的在于提供一种在表达 survivin 细胞的真核细胞周期中抑制 survivin 产生的方法,这种细胞尤其是癌细胞。本发明人发现了本发明的去甲二氢愈创木酸衍生物下调 survivin 的 mRNA 和蛋白水平并活化 CDC-2 和凋亡酶通路,由此提高了表达 survivin 的细胞的凋亡水平。该方法提供了一种治疗癌症的方法,其中 survivin 的表达受到抑制或清除,而由此提高了癌细胞凋亡的速度。

[0028] 预计 M_4N 、 G_4N 和其它衍生物可通过局部注射至肿瘤内的方式给药,通常随同药用可接受的稀释剂、赋型剂和载体一起给药。在优选的实施方式中, M_4N 以 DMSO 溶液的形式注射至肿瘤内,而 G_4N 以 PBS 溶液形式给药。 G_4N 的使用补充了 M_4N 的应用,尤其是对大肿瘤 ($>2cm^3$),这是由于 G_4N 的水溶性使其能够扩散到肿瘤的更广泛区域。本发明的其它水溶性和水不溶性去甲二氢愈创木酸衍生物的应用类似。这些物质也可以使用本领域公知的和常用的脂质基质的制剂进行全身给药。

[0029] 本发明的药用可接受的稀释剂、赋型剂和载体是与 M_4N , G_4N 和其它类似衍生物相容的本领域技术人员已知的物质,而且这些物质适用于人类或其它哺乳动物的局部给药。尽管以下描述的实例是以局部注射的方式给药,但也可以使用其它局部给药方式如外用给药或传输至肿瘤靶点的靶向给药。

[0030] 能获得所需治疗效果的化合物给药剂量虽不尽相同,但其可以由本领域技术人员容易地确定出。剂量、给药频率和治疗时间的长短视情况而定,主要由肿瘤大小和类型决定。举例来说, M_4N 单独给药剂量是根据每克肿瘤重量用药 10mg-20mg,或与相似剂量的 G_4N 共同给药,给药间隔从每天至每周或更少的频率。将 50 μ l 至 100 μ l 的 M_4N 以浓度 200mg/ml 溶于 DMSO 中,单独或与 G_4N 联合给药时,有望对于 1-1.5 cm^3 的多种肿瘤的治疗有效。

[0031] 附图简述

[0032] 图 1 为 M_4N 和 G_4N 的结构。

[0033] 图 2A 为显示 E_6/E_7 启动子 (pPV16P97) 区域和 Sp1 蛋白结合位点的 HPV-16LCR。

[0034] 图 2B 为 M_4N 对 C-33A 细胞的 E_6/E_7 启动子活性的作用。

[0035] (通过不同浓度的 M_4N 来抑制 E_6/E_7 启动子控制的荧光素酶基因的转录) 图 3A-3C 为通过 40 μ M 的 M_4N 抑制病毒 E_6 和 E_7 的 RNA 转录物。C₃ 细胞在含有 40 μ M 的 M_4N 或仅含 DMSO 的培养基中处理 71 个小时,提取 C₃ 细胞的总 RNA 用于进行相对 RT-PCR(relative

RT-PCR)。该 RTPCR 样品在增加的扩增循环后移走并溶在琼脂糖凝胶上。凝胶图片 (3A 和 3B) 指出了这些循环,生长基质中 M_4N 存在 (+) 或不存在 (-),以及 pGMT 载体的两个消化产物作为尺寸标记物。扩增图 (2C) 显示了扩增产物的两个期望大小,它是由早期病毒 RNA 转录产物的交替接合而形成。

[0036] 图 4A 为 M_4N 对 C_3 细胞生长的抑制。

[0037] 图 4B 为除去 M_4N 后对 C_3 细胞生长的抑制。

[0038] 图 5A-5B 为基因检测分析所测得的 M_4N 对于 C_3 细胞的基因表达的影响。

[0039] 5A,表示 DMSO 处理 >2 小时后 C_3 细胞 (C_3 DMSO) 中表达的基因。

[0040] 5B,表示用 DMSO 作为溶剂的 M_4N 处理 >2 小时后 C_3 细胞 (C_3M_4N) 中表达的基因。

[0041] 图 6A-6B, M_4N 对长有肿瘤的小鼠处理后所进行的观察。

[0042] 6A,对长有单个肿瘤的小鼠进行原位注射 DMSO (#3) 或 M_4N (#7)。对于长有两个肿瘤的小鼠 #9 中的一个肿瘤进行原位注射 M_4N 。

[0043] 6B,相同小鼠中的经 M_4N 处理后的肿瘤 (白色疤痕) 与未经处理的肿瘤,如表 2 所描述的 #9。

[0044] 图 7 为 M_4N 和 M_4N/G_4N 对于小鼠中肿瘤生长的组织病理学影响。板的第一栏表示 #4, 10, 12 小鼠的大肿瘤用 DMSO 处理后 (CON) 与小剂量药物处理 (M_4N 或 M_4N/G_4N) 的 #12, 10, 27 和 20 小鼠的病变组织的比较 (M_4N)。其后的像片为 (A、B、C 用 DMSO 处理, D 未处理, E、F、G、H 用 M_4N 或 M_4N/G_4N 处理) 小鼠在 100X 放大下检查的肿瘤实例 (表 1 和表 2)。

[0045] 图 8 为没有药物 (HSV-C, HSV-SC), 存在无效药物 ($ABDS_1$ [" HSV- $ABDS_1$ "], $ABDS_2$ [" HSV- $ABDS_2$ "]) 以及存在有效药物 (M_4N [" HSV-4N "] 和 ACV [" HSV-ACV "]) 的情况下, HSV-1 的复制。

[0046] 图 9 为 M_4N 引起哺乳动物细胞生长的停止。(a-d) 为用不同浓度的 M_4N 处理的 C_3 , CEM-T4, C33a, 和 TC-1 细胞。实验开始时存在的细胞数目显示为第 0 天。三天后计数存活细胞并根据 M_4N 的浓度制图。(e), 将 C_3 细胞分装入 T-25 小瓶中, 使每个小瓶含有 5×10^3 个细胞, 其中给予含 M_4N 的 1% DMSO 的基质, 或给予只含 1% DMSO 的基质 (第一次改变基质)。三天后, 将 M_4N 处理的一半细胞给予新鲜的仅含 1% DMSO 的基质, 而其余细胞则给予相同条件的新鲜基质 (第二次改变基质)。每天计数细胞并依据处理时间而制图。

[0047] 图 10 为用 M_4N 处理的细胞停止在 G2/M 期。 C_3 细胞 (a), C33a 细胞 (b), CEM-T4 细胞 (c), 以及 TC1 细胞 (d) 在含有 1% DMSO 或含有 M_4N 的 1% DMSO 的基质中生长三天。用胰蛋白酶使细胞消化, 用乙醇固定, 碘化丙啶染色, 然后进行流式细胞术计数。基于碘化丙啶染色强度显示细胞数目的数值 (总细胞数 $3-5 \times 10^4$)。指示的细胞周期阶段被标记出, 且其与通过染色强度确定的相对细胞互补 DNA 对应。

[0048] 图 11 是用 $40 \mu M$ M_4N 处理的 C_3 细胞证明具有 G2 细胞结构。 C_3 细胞在盖玻片上, 在含有 1% DMSO (对照) 或 $40 \mu M$ M_4N 的 1% DMSO (M_4N) 的基质中生长三天。样品用乙醇固定, 并与抗 α (绿色) 和 γ (橙色) 微管蛋白 (a) 抗体一起培养, 或用 DAPI 进行 DNA 染色 (b)。通过荧光显微镜观察细胞。

[0049] 图 12 为 M_4N 使 CDC2 和病毒致癌基因减少。 C_3 细胞在含有 1% DMSO (D) 或含 $40 \mu M$ M_4N 的 1% DMSO (M) 的基质中生长不同的时间。在一特定时间后, 从细胞中分离总蛋白质或总 RNA。用抗 CDC2 或细胞周期蛋白 B 的抗体在相同的硝基纤维素过滤膜上进行 Western 印

迹(a的上面两个板)。细胞周期蛋白B的抗体通过与 γ - 32 PATP和组蛋白H1共同培养而发生免疫沉积后,进行激酶分析(a的下面两个板)。将PAGE凝胶进行库马西染色(coomassie stain)作为承载对照。在药物处理达24小时和72小时后,分别进行激酶检测。对总RNA提取物进行Northern印迹(b)。将过滤器与CDC2或GAPDH的含有随机引物的 32 P-标记DNA培养过夜,清洗,将膜暴露三天。用相同的过滤器检测CDC2和GAPDH RNA。引物与HPV-16E7或GAPDH的区域杂交,进行总RNA提取物的rtPCR分析(c)。两个引物对都被用于相同的反应,用琼脂糖凝胶电泳分析产物。

[0050] 图13为 G_4N 与HIV Sp1-结合位点(-87至-49)相互作用的电泳迁移率分析(EMSA)。(A), G_4N 对Sp1-167D与 32 p标记的HIV Sp1 DNA模板结合的抑制作用。泳道1,模板;泳道2,模板加上0.1 μ g Sp1-167D;泳道3-9,在加入0.1 μ g Sp1-167D之前,模板与增加浓度的 G_4N (0.25-1.75mM)共同培养。(B) G_4N 取代Sp1-167D与HIV模板相结合。泳道1,模板;泳道2,模板加上0.1 μ g Sp1-167D以及过量100倍未标记的模板;泳道3,模板加上0.1 μ g Sp1-167D;泳道4-10,随着 G_4N 浓度增加(0.25-1.75mM)的Sp1/DNA复合物;泳道11,在含有1.75mM G_4N 的反应缓冲液中培养的模板。(C)Sp1-167D替代 G_4N 与模板相结合。泳道1,模板;泳道2-4,模板加上Sp1-167D的增加量(0.075,0.150,0.300 μ g);泳道5-8,增加量的Sp1-167D(0.075,0.150,0.300 μ g)激起免疫反应后,在含有1.2mM G_4N 的反应缓冲液中培养的模板,泳道8没有Sp1-167D。(D)对应于用(A)——•——和(B)——•——表示的增加的 G_4N 浓度,Sp1-167D/DNA复合物带强度减小的图。使用的凝胶是5%非变性聚丙烯酰胺,其每个泳道接受5 μ l的反应液,如实验部分和参考文献中所描述[1]。

[0051] 图14为 G_4N 对于Cos细胞中HIV Tat-调控的反式激活的抑制作用。

[0052] 图15为 G_4N 存在下的SIV的生成。37 $^{\circ}$ C,将 10^7 174x细胞以及人类T-细胞淋巴瘤细胞系与24小时收获的SIV mac 239(4ng的p27)细胞混合2小时。细胞被再次悬浮,并在三个96孔培养板的每一个孔中加入含有 1×10^5 细胞的100 μ l基质。从储存液中配置新鲜的各种浓度的 G_4N ,并将其加入六个孔中。在四天和八天后收集培养液的上清液用于病毒产生的分析。病毒产生是通过修饰的p27壳体蛋白抗原的捕获ELISA进行分析检测,如实验部分所描述。

[0053] 图16为 G_4N 抑制H9细胞产生HIV p24抗原的作用。

[0054] 在AZT耐受的HIV株,HIV-1RTMF感染H9细胞9天后,通过 G_4N 处理后的双份培养液的平均p24水平和未处理的H9细胞的p24水平的比较,计算抑制百分数。

[0055] 图17为Survivin基因表达的RT-PCR分析。(a)上图:用40 μ M的 M_4N 分别处理C3细胞达24小时和72小时的Survivin基因表达(泳道3和4),以及未经处理的对照物(泳道1和2)。下图:相应的GAPDH对照物。带强度用Scion Image进行定量。(b)将Survivin RT-PCR产物信号正常化为GAPDH对照物并作图。

[0056] 图18为药物浓度-依赖性survivin蛋白的下调。(a)将C3细胞与各浓度的 M_4N 培养72小时,所有细胞的溶解产物进行针对survivin的免疫印迹。(b)相对带强度用Scion Image图像软件定量,并针对 M_4N 浓度作图。

[0057] 图19为用 M_4N 处理72个小时的C3细胞中凋亡酶-3裂解片断的免疫印迹分析。(a)凋亡酶-3的Western印迹显示了32KD前凋亡酶-3的裂解并形成活性的20KD裂解的产物。(b)使带强度量化并对 M_4N 浓度作图。

[0058] 发明详述

[0059] 实验方法

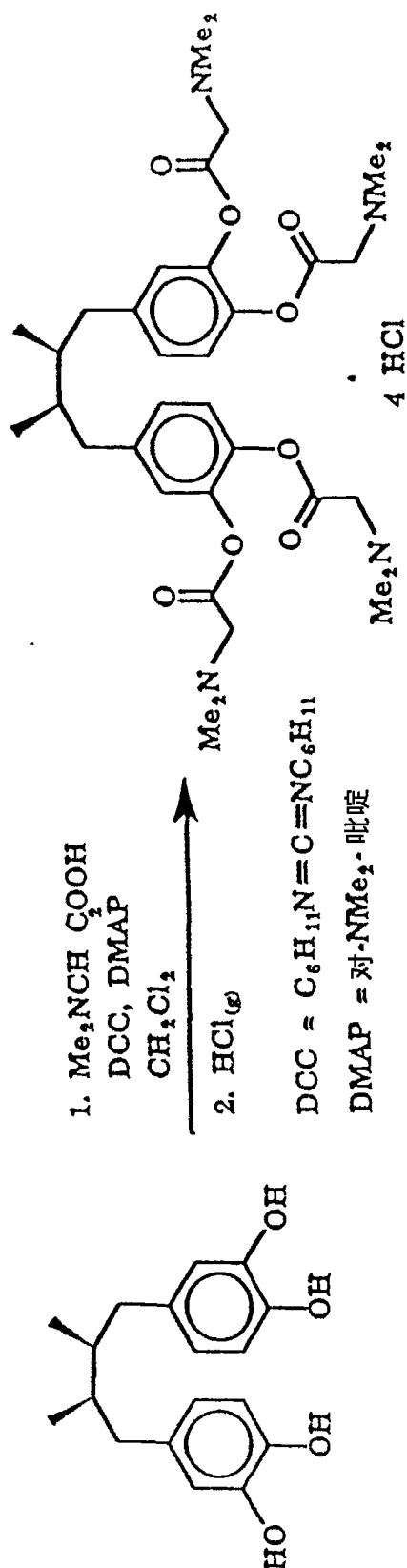
[0060] NDGA 衍生物通过化学方法合成得到的 (7)。细胞系 C3 是 HPV16E+L 加上活化的 Ras 转染的 C57BL/6kh 细胞系 (原 C57BL/6kh 细胞系是由 Loyola University Medical Center, Chicago, Illinois, U.S.A. 的 W.Martin Kast 提供), 它由 Greenstone 等 (18) 和 Feltkamp 等 (19, 20) 所描述的方法进行维持与培养。

[0061] G4N 的合成:

[0062] 制备内消旋 -1,4- 双 [3,4-(二甲氨基乙酰氧基) 苯基]-(2R,3S)-二甲基丁烷盐酸盐, 四甘氨酸基 NDGA, G₄N 的标准步骤。在含有 NDGA (12.8g, 42.3mmol, 1.0equiv) 和 N, N, -二甲基甘氨酸 (26.2g, 254mmol, 6.0equiv) 的二氯甲烷 (250ml) 溶液中, 加入 DCC (52.4g, 254mmol, 6.0equiv) 和 DMAP (2.32g, 18.9mmol, 1.0equiv)。在室温下, 于氮气氛围中搅拌反应混合物达 24 小时。过滤反应混合物, 减压浓缩溶液。然后, 将丙酮 (250ml) 加入反应瓶中, 通入过量的氯化氢气体。将水溶性沉积物溶于水中, 室温下用丙酮重结晶两次得到 (1) (29, 2g, 36.8mmol), 其为白色固体, 收率为 87%。用 VarianUnity-400 (400MHz) 核磁仪, D₂O 为溶剂, TSP 为内标, 得到质子 NMR 图谱。用 Varian Unity-400 (400MHz) 核磁仪, 以 D₂O 作溶剂, 得到 C-13NMR 图谱。C-13 化学位移以 TSP 单峰作为参照 (50.0ppm)。

[0063] 合成方法见路线 1。

[0064]



[0065] 总步骤。除非另有说明,否则所有反应都在用烘箱(120℃)烘干的玻璃器皿中和氮气氛围中进行。丙酮、二氯甲烷、1,4-二噁烷、乙酸乙酯、己烷和四氢呋喃都购自Mallinckrodt Chemical Co.。丙酮用4A分子筛干燥并蒸馏。二氯甲烷,乙酸乙酯和己烷用CaH₂干燥并蒸馏。1,4-二噁烷和四氢呋喃在氮气氛围中,加入钠和二苯甲酮进行蒸馏干燥。去甲二氢愈创木酸购自Fluka Chemical Co.。N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC),4-二

