

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4062664号
(P4062664)

(45) 発行日 平成20年3月19日(2008.3.19)

(24) 登録日 平成20年1月11日(2008.1.11)

(51) Int. Cl.

F 1

A 61 K 31/223	(2006.01)	A 61 K 31/223
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00
A 61 P 35/04	(2006.01)	A 61 P 35/04
A 61 P 43/00	(2006.01)	A 61 P 43/00 1 1 1
C 07 C 229/12	(2006.01)	C 07 C 229/12

請求項の数 27 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2001-531090 (P2001-531090)
 (86) (22) 出願日 平成12年10月16日 (2000.10.16)
 (65) 公表番号 特表2003-511477 (P2003-511477A)
 (43) 公表日 平成15年3月25日 (2003.3.25)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2000/028612
 (87) 國際公開番号 WO2001/028494
 (87) 國際公開日 平成13年4月26日 (2001.4.26)
 審査請求日 平成15年3月3日 (2003.3.3)
 (31) 優先権主張番号 09/418,594
 (32) 優先日 平成11年10月15日 (1999.10.15)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 301059640
 ジョンズ ホブキンス ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 メリーランド州 ボルティモア ノース チャールズ ストリート
 3400
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (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

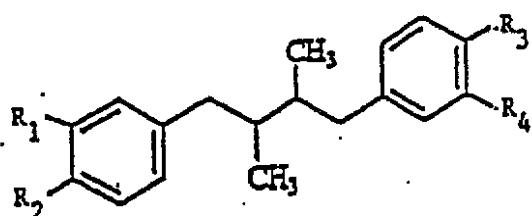
(54) 【発明の名称】腫瘍の処置における使用のためのノルジヒドログアイアレチン酸誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の式:

【化1】



10

の化合物であつて、ここで、R₁、R