甲基氨基吡啶 (DMAP), 吗啉, 三乙胺和碳酸钾都购自 Aldrich Chemical Co.。

[0066] 分析薄层色谱 (TLC) 在已铺制好的薄板 (硅胶 60F-254) 上进行, 其购自 Merck Inc.。气相色谱分析在装有 25-m 交联甲基硅胶毛细管柱 (0.32mm i.d.) 的 Hewlett-Packard 5890 Series II 分析仪上进行。氮气作为载气, 其流速保持 14.0ml/ 分钟的恒速。保留时间 (tR) 在以下条件下测定: 注射温度 260℃, 柱温等温为 280℃。气相色谱和低分辨质谱分析在配有 Hewlett-Packard 5971A 质量选择探测器和毛细管 HP-1 柱的 Hewlett-Packard 5890 Series II 分析仪上进行。通过媒介-压力液相色谱 (MPLC) 进行分离, 其利用 Jasco Model 880-PU 智能 HPLC 泵, 流速为 120ml/ 小时。MPLC 的填充物为反相硅胶 C18 (颗粒尺寸为 0.035-0.070mm), 购自 Knauer Co.。通过比重柱色谱纯化, 其利用 Merck 试剂硅胶 60 (颗粒尺寸为 0.063-0.200mm, 70-230 网筛 ASTM) 进行操作。

[0067] 红外光谱 (IR) 是利用 Bomem Michelson Series FT-IR 分析仪来测定。报告中的波数 1601cm^{-1} 为聚苯乙烯的吸收。吸收强度用以下缩写表示: s, 强; m, 中等; w, 弱。质子 NMR 图谱利用 Varian Unity-400 (400MHz) 分析仪获得, 以 D_2O 为溶剂, 3-(三甲硅基) 丙酸钠盐为内标。C-13NMR 图谱利用 Varian Unity-400 (100MHz) 分析仪获得, 以 D_2O 为溶剂, C-13 化学位移是以 3-(三甲硅基) 丙酸钠盐的单峰中心 (60.0ppm) 为参照。峰的多样性由以下缩写表示: s, 单峰; d, 双峰; t, 三重峰, q, 四重峰; m, 多重峰; J, 耦合常数 (hertz)。高分辨质谱是利用 JEOL JMS-HX110 质谱仪获得。

[0068] 内消旋-1,4 双 [3,4-(二甲氨基乙酰氧基) 苯基]-3S-二甲基丁烷盐酸盐 (2)。在含有 NDGA (1, 12.81g, 42.37mmol, 1.0equiv) 和 N,N-二甲基甘氨酸 (26.21g, 254.2mmol, 6.0equiv) 的二氯甲烷 (250ml) 溶液中加入 DCC (52.45g, 254.2mmol, 6.0equiv) 和 DMAP (5.176g, 42.37mmol, 1.0equiv)。反应混合物在氮气保护下, 于室温搅拌 24 小时。在二环己基脲从反应混合物中过滤出后, 减压浓缩得到的溶液。然后, 将丙酮 (250ml) 加入残余物中, 将过量的氯化氢气体通入所得溶液中。将沉积物溶于水中, 并室温下用丙酮重结晶两次, 得到 2 (28.97g, 36.86mmol), 其为白色固体, 收率为 87%:

[0069] ^1H NMR (D_2O , 400MHz) δ 0.78 (d, $J = 6.0\text{Hz}$, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 1.73 (m, 2H, $2 \times \text{CH}$), 2.38 (dd, $J = 13.2, 9.6\text{Hz}$, 2H, $2 \times \text{ArCH}$), 2.78 (dd, $J = 13.2, 4.4\text{Hz}$, 2H, $2 \times \text{ArCH}$), 3.03 (s, 24H, $8 \times \text{CH}_3\text{N}$), 4.53 (s, 8H, $4 \times \text{CH}_2\text{N}$), 7.22 (m, 4H, $4 \times \text{ArCH}$), 7.29 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H, $2 \times \text{ArH}$); ^{13}C NMR (D_2O , 100MHz) 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, $\text{C} = \text{O}$), 1620 (m), 1478 (m), 1377 (m), 1210 (m), 1106 (m), 961 (w), 852 (w) cm^{-1} ; (2-4HCl) 的 MS (FAB) m/z (相对强度) 643 (M^+ , 30), 600 (20), 558 (43), 515 (20), 473 (42), 430 (13), 388 (26), 185 (18), 93 (38), 58 (100), 44 (22); (2-4HCl) 的 HRMS (FAB) $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_8$ 的计算值 642.3628, 理论值 642.3614; $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_8\text{Cl}_4$ 的分析计算值: C, 51.78; H, 6.90; N, 7.10; O, 16.23。理论值: C, 51.70; H, 6.85; N, 7.05; O, 16.21。

[0070] 可以理解, 通过取代合适的其它 N,N-二甲基-取代的氨基酸, 可以合成得其它的氨基酸取代的本发明的化合物。

[0071] 实施例 1

[0072] M4N 和几个其它的 NDGA 衍生物对于 SP1-调控的 E_6/E_7 启动子活性的影响。

[0073] M4N 和几个其它的 NDGA 衍生物对于 SP1-调控的 E_6/E_7 启动子活性的影响是

利用荧光素酶作为报告进行检测。该测试方法通过磷酸钙法将融合了荧光素酶报告的 HPV16LCR(P₉₇) 的 DNA 转染至 C33A 细胞中。C33A 是一种宫颈肿瘤细胞系 (ATCC 序列号 HTB-31), 其不包含任何整合的 HPVDNA, 但具有 HPV 早期基因启动子强表达所必需的转录因子。在 DNA 转染的第二天, 将助溶于二甲基亚砜 (DMSO) 配制的不同浓度的药物加入至所述细胞中。药物处理 30 个小时后 (以使测试能在瞬时转染试验标准的 48 小时内完成), 将细胞裂解, 并测定特定的荧光素酶活性 (Luciferase Assay Systems, Promega, U. S. Pat. No. 5283, 179)。随着 M₄N 药物浓度的增加, 特定的荧光素酶活性随之减小。

[0074] 结果 (见图 2) 表明在荧光素酶测试中 M₄N 显著减少了 Sp1 调控的 HPV E₆/E₇ 启动子启动的转录。

[0075] 实施例 2

[0076] 用 M₄N 处理后 E₆/E₇mRNA 合成的抑制

[0077] 用 M₄N 处理后 E₆/E₇mRNA 合成的抑制是通过宫颈细胞系 C₃ 中的 RT-PCR 进行测试。相关的 RT-PCR 是根据标准化细胞计数的总细胞 RNA 量而进行的。在 2% 琼脂糖凝胶上对 RT-PCR 产物进行分析, 结果见图 3。RT-PCR 结果表明具有 E7 (321bp) 和 E6 (204bp) 的预期大小的扩增 cDNAs 在 DMSO 处理的细胞的第 22 循环时就被检测出。在扩增 30 个循环的药物处理的 RNA 提取物中则几乎检测不到这样的产物。对于没有模板的 PCR 对照或 HPV16- 阴性的 C33a 细胞系的总 RNA 提取物中都检测不到扩增的产物。

[0078] 实施例 3

[0079] 通过 M₄N 处理而抑制宫颈 C3 细胞生长

[0080] 将转染 HPV16 的永生小鼠表皮细胞 (C3 细胞) 置于小瓶中, 使每瓶含有 10⁵ 个细胞。24 小时后, 将半数小瓶给予生长基质, 该基质含有溶于 1% DMSO 的 40 μM M₄N, 而另一半则给予仅含 1% DMSO 的生长基质。结果见图 4A。24 小时内, 药物处理的 C3 细胞和对照 C3 细胞的细胞形态已显现出差别。药物处理的细胞生长和分裂比未经药物处理的对照细胞明显减少, 而对于药物处理的和仅含 DMSO 的对照细胞, 存活细胞与总计数细胞的比值分数保持不变。这表明 M₄N 能显著减少细胞分化。

[0081] 将 M₄N 从基质中除去后, 其对 C3 细胞生长的影响也进行了检测。将 C3 细胞置于小瓶中, 使每瓶含有 10⁴ 个细胞。在时间 = 0 时, 在 2/3 的小瓶中加入添加有 40 μM M₄N 的 1% DMSO 的生长基质。其余的小瓶加入仅含 1% DMSO 的生长基质。73 个小时后, 清洗半数已加入含 M₄N 生长基质的 小瓶, 然后加入仅含 1% DMSO 的生长基质。清洗另一半小瓶, 再加入与先前相同的基质。结果见图 4B, 其显示 M₄N 处理后的样品在转变成不含药物的基质后, 其细胞生长速度并没有明显增加, 该现象表明即使将细胞外环境中的 M₄N 除去, 其仍继续显著减少细胞的分裂。

[0082] 实施例 4

[0083] 72 个小时药物处理前后的 C3 细胞中细胞基因表达的分析

[0084] 对于 9600 个基因阵列的基因表达进行了研究 (图 5)。根据 Genomics51, 313-3241998 所描述的方法, 将 M₄N (40 μM) 处理 72 小时的 (C₃M₄N) 和未处理的 (C₃DMSO) 中的 polyA⁺RNA 各 5mg 用于人 9600 基因阵列对的杂交研究。用配有 Nikon55mm AF 微 Niko 镜头的彩色照相机拍摄了杂交图像并通过 Macintosh LC630 计算机进行数字化处理。该测试以单一色或双重色模式通过酶底物与酶反应形成颜色, 该方法敏感度高, 且可以复制 (能

够从 10^7 细胞中检测到每个细胞含有 RNAs<5 次拷贝的转录)。

[0085] 将显示差异性表达的基因 ($C_3M_4N/C_3DMSO>10$, $C_3DMSO/C_3M_4N>10$) 的计算机打印结果列表进行分析。TIFF 格式的图像文件和 MSexcel 格式的数据文件被保存在 zip 磁盘中。可根据基因名称和克隆 ID 号来给获得的克隆图像,以便将来用于 northern 印迹分析。

[0086] 在经 M_4N 处理 72 小时后的一组上调或下调基因中,以下是那些尤其与细胞分裂和凋亡相关的基因。一些其它细胞周期相关基因也根据 M_4N 而被大幅度上调。除细胞周期蛋白依赖性激酶 CDC2(实施例 11) 以外,还有例如:

[0087]		增加	
[0088]	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂	(100X)	
[0089]	凋亡 (APO-1) 抗原	(100X)	
[0090]	死亡结构域 3DR ₃	(100X)	
[0091]	Ras- 相关蛋白 RAP-1	(60X)	
[0092]	人 Map 激酶	(40X)	
[0093]	下列细胞周期相关基因根据 M_4N 而被大幅度下调:		
[0094]		处理	未处理
[0095]	细胞周期蛋白依赖性激酶 7	(5%)	100%
[0096]	人类细胞因子受体	(2%)	100%
[0097]	增殖的细胞核抗原, PCNA	(1%)	100%
[0098]	人 TNF- 相关的凋亡 APO ₂	(3%)	100%
[0099]	半胱氨酸蛋白酶	(7%)	100%

[0100] 在早期,如药物处理后一个小时,其 E_6/E_7 水平与对照细胞中的相似,而 4.5 小时后, E_6/E_7 水平则不能被 RT-PCR 检测出 (10)。9600 基因阵列的基因表达能够用从这些短时间 (1 小时和 5 小时) 处理的细胞中分离出的 RNA 重复出,以进一步抑制药物对细胞的最初作用。

[0101] 实施例 5

[0102] 通过局部注射 M_4N 靶向抑制 C_3 肿瘤生长

[0103] 在 36 只 C57b1-16NCR 小鼠的后背肩部注入 $5 \times 10^5 C_3$ 细胞。其中 24 只在 20 天内产生了肿瘤。每天注射 ($50 \mu l$ - $100 \mu l$ 的 M_4N 或 M_4N/G_4N) (M_4N 在 DMSO 中浓度为 200mg/ml, G_4N 在 PBS 中浓度为 200mg/ml), 对动物体内肿瘤的生长具有明显的影响,见表 1 和 2,图 6 和 7。

[0104] 表 1. M_4N 和 G_4N 对小鼠体内单个肿瘤生长的影响

[0105]

小鼠 #	治疗时间	病变组织大小 (mm)			切除的病变组织 Wt. (g)		体重 (g)		
	天数 1-16	第 1 天	第 7 天	第 21 天	第 16 天	第 24 天	第 1 天	第 16 天	第 24 天
1	DMSO	3×8×3.3	—	5×7×4	—	0.3	18.8	—	20.2
2	DMSO	4.4×6×3.5	10×12×8	—	1.56	—	19.6	20.5	—
3	DMSO	0.8×0.8×1	—	10.5×11×9	—	1.14	18.2	—	16.1
4	DMSO	2.8×3.8×2.5	—	18×11×9	—	2.9	17.6	—	20.2
6	天数 1-16								
	M ₄ N	—	9×8×5	—	0.2	—	19	19.2	—
7	M ₄ N	—	6×7×7	—	—	0.1	18.2	—	20.4
11	M ₄ N	1×1.3×1	9.5×10×9	—	—	0	19.5	—	20.2
14	M ₄ N	3.8×3.8×3.5	8×9×6	—	0.4	—	17	17.6	—
15	M ₄ N	—	5×4×4	—	0.1	—	18.9	20.0	—
16	M ₄ N	2.8×2.8×2.8	9×6×4	—	0	—	17.2	17.6	—
17	M ₄ N	2.3×2.3×2.3	6×6×4	—	0.2**	—	17.3	—	—
	天数 1-109-17								
18	M ₄ N G ₄ N	3×2.8×3	8×7×5	—	—	1.0***	18.8	—	21.1
19	M ₄ N G ₄ N	—	5×5×5	—	0.2	—	18.2	19.9	—
21	M ₄ N G ₄ N	1.8×1.8×1.8	9×10×5	—	0.2	—	17.3	19.2	—
22	M ₄ N G ₄ N	—	7×7×5	—	—	0	17.9	—	19.5
27	M ₄ N G ₄ N	2.5×5×2.5	59×6×6	—	—	1.8***	20	—	20.7
28	M ₄ N G ₄ N	2.8×2.3×2.8	5×5×4	—	0.17	—	18.1	19.8	—
29	M ₄ N G ₄ N	2.8×2.5×2.8	5×6×4	—	—	0.2	18.8	—	19.6

[0106] *DMSO = 药物溶剂

[0107] ** 第 15 天进行操作

[0108] *** 大部分包含坏死细胞的病变组织也在小鼠 6, 7, 11, 14, 15, 17, 19, 21, 28, 19 中出现 (图 6, 7)。药物治疗后的小鼠 #11 和 #22 中没有病变。在对照小鼠 #1, 2, 3, 4 中发现的肿瘤含有生长的细胞 (图 2)。

[0109] 实验步骤：

[0110] 将 5×10^5 C3 细胞 / 只注入 36 只 C57b1-16NCR 小鼠中。在小鼠后背肩部皮下注射 100 μ L。将细胞悬浮于低盐 HBSS 中并轻微震动使悬浮液保持均匀。

[0111] 24 只小鼠长出肿瘤。其病变大小通过带表卡尺 (dial caliper) 测得。将这些小鼠剃毛、称重并开始治疗 (第一天)。将四只小鼠作为对照小鼠。对照小鼠每天接受肿瘤内注射 50 μ l DMSO。实验小鼠 (10) 接受 50 μ l 溶于 DMSO 的 M₄N (200mg/mL)。其余 10 只小鼠在 G₄N 治疗 (50 μ l, PBS 中的浓度为 200mg/ml) 8 天后再接受 M₄N 治疗 8 天。在肿瘤的几个区域进行注射。小鼠在注射前给予乙醚或甲氧氟烷进行麻醉。

[0112] 表 2. M₄N 和 G₄N 对含有多个肿瘤小鼠中的病变组织生长的影响

[0113]

小鼠 #	治疗时间 天数 1-16	病变组织大小 (mm)		切除病变组织的 Wt. (g)		体重 (g)	
		第 1 天	第 7 天	治疗 *	未治疗 **	第 1 天	第 24 天
9	M ₄ N	1.3×5×0.75	7×9×8	0.25	0.6	20.2	17.9
10	M ₄ N	2.3×2.5×2.3	9.5×10×9	0.1	2.9	17.5	22.1
12	M ₄ N	2.5×2.5×2.5	8×9×6	0.11	1.82	17.8	20.0
	天数 1-9 天数 10-18					17	20.2
20	M ₄ N G ₄ N	1.8×1.8×1.8	9×10×5	0.1	0.2	17.2	20.8
24	M ₄ N G ₄ N	—	7×9×6	0	1.7	19.3	20.6
26	M ₄ N G ₄ N	5×3.3×2.5	7×7×7	0.2	1.9		

[0114] *DMSO 中的药物直接注射至肿瘤区

[0115] ** 从邻近肿瘤获得药物

[0116] 表 3 小鼠中 G₄N 的毒性研究

[0117]

	组	# 小鼠数目	给药途径	每天治疗次数	注射天数	死亡率
1	187.5mg/kg	3	皮下	2×	6	0/3
2	375mg/kg	3	皮下	1×	6	0/3
3	750mg/kg	4	皮下	1×	6	1/4
4	375mg/kg	2	IV	2×	6	0/2

[0118] 来自 NCI 的 C57BL-16NCR 雌性小鼠用于该实验中。

[0119] 每天制备新鲜的四甘氨酸基 NDGA (G₄N) PBS 溶液,其浓度为 75mg/ml。组 1 每次注射 0.05ml,组 2 和组 4 每次注射 0.1ml,组 3 注射 0.2ml,注射 6 天。试验持续了 7 天。在注射六天前称量体重。试验期间,体重无显著变化。

[0120] 所有治疗的小鼠,对照小鼠 (小鼠编号 1-4) 和试验小鼠 (小鼠编号 6,7,9,10,11,12,14,15,16,17 给予 M₄N,编号 18-22,24,26-29 给予 M₄N/G₄N) 都呈现肿胀。用带表卡尺测量病变大小。一些小鼠由于注射而出血。

[0121] 治疗方案和结果如下:

[0122] 第 10 天:再次称重小鼠。所有小鼠体重增加 2 克。

[0123] 第 12 天:没作治疗。

[0124] 第 13 天:所有小鼠皮肤鼓起,但程度不同。一只 M₄N 治疗后的小鼠 (#7) 的皮肤剥离,“干状肿瘤”从中脱离。

[0125] 第 14 天:注射量增加至 100 μ l。

[0126] 第 15 天:由于麻醉过量而使其中一只 M₄N 治疗的小鼠 (#17) 死亡。#17 小鼠病变部位处的皮肤裂开,“干状肿瘤”显露出来。将病变组织切除并称重。

[0127] 第 16 天:4 只更大剂量 M₄N 治疗的小鼠 (#6,14,15,16),三只 M₄N/G₄N 治疗的小鼠 (#19,21,28) 和一只对照小鼠 (#2) 处以安乐死,然后切除、称重。其余对照小鼠 (#1,3,4) 没有进行侵入性检测,其带有肿瘤。

[0128] 第 21 天:用带表卡尺测量对照小鼠的肿瘤大小。

[0129] 观察:小鼠 #10 和 #12 (M₄N 治疗区) 的病变部位处的皮肤裂开,“干状肿瘤”显露出来。

[0130] 第 24 天:小鼠 #7 皮肤完全恢复。实验于今日结束。所有 M₄N 治疗后的存活小鼠 (#7,9,10,11,12) 和 M₄N/G₄N 治疗后小鼠 (#18,20,24,26,29) 都处以安乐死,切除、检测和称重。

[0131] M₄N 和 M₄N/G₄N 对于小鼠 C3 肿瘤生长的作用在表 1 和 2 以及图 5 和 6 中给予总结。

表 1 显示药物对于只带有单个肿瘤的小鼠 C3 细胞生长的影响。对照组四个切除的肿瘤平均重量为 1.48g, 而 M_4N 治疗后和 M_4N/G_4N 治疗后的小鼠病变组织重量分别为 0.142 和 0.51g。药物治疗后的病变组织主要由干状坏死细胞组成 (图 6)。对照组肿瘤表现出同质性, 且包含具有活性的生长细胞。表 2 显示了药物对于带有多种肿瘤的小鼠中的 C3 肿瘤生长的影响。在该研究中, 药物被注射至其中一个肿瘤中。未治疗的肿瘤平均重量为 1.77g, 而 M_4N 治疗的病变组织重量为 0.15g。经 M_4N/G_4N 注射后得到相似的结果, 未经治疗的肿瘤平均重量为 1.27g, 而药物治疗后的病变组织的平均重量只有 0.103g。在整个实验期间, 所有小鼠的体重变化不显著 (表 1 和 2)。

[0132] 实施例 6

[0133] 两组小鼠中经药物处理 (M_4N) 和 DMSO 溶剂处理或未经处理的肿瘤 (CON) 经过组织病理学检查。切除的肿瘤立即被固定, 然后保存在磷酸缓冲盐的 4% 甲醛溶液中。然后将组织通过一系列级别的乙醇和二甲苯脱水, 用石蜡固定。将石蜡组织块制成薄片, 并用苏木精和曙红进行染色用于显微观察。组织病理学研究表明 DMSO 处理的对照组肿瘤未受影响, 仍继续生长。其显示了高程度的核/质比, 多晶核变化, 高有丝分裂形状, 像肉瘤形状的纺锤体, 和浸润至周围组织的癌细胞特征。相反, 在开始接受 M_4N 处理后不久, 肿瘤即停止生长。表明肿瘤有显著的坏死并且不再具有存活的能力。高倍数放大下能看到少量的药物沉积物, 而且焦点区域显示慢性炎症和纤维化。该治愈作用导致死亡的肿瘤细胞从病变区脱落。用 M_4N/G_4N 处理的结果与单独 M_4N 处理的结果相同。然而, 由于 G_4N 是水溶性的, 其比 M_4N 扩散至肿瘤的更大面积。预计将 G_4N 与 M_4N 协同使用在治疗大尺寸的肿瘤中会更有效 (即, 大于 2cm^3)。

[0134] 实施例 7

[0135] M_4N 对于几内亚猪的 HSV-1 皮肤感染的作用

[0136] 将药物 M_4N 用于几内亚猪皮肤感染 HSV-1 的病毒复制抑制作用实验。将几内亚猪皮肤用针刺破, 局部用 HSV-1 使每个刺破区域受到感染。每天使其感染达 6 天后, 将 M_4N 用于被感染区域。

[0137] 将几内亚猪裸露的背部皮肤的六个区域用 5 = DIN 针进行灭菌穿孔。两个区域接受 HSV-1 (HSV-C, 培养物上清液, 或盐水中分离出的 HSV, HSV-SC) 的感染。其它 4 个区域接受 HSV-SC 感染。感染后的 15 分钟, 将 $30\mu\text{l}$ 实验用化合物 (DMSO 中 60mg/ml 的 $ABDS_1$, $ABDS_2$, ACV 和 $M_4N(4N)$) 用于每个穿孔的被感染区域, 每天操作 5 次, 共进行六天。 $ABDS_1$ 和 $ABDS_2$ 作为阴性对照。图 8 的照片是第 6 天拍摄的, 其显示了在不给予药物 (HSV-C, HSV-SC), 在给予无效药物 (HSV- $ABDS_1$, HSV- $ABDS_2$) 以及在给予有效药物 (HSV- M_4N 和 HSV-ACV) 的情况下 HSV-1 的复制程度。可以看到, 在经 HSV-C, HSV-SC, HSV- $ABDS_1$, HSV- $ABDS_2$ 处理的皮肤有 6 个大面积汇合的水泡, 而经 $M_4N(4N)$ 和 ACV 处理的被感染区域则没有水泡形成。该模型体系得到的明确结果是 M_4N 能够阻止 HSV 复制, 表现为皮肤病变消失且经药物处理 4 天后无病毒脱落。最初的动物研究还显示了当 M_4N 经腹腔内给药且浓度高达 300mg/kg, 以及皮下或静脉给药浓度高达 375mg/kg 时对小鼠都无毒性作用 (Table3) (6)。

[0138] 实施例 8

[0139] M_4N 原位注射的临床治疗

[0140] 将 M_4N 直接施用于肿瘤内的药物传输途径具有几个显著的优势。1) M_4N 是一种疏水

化合物,易溶于 DMSO 中 (200mg/ml)。因此,只需要注射少量的药物溶液即可以达到有效的药物剂量。在实施例 5 中描述的小鼠研究中,每日注射 50 μ l 至 100 μ l 达数日足以完全使小鼠中的肿瘤停止生长。从前对于使用大剂量 DMSO 治疗疾病也进行了一些研究 (每次治疗静脉给药 30ml) (21)。实验结果没有得出结论 (22)。然而,由于过去世界范围的上千万人已经安全的经受了大量的 DMSO 的实验, DMSO 在少量使用时应该是安全的药物传输媒介 (23)。2) 通过原位注射,大部分药物残余物保持未溶状态并集中在肿瘤区域,而不会进入循环系统,从而可以避免全身毒性。此外,由于有足够的药物保留在肿瘤内以抑制其生长,则在几次治疗后无需继续注射药物。在实施例 5 的小鼠研究中,甚至在停止注射 M_4N 后,肿瘤细胞继续死亡。因此当直接靶向给药时,肿瘤大小则成为给药剂量的决定因素。人的体重与小鼠体重的差别则无相关性。在小鼠肿瘤研究中,每天给药 20mg,给药 10 天,则足以消除肿瘤。对于治疗大小为 (1-1.5 cm^3) 的人类肿瘤,则无须使用更高剂量。这将减小用人类作试验的高风险。

[0141] 实施例 9

[0142] 用 M_4N 处理细胞以阻止细胞增殖

[0143] 我们前面对于 M_4N 的研究表明了 M_4N 通过使 Sp1- 依赖性启动子失活 可以抑制病毒转录。很多哺乳动物细胞周期基因也包含基本的 Sp1 启动子, M_4N 也因此能够阻止其转录。该假设通过 M_4N 对于多种细胞系的抗增殖作用而得以验证。低浓度 (10 μ M) 的母体化合物, NDGA, 先前即显示了诱导哺乳动物细胞凋亡的作用 (24)。然而, 该作用能够通过加大儿茶酚的一个氧原子位阻或在 NDGA 上加成亲水基团 (25) 而受到阻止。在 HPV-16/ras 转染的 C3 细胞系培养实验中, 通过增加 NDGA 衍生物 M_4N 的量来确定所需的最佳增殖抑制浓度 (26) (Figure 9a)。细胞对于 M_4N 的响应良好, 72 小时后, 在浓度范围 40 至 60 μ M 时细胞停止分裂。保持该浓度的三天后, 细胞数目与开始用药物处理时的细胞数目相等 (第 0 天, Fig9)。在更低的浓度时, 细胞生长减少得更少, 而在浓度大于 60 μ M 时可以看到一些细胞死亡的现象。

[0144] M_4N 对于 C3 细胞系的抗增殖作用不仅仅是由于药物使 Sp1- 依赖性 HPV-16E6/E7 致癌基因启动子失活, 在 HPV-16 转染的 TC-1 细胞系中, 其 E6/E7 致癌基因是由非 -Sp1 依赖性逆转录病毒启动子所控制 (27), 同样也观察到生长抑制现象 (Figure 9d)。此外, C33a 细胞系的生长 (图 9c)、HPV- 阴性人类宫颈癌细胞系和 CEM-T4 系 (图 9b)、人类白血病细胞系 (28), 通过 M_4N 的处理也都受到阻碍。在该四种用药物处理的细胞系中, 直至 M_4N 浓度超过一阈值 (对于 C3 细胞为 60 μ M, 对于 TC-1 细胞为 40 μ M 等) 时, 几乎所有 (>95%) 停止生长的细胞都是存活的。高于该浓度以上, 存活细胞的百分数则急剧下降。而停止生长的细胞在长时间的药物处理后仍有 >95% 的细胞是存活的。C3 细胞在用 40 μ M 的 M_4N 处理 8 天后, 死亡的细胞数仍没有增加 (图 9e)。

[0145] 实施例 10

[0146] 用 M_4N 处理的细胞停止于 G2 期

[0147] 一旦建立用 M_4N 处理使细胞停止增殖, 但仍使细胞存活的实验后, 则可以使用细胞的 DNA 含量分析和细胞结构的荧光测试来确定细胞停止生长的周期点。将细胞用 M_4N 处理达 72 小时, 与对照细胞相比, 显示出 G2/M DNA 含量增加 (图 10a-d)。最极端的响应可以从 C3 和 CEMT4 细胞系中观察到, 其中 >90% 的细胞显示了 G2/M DNA 含量。

[0148] 为了区别是在 G2 期还是在有丝分裂阻抑期停止,将抗 α 微管的抗体(绿色)和抗 γ 微管的抗体(红色)用于确定 M_4N 处理 72 小时后的 C3 细胞系的中心体状态。如图 11a 所示, M_4N 处理的细胞中心体被复制,但仍在细胞核附近彼此相邻。由于在前期的早期中心体分离,因此可以断定这些细胞还没有开始有丝分裂。相反,对照细胞染色的 γ 微管具有 G1 或 S 期的辐射状特征(29)。用 DAPI 染色还观察到 M_4N 处理后的细胞中缺少染色质浓缩(图 12b),这是细胞没有从 G2 期继续发展的另一证据(30)。

[0149] 实施例 11

[0150] 40 μM M_4N 抑制了 CDC2 的生成

[0151] 由于细胞自 G2 之后的进程依赖于 MPF 的生成,对于 40 μM M_4N 处理的 C3 细胞中的蛋白质组成状态进行了检测。不同步的细胞在含有 M_4N 的 1% DMSO、或只有 1% DMSO 的介质中生长 24 个小时或 72 个小时。收集细胞,用 western 印迹分析相同量的总细胞蛋白。用 M_4N 处理 72 小时的细胞 CDC2 数量显著下降(图 12a)。然而,通过脱膜和重复探测相同膜进行检测,细胞周期蛋白 B 的水平没有改变。这些结果表明,在这些条件下细胞生长的停止不可能是响应 p53 的结果,因为 p53 的过度表达会导致细胞周期蛋白 B 的减少(31,32)。与 western 印迹分析结果相一致, CDC2 激酶在 M_4N 处理 72 小时后而失活(图 12a)。这些试验支持了一个观点,即药物是通过抑制 CDC2 蛋白的合成,导致 MPF 失活而起作用。

[0152] 我们在前的研究表明 M_4N 阻止 Sp1- 依赖性病毒转录的能力提示了 CDC2mRNA 水平的降低可能是 CDC2 蛋白质减少的机理。这与一个发现相一致,即基因表达时不需要 Sp1 的细胞周期蛋白 B 以正常水平合成;而基因启动子上具有两个必要的 Sp1 位点的 CDC2 蛋白,其数量显著减少。为了证明该假设,对 40 μM M_4N 处理 5 至 72 个小时的 C3 细胞中收集到的 RNA 进行了 northern 印迹分析。如图 12b 所示,在 M_4N 仅处理 24 小时后, CDC2mRNA 的数量就减少了,而在 72 小时后则几乎消失。非 -Sp1 调控的看家基因 GAPDH 的合成被用作承载 RNA 的对照(RNA loading control),其水平不受 40 μM M_4N 的影响。

[0153] 采用 C3 细胞系使我们得到了一种用于分析 M_4N 介导细胞周期停止的机理的另外的对照,因为其它 Sp1- 依赖性基因启动子也可能受到 M_4N 的抑制。这种可能性是通过 M_4N 对于 C3 细胞中 Sp1 依赖性 HPV-16 E6/E7 启动子转录的抑制作用进行检测的。对 40 μM M_4N 处理 5 至 72 小时的 C3 细胞中分离得到的 RNA 进行 rtPCR 分析,显示 E7 转录物水平明显减少(图 12c)。GAPDH 被再次用作本试验的内部对照,其水平不受药物处理的影响。这些结果为 M_4N 减少了 Sp1 调控的启动子的转录物提供了证据。

[0154] 实施例 12

[0155] 凝胶迁移率分析中 G_4N 对于 Sp1- 结合活性的抑制

[0156] Sp1 家族蛋白诱导在 DNA 大沟处的结合(33)。Sp1 蛋白的锌指区域负责 GC 框序列 5' -GGGGCGGG-3' 的结合。根据计算机分析,可以确定 G_4N 作为 NDGA 的氨基酯衍生物,能够与大沟处的序列形成稳定的复合物。为了确定 G_4N 是否能作为 Sp1 阻止剂以及 Sp1 替代物,我们通过凝胶迁移率分析,在存在 G_4N 或不存在 G_4N 时,仅对 Sp1 的 DNB 结合域进行 p1/ 增强子相互作用的研究。在阻止实验中,首先将不同浓度的 G_4N 与 ^{32}P - 标记的 DNA 在结合缓冲液中,于 25°C 培养 30 分钟。然后加入重组 Sp1 蛋白(Sp1-167D)的 DNA 结合域,并在过量 BSA 蛋白下继续培养 30 分钟。在替代研究中,先使重组 SP1-167D 与 DNA 结合,然后在培养的第二步加入 G_4N 。 G_4N 和 Sp1-167D 的浓度以及培养和凝胶电泳条件在两个研究中都

相同（实验部分）。如图 13 所示，在任一项研究中可以看到 G_4N 能够使 DNA 不与 Sp1-167D 蛋白相互作用。当只测试 Sp1 的 DNA 结合域时，凝胶迁移率分析显示 G_4N 表现出比阻止 Sp1 结合增强子更有效的替代结合 Sp1 的作用（图 13, A, B, D）。我们也已经检验了结合的 G_4N 是否能够被 Sp1-167D 所替代。在该项研究中， G_4N 抑制 Sp1-167D 的结合作用首先通过迁移率分析而得（图 13C, 泳道 2 和 5）。当 G_4N 结合的模板被其它 Sp1-167D 所替代，我们观察到 Sp1-167D/DNA 复合物带强度是剂量依赖性增强的（图 6C, 带 6, 7），表明 Sp1-167D 替代了模板上的 G_4N 。

[0157] 实施例 13

[0158] G_4N 对于 Sp1 调控的 Tat- 反式激活的 HIV 启动子活性的抑制作用

[0159] 如从前所报导的，甲基化的 NDGA 衍生物能够阻止 Sp1 与多种病毒启动子的增强子位点结合，包括 HIV，HSV 的 ICP4，HPV 的 E6/E7 基因的启动子（8, 9, 10）。我们通过如前所述的 SEAP 实验进一步验证了 G_4N 对于 Cos 细胞中的 HIV 启动子的 Tat- 反式激活活性。Cos 细胞中几乎检测不到 HIVLTR 驱动的 SEAP 表达的基本水平。当 Cos 细胞与 CMV 启动子驱动的 Tat 基因共转染时，则存在 60 倍或更多的 SEAP 表达（8）。这种 Tat- 驱动式 HIVLTR 启动子活性的反式激活从前显示是受 Sp1 调控的（7, 8）。在 G_4N 的存在下，我们观察到 HIV 反式激活的抑制是剂量依赖的方式（图 14）。 G_4N 的平均 IC_{50} 值 $36 \mu M$ 可与 3-O- 甲基 NDGA, Ma1. 4 ($IC_{50} 25 \mu M$) 相比，并高于四甲基 NDGA, M_4N ($IC_{50} 11 \mu M$)。这种差别可能是由于测试化合物的化学性质影响了细胞对药物的摄取。

[0160] 实施例 14

[0161] G_4N 对于 SIV-1 和 HIV-1 在细胞培养物中合成的抑制作用

[0162] HIV-1 和 SIV 都是逆转录病毒，需要整合到宿主染色体中以完成复制。二者都依赖宿主转录因子进行原病毒转录。Sp1 在这两种病毒的表达中起关键作用，这两种病毒享有几乎相同的转录调控方式。我们已经研究并比较了 G_4N 对于 174x CEM 细胞中的 SIV 与 H9 细胞中的 HIV 的抑制作用，使用了 SIV 感染的恒河猴作为动物模型以测试 G_4N 的抗病毒效果。也检测了 G_4N 在两种细胞系中的细胞毒性。对于 SIV 的抑制作用研究，将 10^7 174xCEM 细胞与高滴度储存液 SIVmac239 在 $37^\circ C$ 下混合两个小时，然后用冷 PBS 缓冲液冲洗两次以除去未被吸附的病毒。将细胞悬浮液等分加入 3 个 96 孔培养板中。用储存液新鲜制备各种浓度的 G_4N 溶液，然后分别等分加入至 6 个 96 孔培养板中。感染后 (P. I.)，每 4 天收集一次培养物上清液，将含有适宜药物浓度的新鲜介质在收集上清液后加入至培养物中。通过修饰的 p27 核心抗原捕获 ELISA 检测病毒的生成，如图示（图 15）。在 G_4N 的浓度超过 5CIM 时没有检测到 SIV 的生成。与无药物存在时的病毒合成相比较，当 G_4N 的浓度低于 2. 5CIM，在感染后第 4 天和第 8 天的培养物上清液中才检测到有 SIV 生成（图 15）。通过 MTT 测试法确定， G_4N ($250 \mu M$ 或更少) 对于未感染的 174xCEM 细胞显示无毒作用（34）。

[0163] 在 H9 细胞中进行了 G_4N 对 HIV-1 抑制作用的类似实验。将 H9 细胞以 $1 \times 10^5 / ml$ 浓度进行次培养，并用 HIV-1 (HIV-1RTMF) 的 AZT 耐药株感染该细胞。感染后 2 个小时后，加入不同浓度的 G_4N ，每 4 天更换新鲜介质。在 9 天的实验期间，仔细监测 G_4N 存在时的细胞生长状况。用 p24 核心抗原捕获 ELISA 检测病毒的生成。如图所示（图 16）， G_4N 浓度为 80CIM 时，H9 细胞中的 HIV 复制完全受到抑制。 G_4N 抑制 HIV-1RTMF 的 IC_{50} 为 $12 \mu M$ 。在测试范围内（低于 $250 \mu M$ ），对于未感染的 H9 细胞没有检测到毒性作用。

[0164] 实施例 15

[0165] M_4N 对于 C3 细胞中的 Survivin 基因表达的影响

[0166] 材料和方法

[0167] 细胞培养。C3 细胞在补充有 5% 胎牛血清 (GIBCO BRL) 的 Iscove's 修饰的 Dulbecco's 基质 (GIBCO BRL) 中, 保持在潮湿的孵育箱中, 于 37°C, 5% CO_2 环境中单层生长。

[0168] M_4N 处理。将 C3 细胞 (5×10^6) 接种于 150-mm 培养板中, 并使其与培养板相接触。接种后的 24 小时后, 用 PBS 清洗培养物两次, 并用溶解于 1% 的 DMSO 中的 M_4N 与生长基质相混合。

[0169] 细胞提取和免疫印迹。将细胞溶解于溶解缓冲液中, 该缓冲液含有 50mM HEPES pH7, 250mM NaCl, 0.1% (v/v) Nonidet P-40, 10% 甘油, 1mM DTT, 和鸡尾酒疗法的 50 μ l/ml 蛋白酶抑制剂 (Sigma)。提取物的蛋白质浓度采用 Bradford 测试 (Bio-Rad Laboratories), 然后用 SDS-PAGE 分离 50 μ g 的蛋白质, 并电迁移至硝基纤维素膜上 (ECL)。将膜与 Survivin 的一级抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 和凋亡酶 3 (Santa Cruz Biotechnology) 共同培养。印记再与抗兔生物素共轭的二级抗体培养, 然后与 Avidx-AP 抗生物素蛋白链菌素 - 碱磷酸酯酶培养, 用 CSPD 底物 (Tropix) 检测。

[0170] RT-PCR 分析。用硫氰酸胍盐和苯酚方法, 从分子克隆中所描述的培养细胞中分离出 mRNA (40)。采用 survivin- 义寡核苷酸引物 5' -GCATCGCCACCTTCAAGAACTGGCCC-3' 和 survivin- 反义寡核苷酸引物 5' -CGGGTAGTCTTTGCAGTCTCTTCAAATC-3' 得到一个 343- 碱基对的 RT-PCR 产物。采用 GAPDH 和反义引物 5' -GAATCTACTGGCGTCTTCACC-3' 和 5' -GTCATGAGCCCTTCCACGATGC-3' 得到 238- 碱基对的 RT-PCR 产物作为对照。在与 MMLV (Promega) 的逆转录反应后, 将 mRNA 等份物置入含有 1U 或 rRNasin 和脱氧核糖核酸酶的 20 μ l 反应缓冲液中, 在 75°C 下培养 5 分钟。将得到的 c-DNA 产物在 PCR 条件下扩增: 55°C 达 55 秒, 60°C 达 55 秒, 72°C 达 1 分钟, 进行 30 个循环。在含有溴化 3,8- 二氨基 -5- 乙基 -6- 苯基菲啶鎓的 1.8% 琼脂糖凝胶上通过电泳分离 PCR 产物, 并在 UV 下拍照。用 Scion Image 定量电泳带, 并将 survivin PCR 反应产物的信号强度正常化至 GAPDH PCR 产物的信号强度以生成 survivin 基因下调的图片。

[0171] 为了确定 C3 细胞中的 Sp1- 调控的 survivin 基因表达是否在接受 M_4N 处理后而减少, 我们用 40 μ M M_4N 处理细胞达 24 小时和 72 小时。如图 17 所示, 用 M_4N 处理的细胞导致 survivin 基因表达以时间 - 依赖性方式而显著减少。用 40 μ M M_4N 处理细胞达 24 小时和 72 小时导致 survivin 基因表达分别减少了 65% 和 80%。未接受处理的细胞, 其 survivin 基因表达未显示任何减少。

[0172] 通过免疫印迹也可以显示 Survivin 蛋白在 M_4N 处理 72 小时后出现下调。这种下调是剂量依赖性的 (图 18)。

[0173] 实施例 16

[0174] M_4N 处理诱导凋亡

[0175] 因为我们的数据显示 M_4N 导致 survivin mRNA 和蛋白质的减少, 由于 survivin 具有抗 - 凋亡功能, 我们研究了上述减少是否能够导致凋亡。如凋亡酶 -3 的免疫印迹所示 (图 19), M_4N 处理达 72 小时促使凋亡酶 -3 活化。该活化有望导致 M_4N 处理后的细胞凋亡

的增加。

[0176] 为便于参考,下面列出所参考的文献。

[0177] 1. Nurse, P., Universal Control Mechanism Regulating Onset of M-Phase. *Nature*, 344, 503-508 (1990).

[0178] 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).

[0179] 3. Dalton, S., Cell Cycle Regulation of the Human cdc2 Gene. *The EMBO Journal*, 11, 1797-1804. (1992.)

[0180] 4. Morgan, D. O., Principles of CDK Regulation. *Nature*, 374, 131-134. (1995.)

[0181] 5. Murray, A. W., Creative Blocks: Cell-cycle Checkpoints and Feedback Controls. *Nature*, 359, 599-604 (1992).

[0182] 6. Kao, G. D., M. W. G., and R. J. Muschel, p34(Cdc2) Kinase Activity Is Excluded From the Nucleus During the Radiation-induced G₂ Arrest in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.*, 274, 34779-34784 (1999).

[0183] 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).

[0184] 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,

[0185] 11239 (1995).

[0186] 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).

[0187] 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).

[0188] 11. Baba, M. Mini Review. Cellular Factors as Alternative Targets for inhibition of HIV-1. *Antiviral Res.* 33, 144i-1452 (1997).

[0189] 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.

[0190] 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.

[0191] 14. Honess, R. W., and Roizman, B. (1988) Regulation of Herpes Virus Macromolecular Synthesis. I. Cascade Regulation of Synthesis of Three Groups of Viral Proteins. J. Virol. 1974, 14, 8.

[0192] 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.

[0193] 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 myoD, C/EBP-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 HIF-1 binding at the initiation site. Mol. Cell Biol. 1990, 10, 653. Abravaya, K.; Philips, B.; Morimoto, R. I. Heat shock-induced interaction of heat shock transcription factor and human hsp70 promoter examined by in vivo footprinting. Mol. Cell Biol. 1991, 11, 586. Leask, A.; Rosenberg, M.; Vassar, R.; Fuchs, E. Regulation of a human epidermal keratin gene: Sequences and nuclear factors involved in keratinocyte-specific transcription. Gene Dev. 1990, 4, 1985. Desjardins, E.; Hay, N. Repeated CT elements bound by zinc finger proteins control the absolute and relative activities of the two principal human myc promoter. Mol. Cell Biol. 1993, 13, 5710. Sanchez, H. B.; Yieh, I.; Osborne, T. F. Cooperation by sterol regulatory element-binding proteins and Spl 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. Spl can displace GHF-1 from its distal binding site and stimulate transcription from growth hormone gene promoter. Mol. Cell Biol. 1990, 10, 1811.

[0194] 17. Phelps, W. C., Yee, C. L., Mungler, 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.

[0195] 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.

[0196] 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.

[0197] 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.

[0198] 21. Jacob, S. W. and Herschler (1986) Pharmacology of DMSO. Academic Press, Inc.

[0199] 22. Jack, C. , and Torre, de la (1983) Biological Actions and Medical Applications of Dimethyl Sulfoxide. New York Academy of Sciences, New York, N. Y.

[0200] 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.

[0201] 24. Biswal, S. S. , et al. , Glutathione Oxidation and Mitochondrial Depolarization as Mechanisms of NORDIHYDROGUAIARETIC Acid-induced Apoptosis in Lipoxxygenase-deficient F15.12 Cells. Toxicol. Sci. , 53, 77-83. (2000.)

[0202] 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).

[0203] 26. 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).

[0204] 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.)

[0205] 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).

[0206] 29. Shiebel, E. , Gamma-Tubulin Complexes: Binding to the Centrosome, Regulation and Microtubule Nucleation. Current Opinion Cellular Biology, 12, 113-118 (2000).

[0207] 30. Marsden, M. P. F. , Laemmli, U. K. , Metaphase Chromosome Structure: Evidence for a Radial Loop Model. Cell, 17, 849-858 (1979).

[0208] 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).

[0209] 32. Innocente, S. A. , et al. , p53 Regulates a G2 Checkpoint Through Cyclin B1. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 96, 2147-2152 (1999).

[0210] 33. Sjøttem, E. ; Anderson, C. ; Johansen, T. Structural and Functional Analyses of DNA Bending Induced by Sp1 Family Transcription Factors. J. Mol. Bio. , 267, 490-504 (1997).

[0211] 37.

[0212] 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-FluxScreening of Synthetic and Natural Products for AIDS-Antiviral Activity. J. Natl. Cancer Inst. ,81(8),557-586(1989).

[0213] 35. Li, F. and Altieri, D. C. , Transcriptional analysis of human su rvivin geneexpression. Biochem. J. 344,305-311(1999).

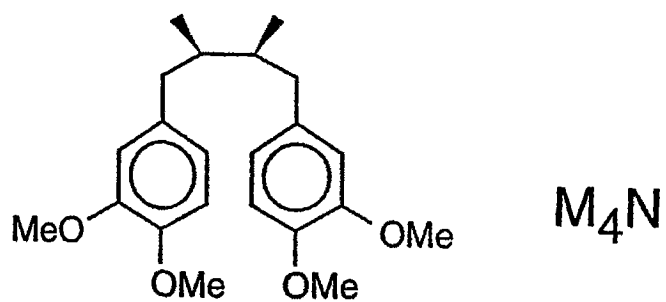
[0214] 36. Li, F. and Altieri, D. C. , The Cancer Apoptosis Survivin gene : Characterization ofLocus and Transcriptional Requirements of Basal and Cell Cycle-dependentExpression. Cancer Res. 59,3143-3151(1999).

[0215] 37. O' Connor, D. S. et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 97, 13103-13107 (2000).

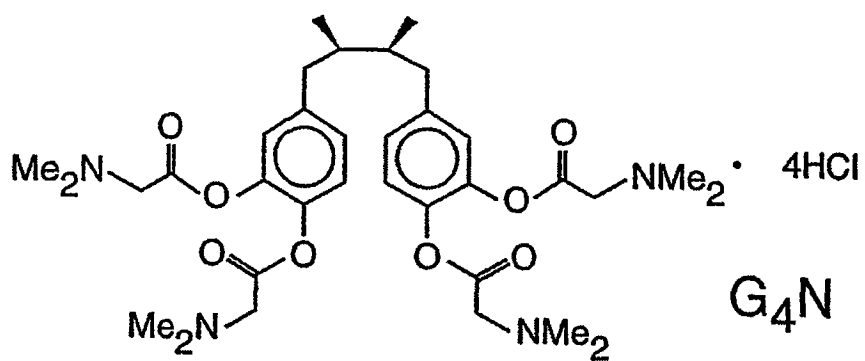
[0216] 38. Grossman, D. et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 98,635-640 (2001).

[0217] 39. Studzinski, G. P. (ed.), Apoptosis, A Practical Approach(1999), page10.

[0218] 40. Sambrook and Russell, Molecular Cloning, 3rd ed. (2001).



内消旋-1,4-双(3,4-二甲氧基苯基)
-(2R, 3S)-二甲基丁烷



内消旋-1,4-双[3,4-(二甲氨基乙酰氧基)苯基]
-(2R, 3S)-二甲基丁烷盐酸盐

图 1

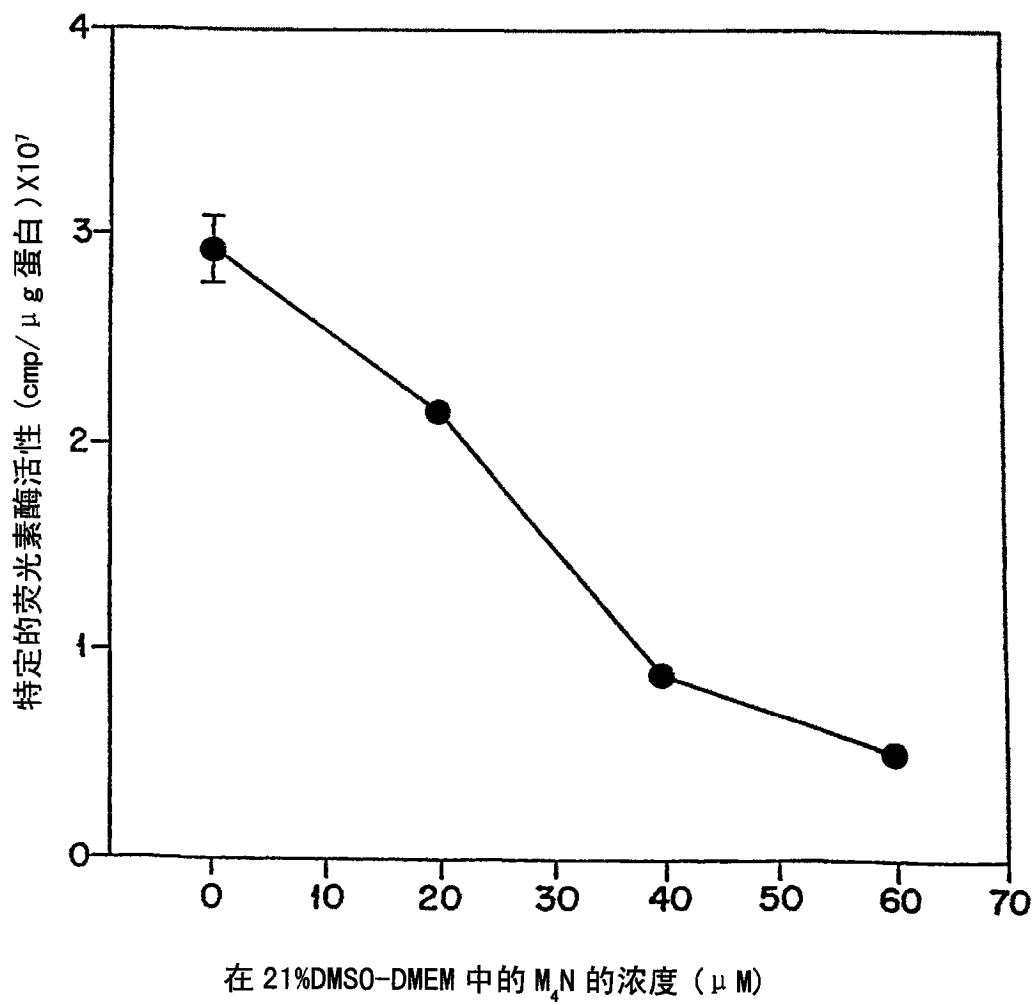
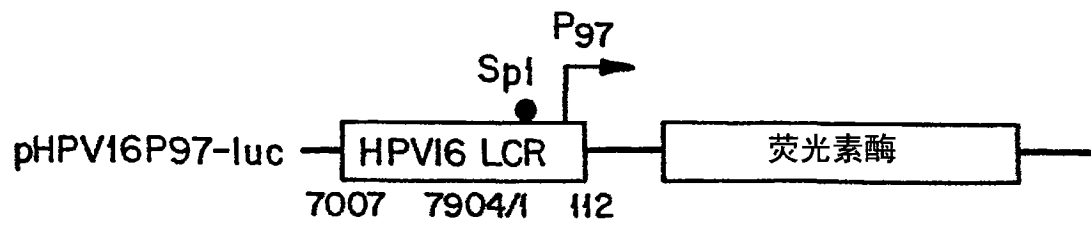


图 2

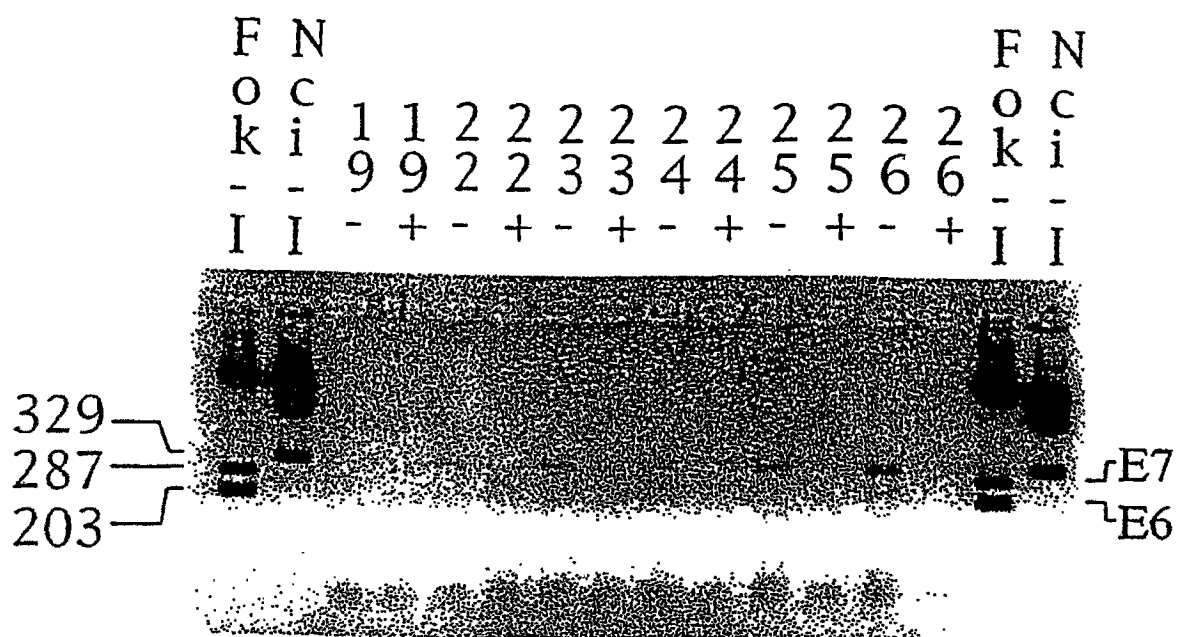


图 3A

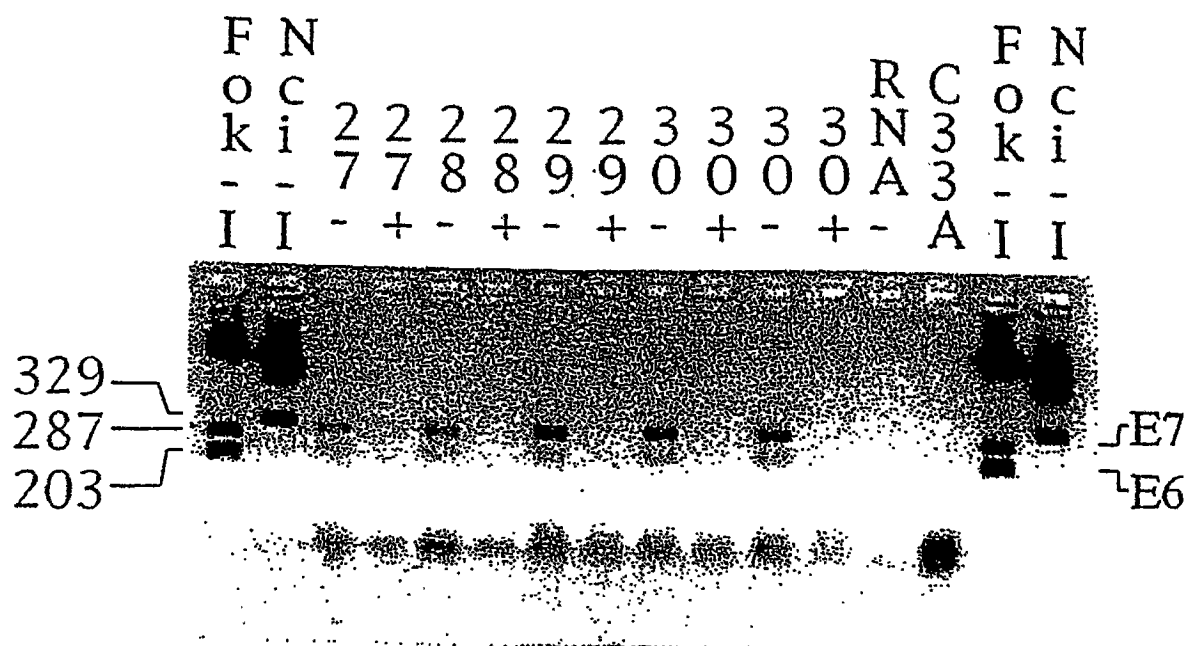


图 3B

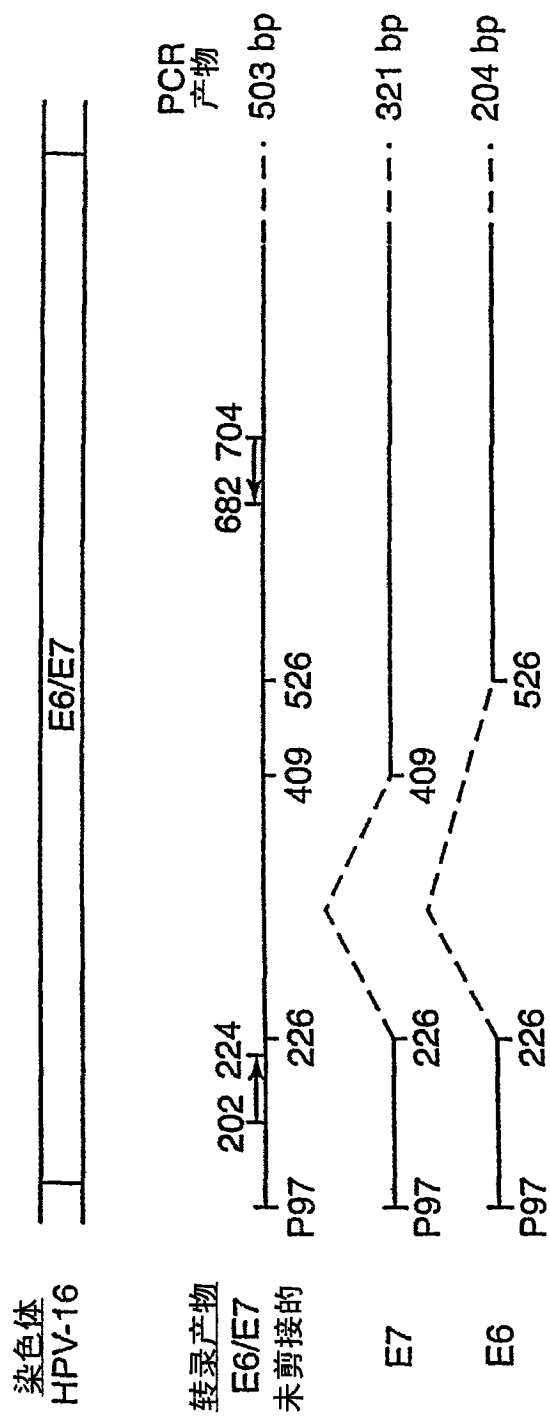


图 3C

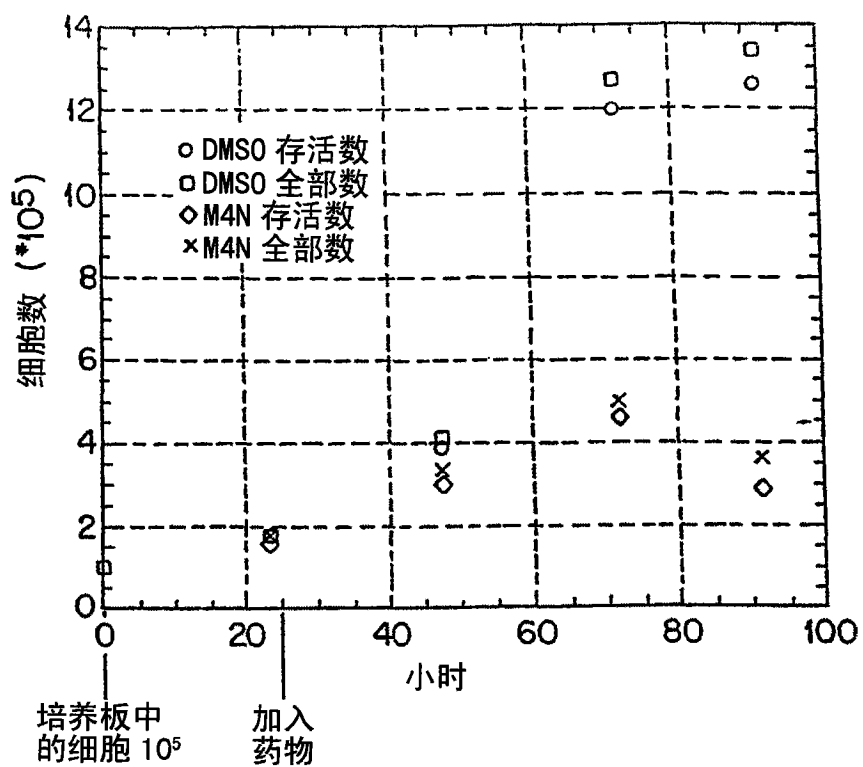


图 4A

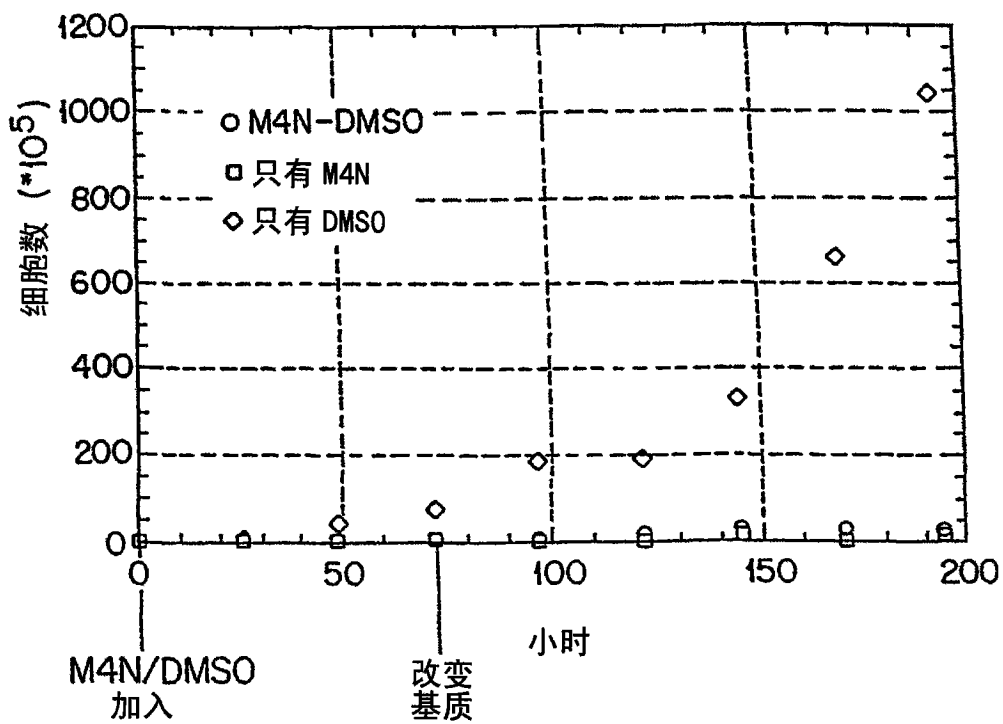


图 4B

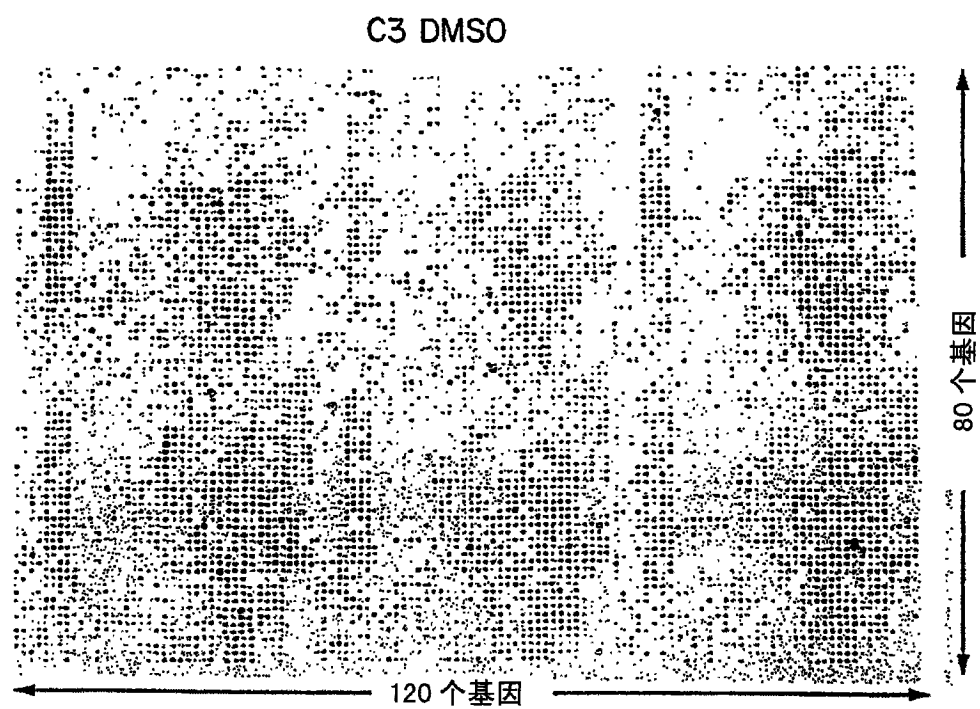


图 5A

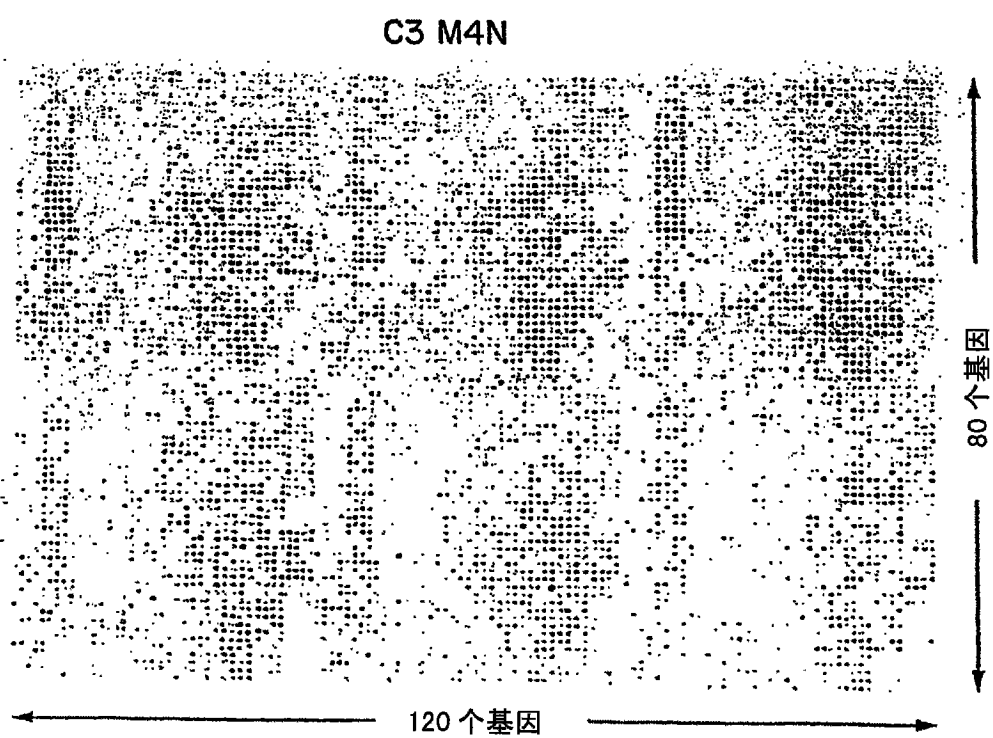


图 5B

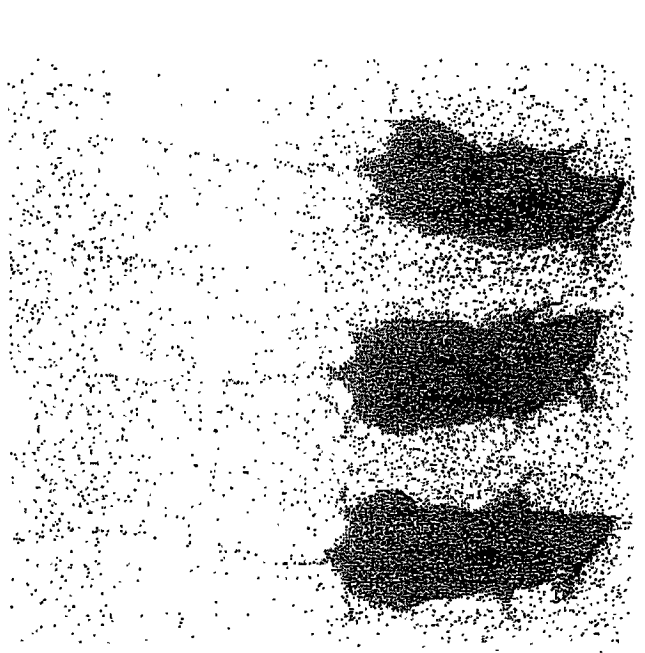
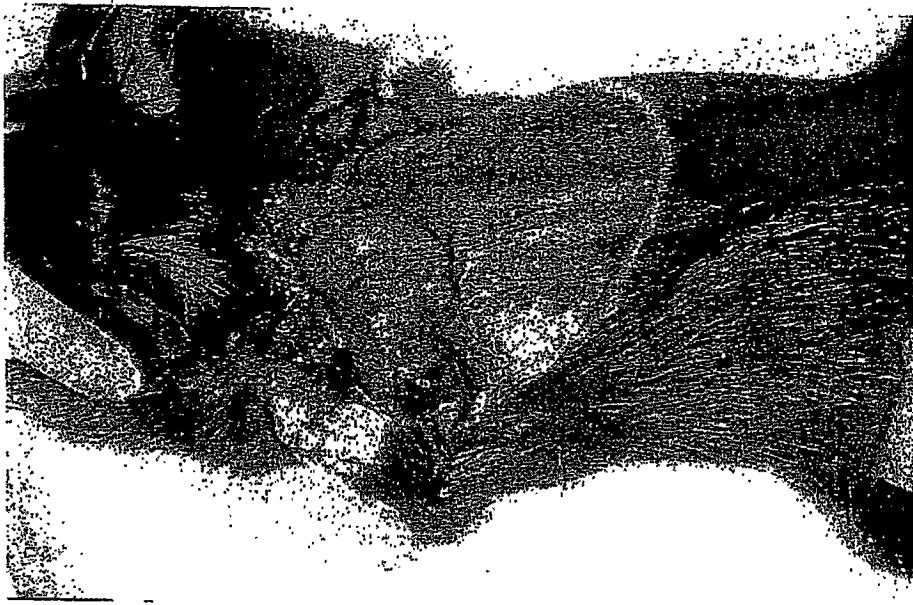


图 6

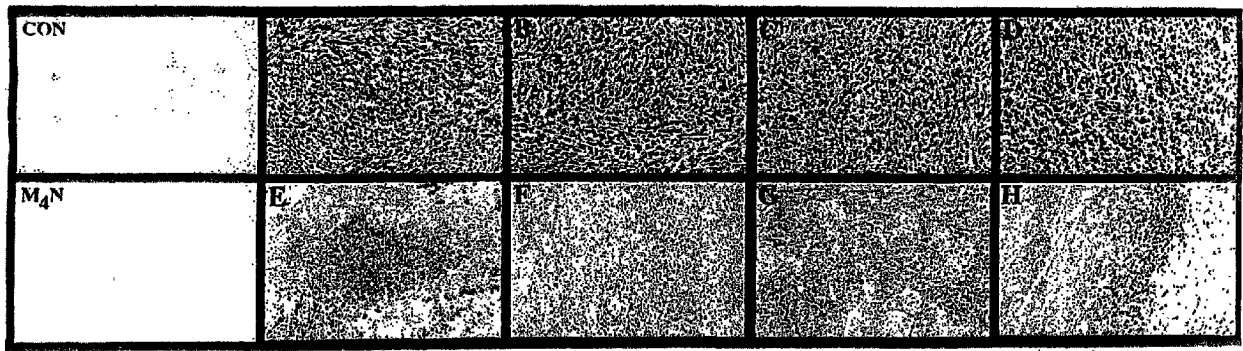


图 7

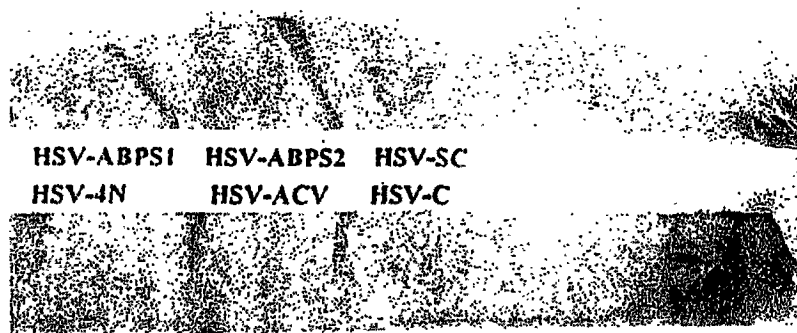


图 8

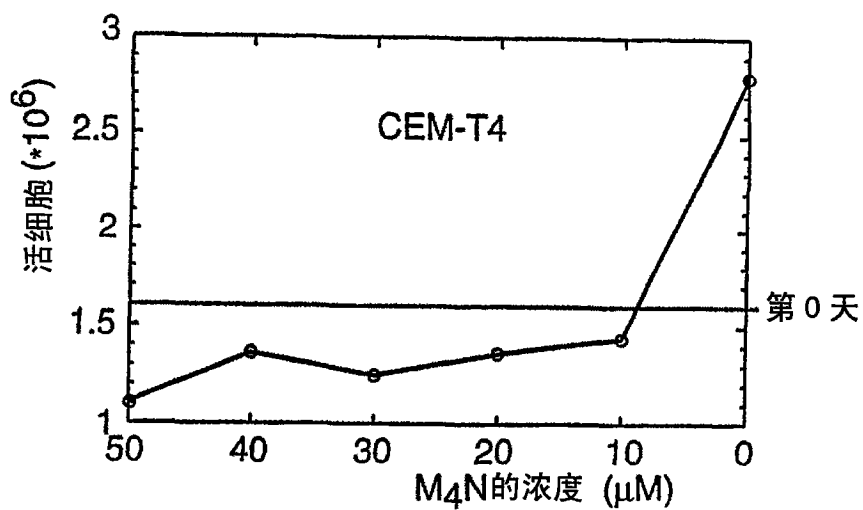


图 9B

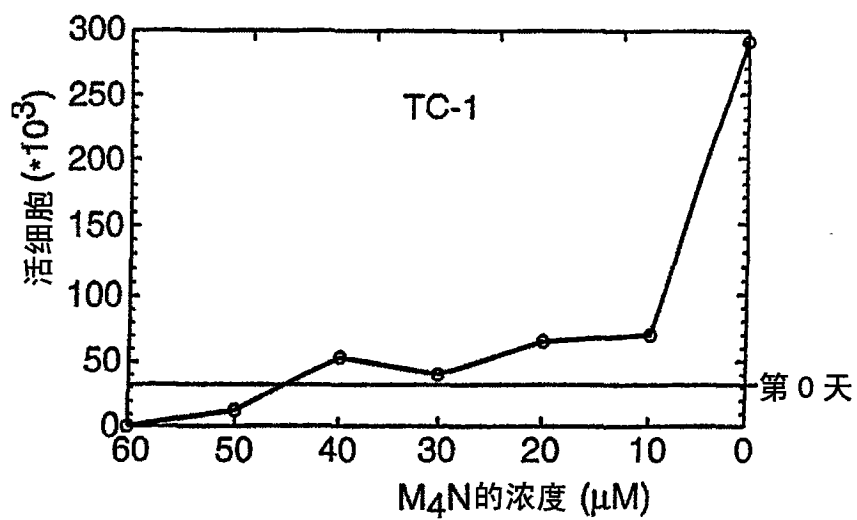


图 9D

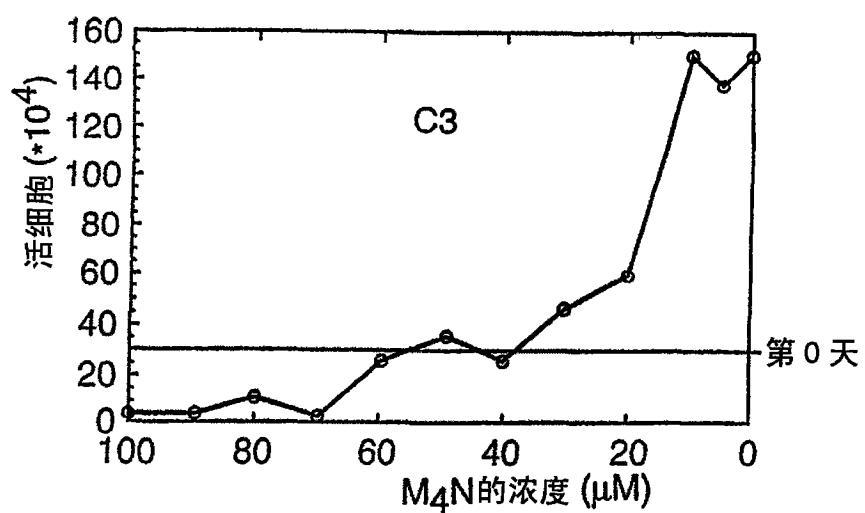


图 9A

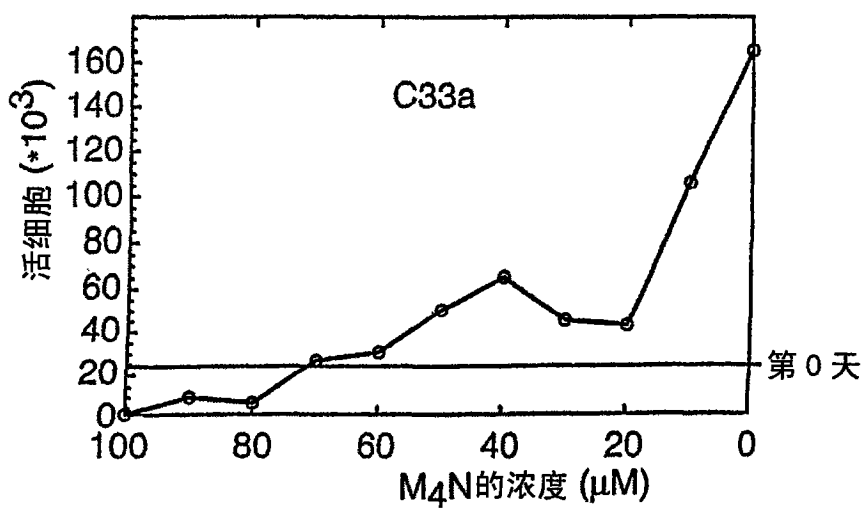


图 9C

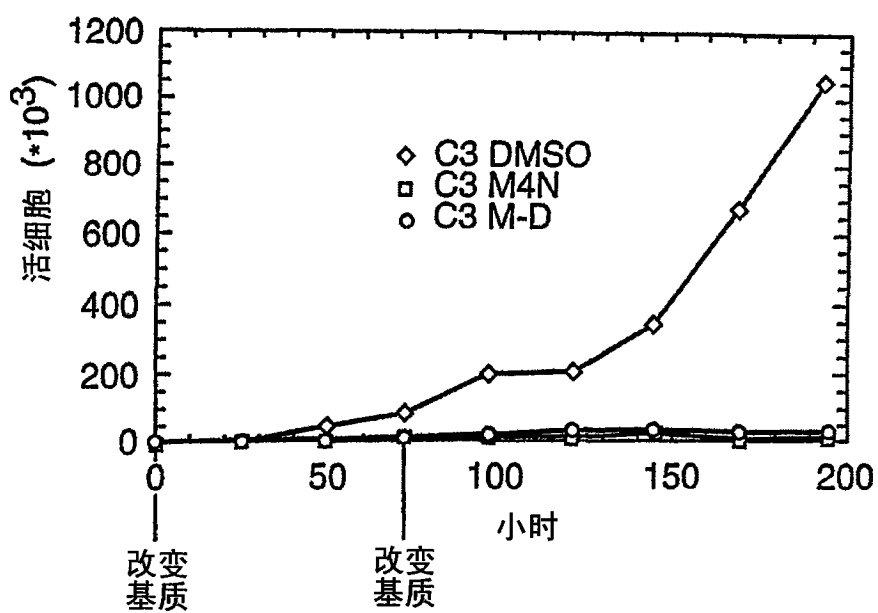


图 9E

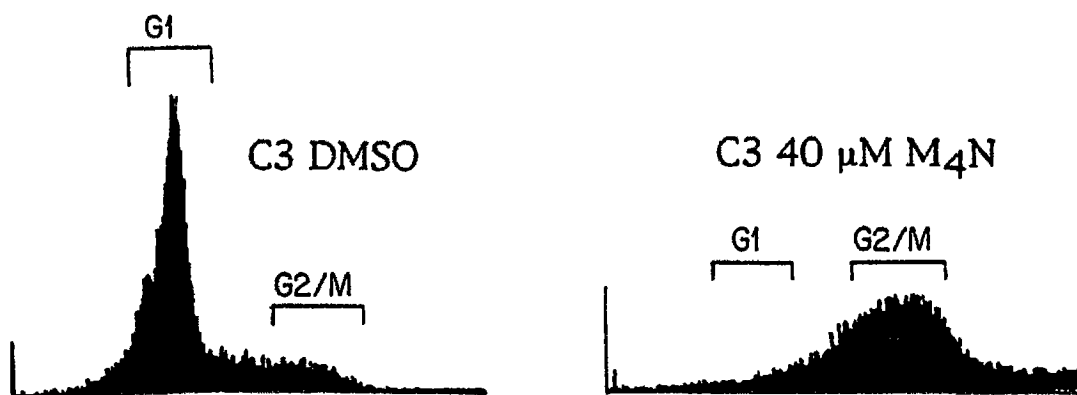


图 10A

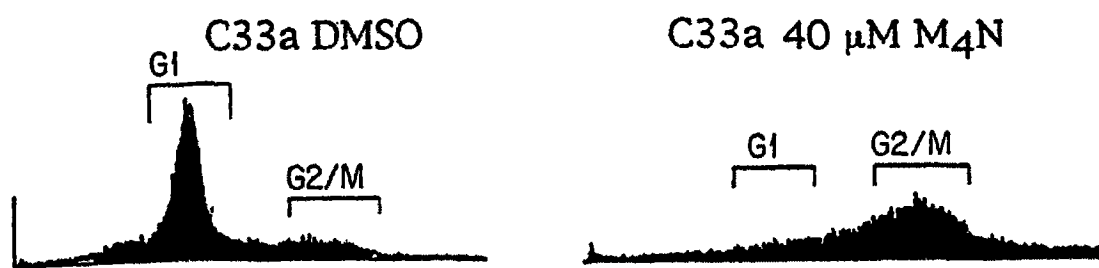


图 10B

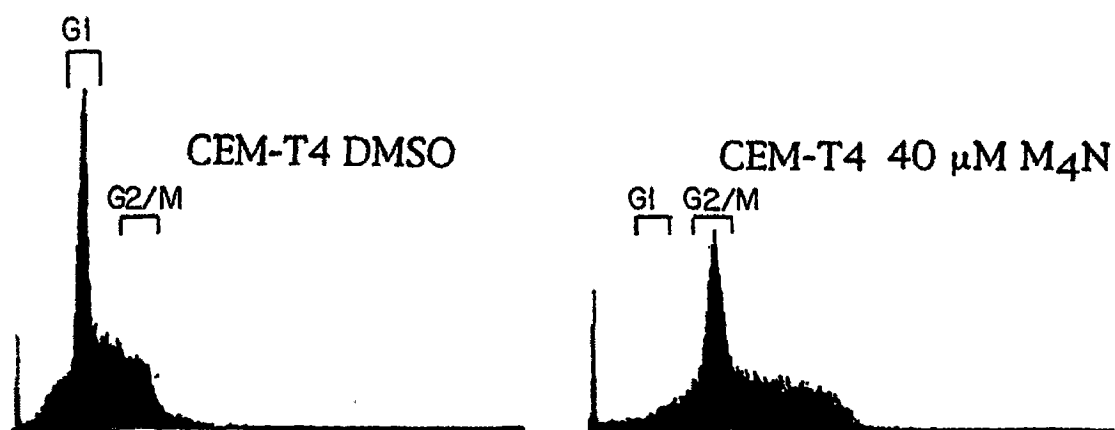


图 10C

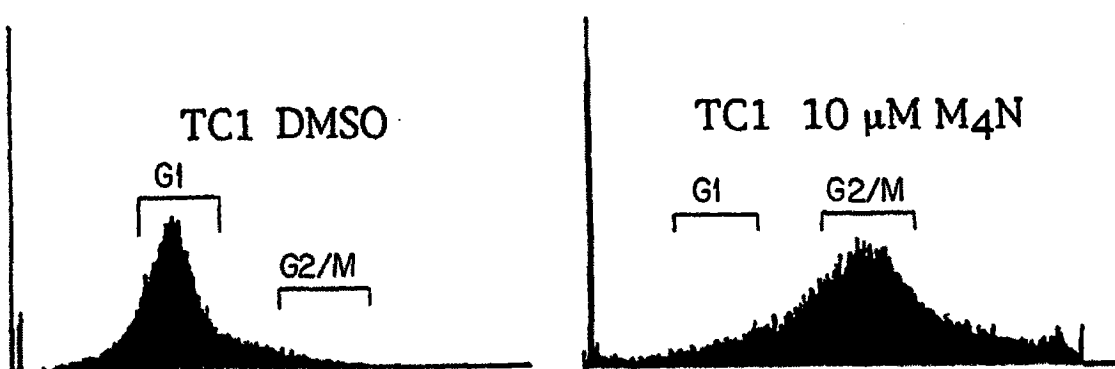


图 10D

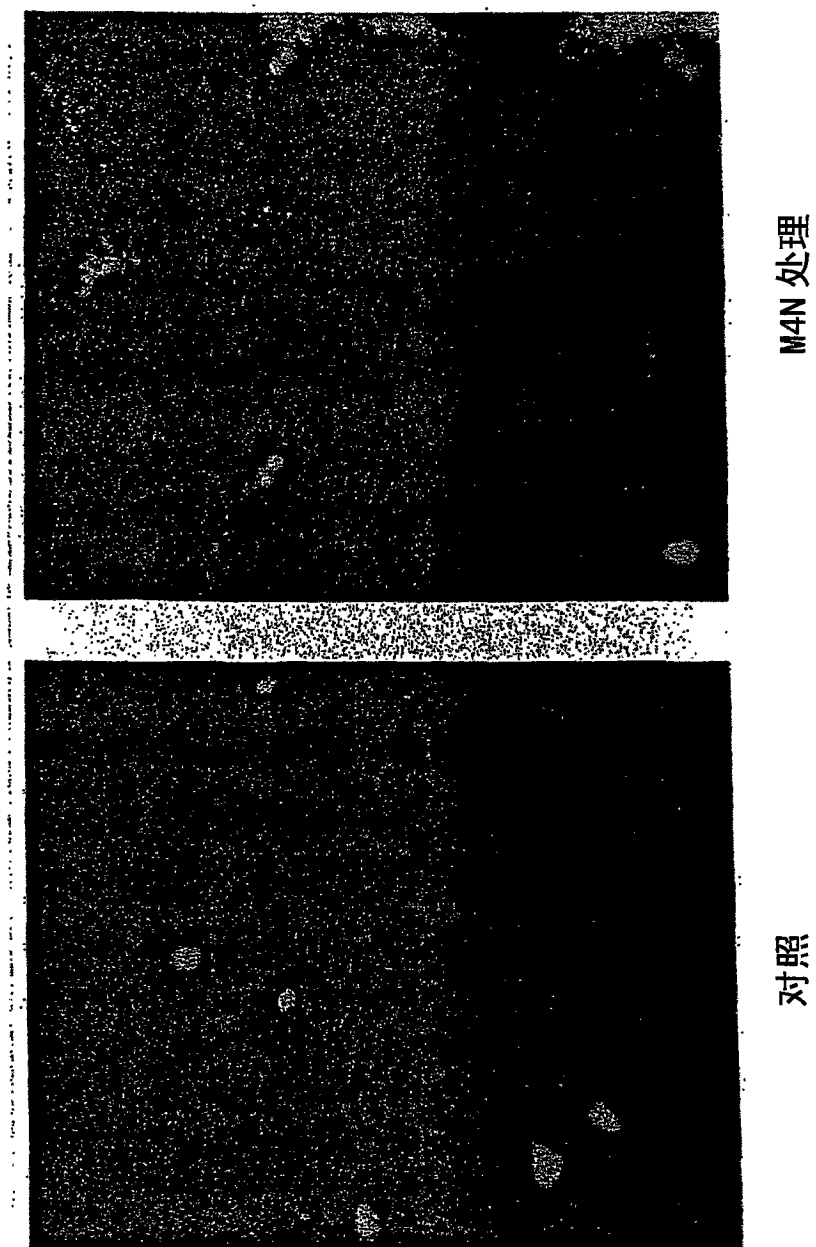
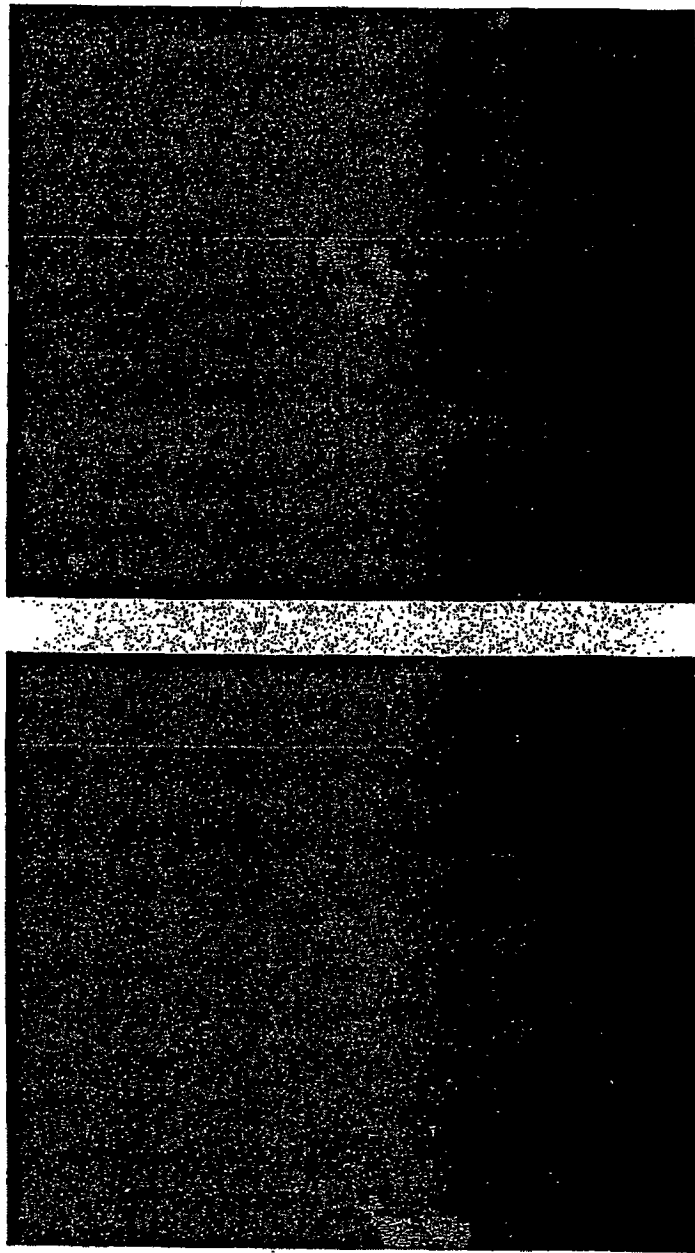


图 11A



M4N 处理

对照

图 11B

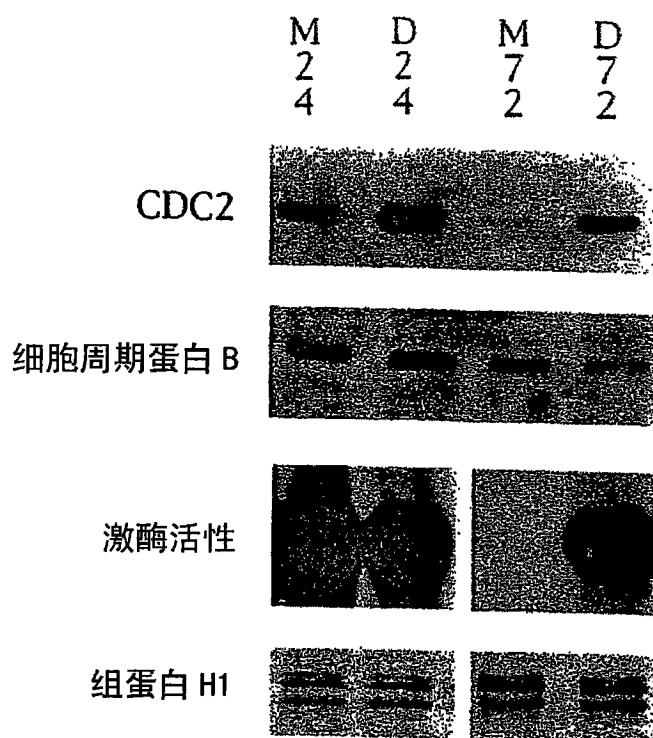


图 12A

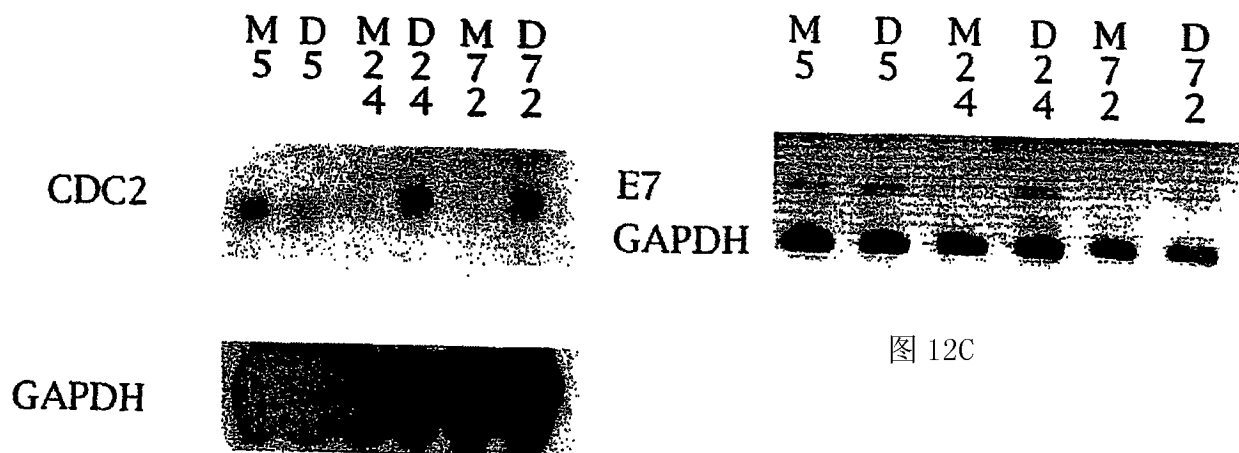


图 12C

图 12B

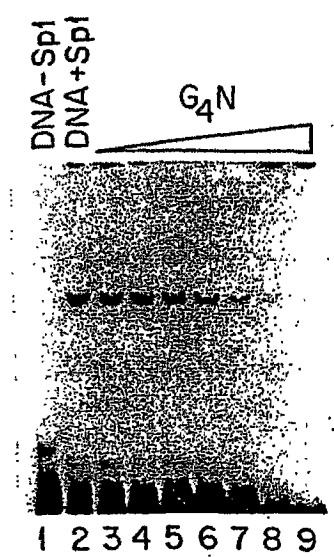


图 13A

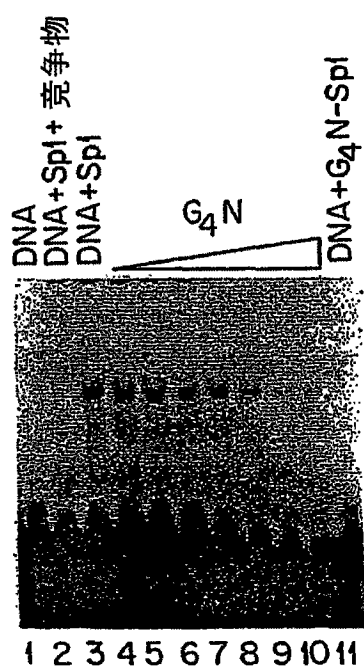


图 13B

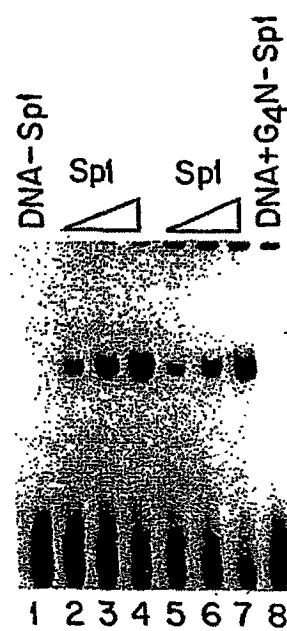


图 13C

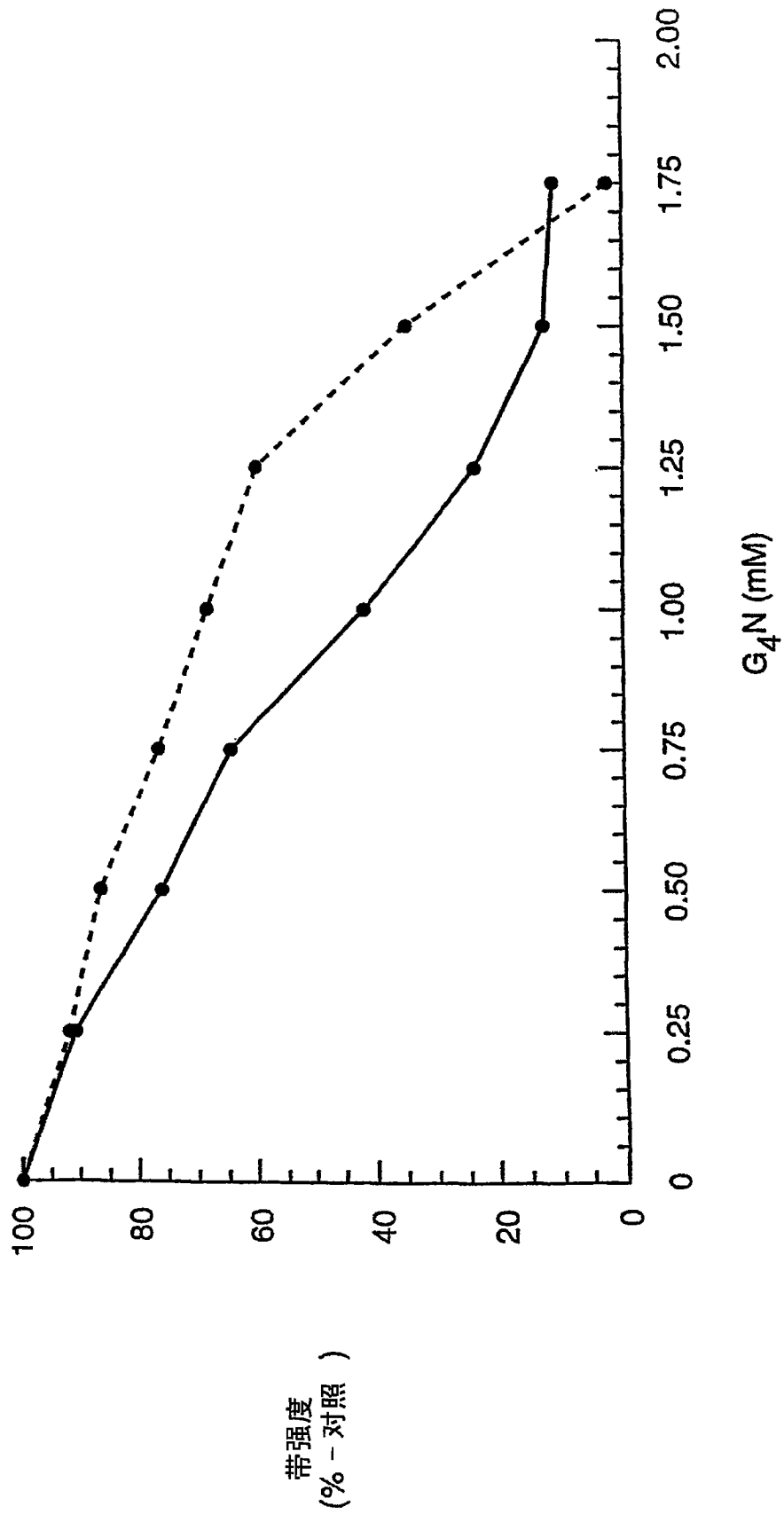


图 13D

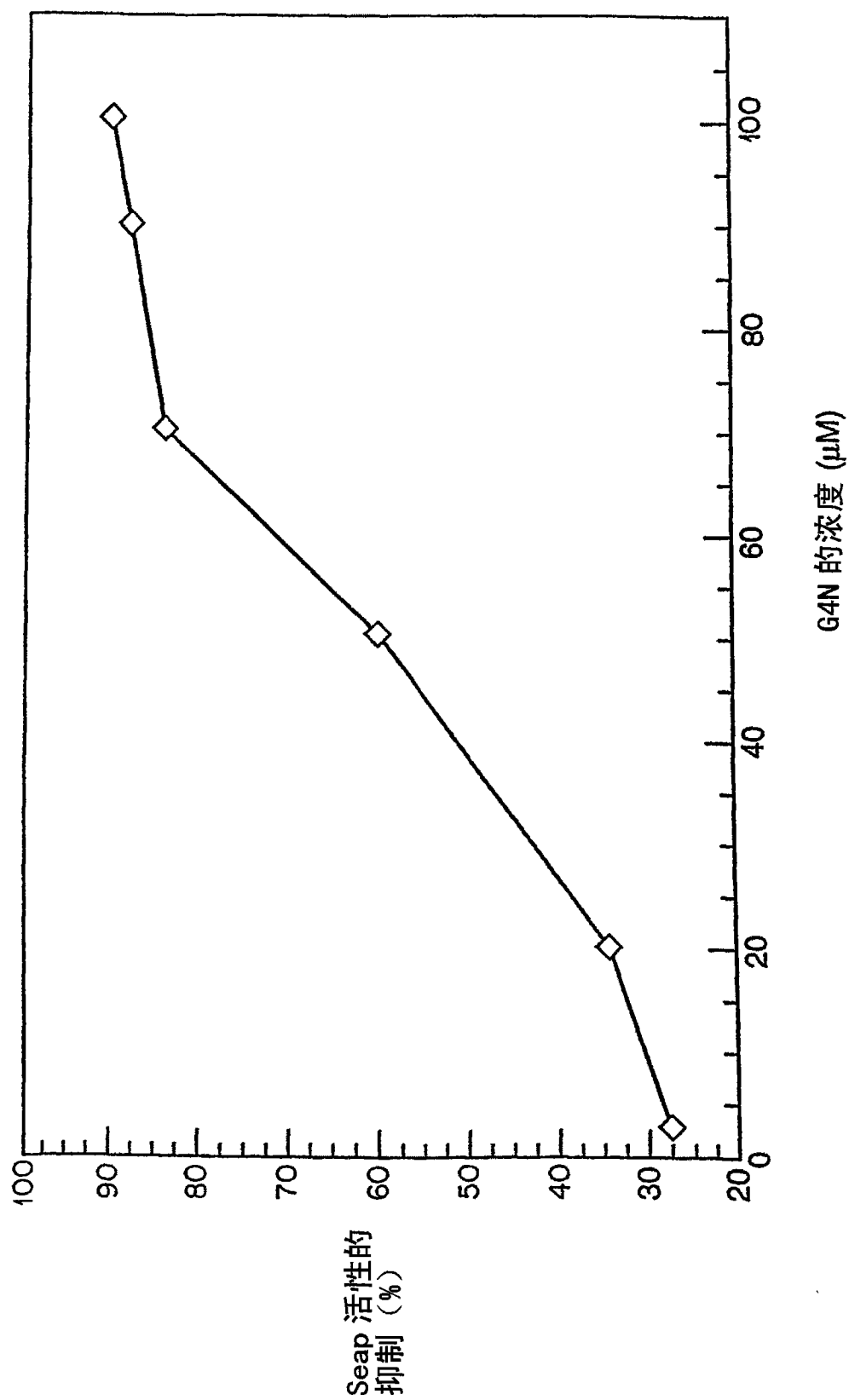


图 14

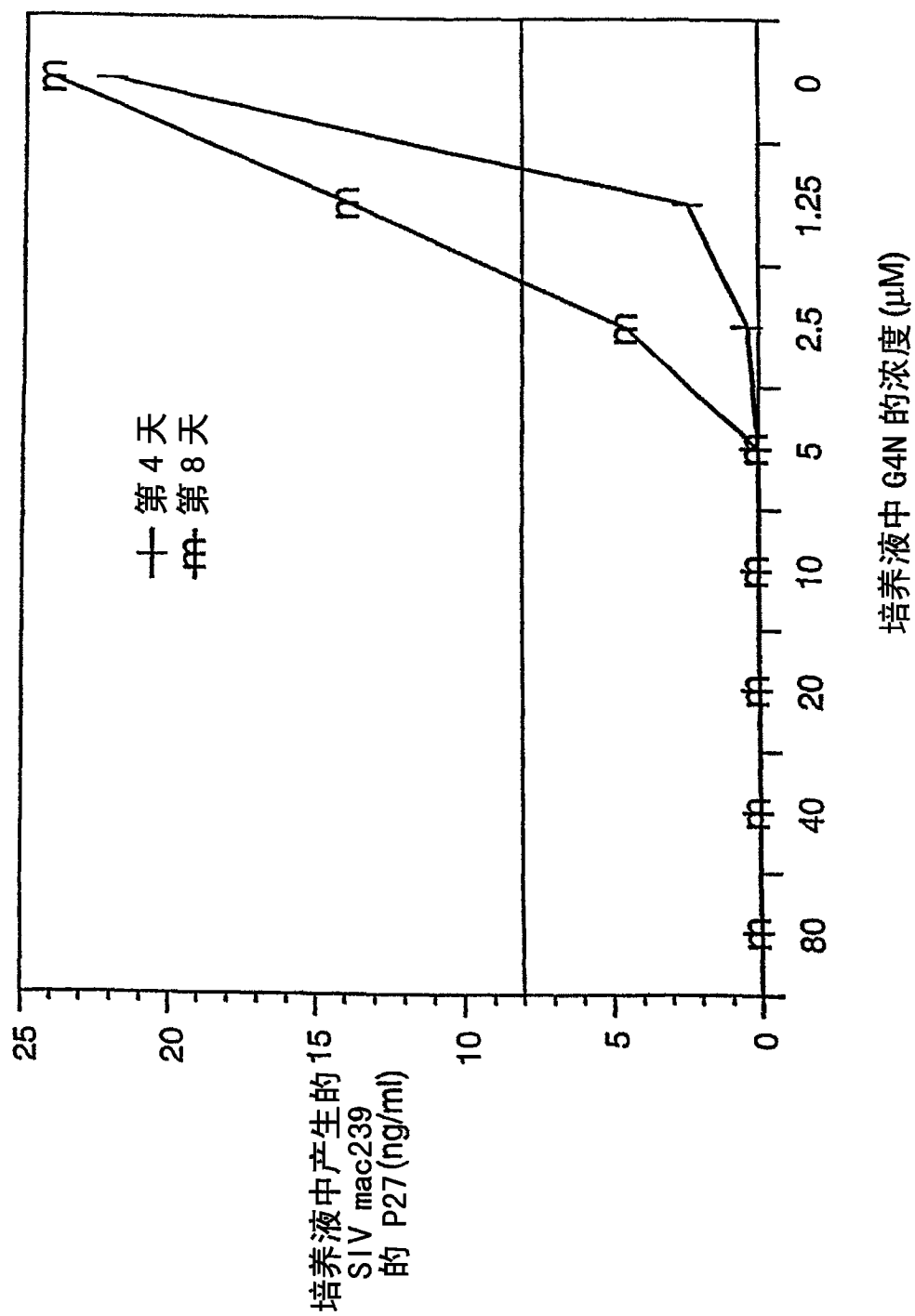


图 15

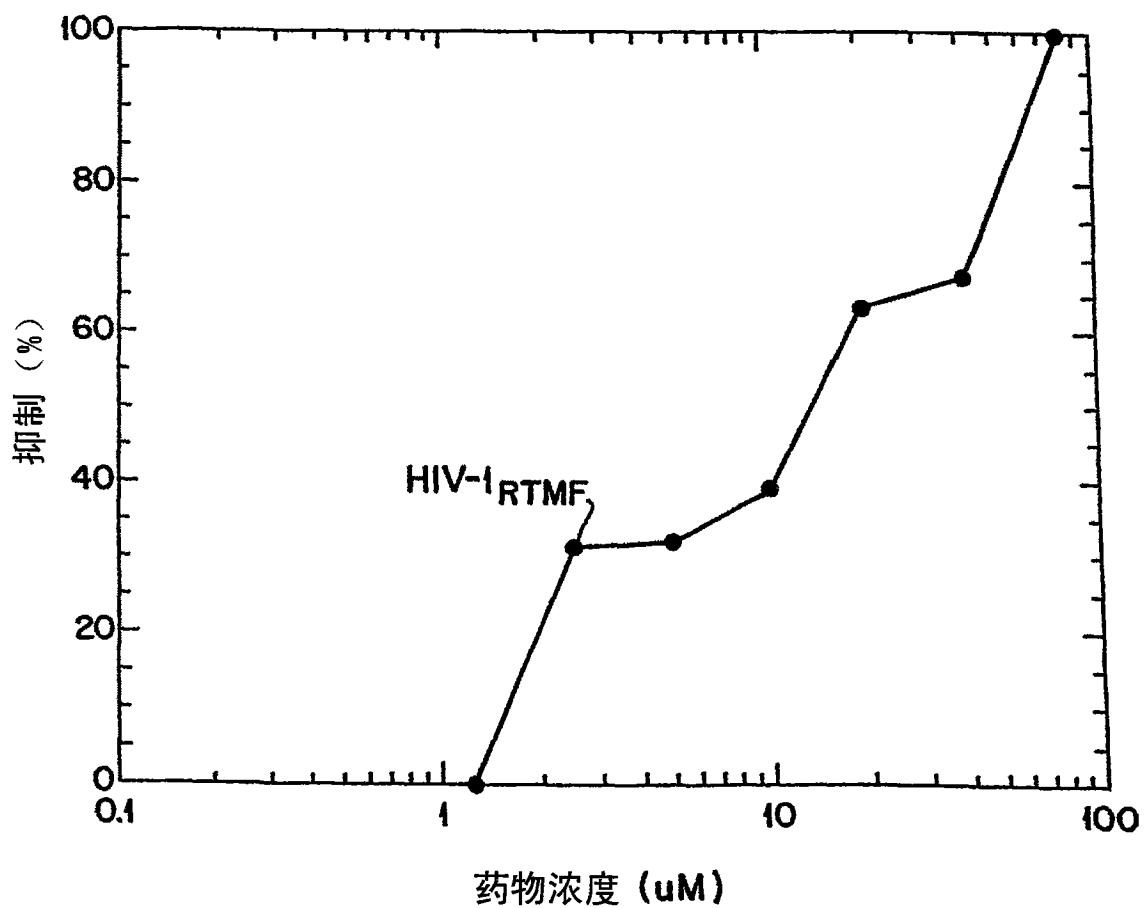


图 16

a

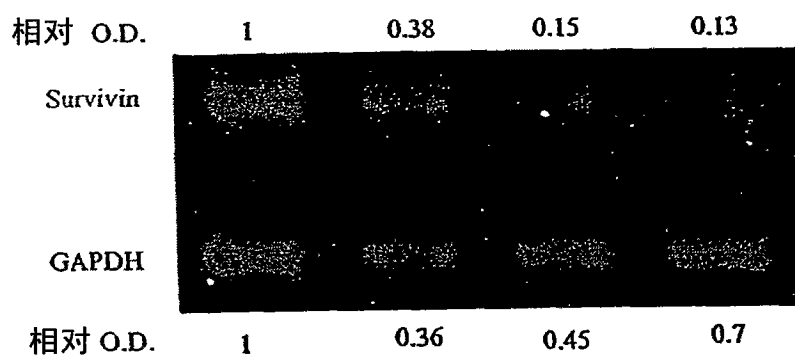


图 17A

b

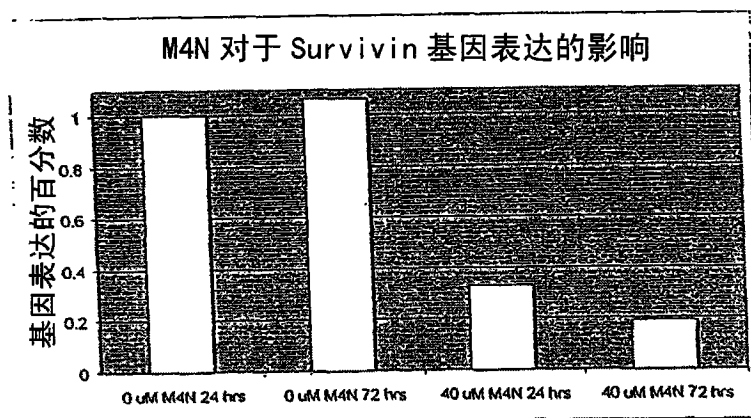


图 17B

a

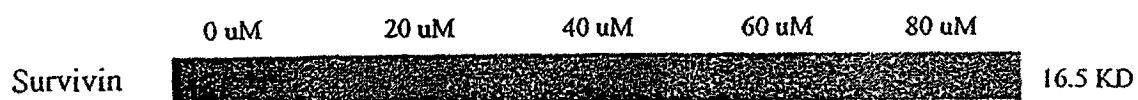


图 18A

b

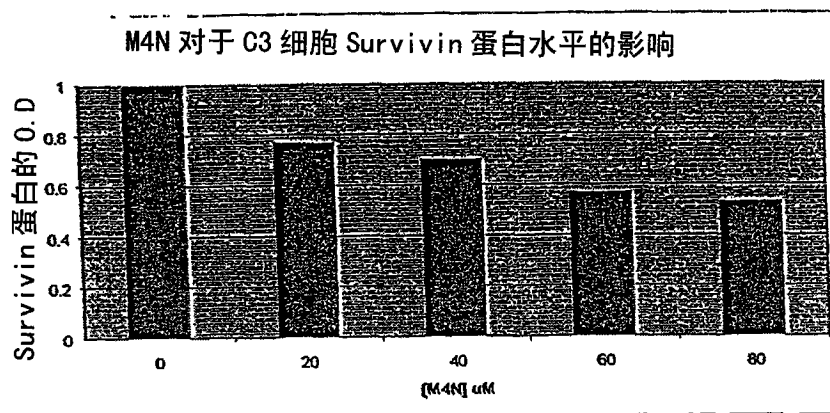


图 18B

a

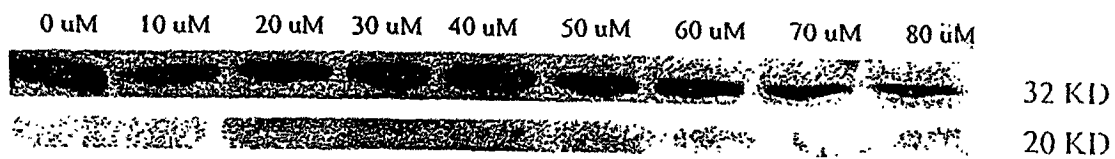


图 19A

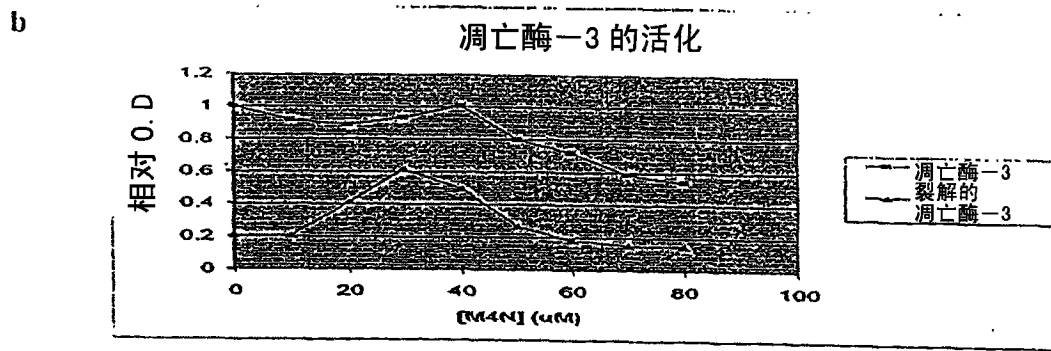


图 19B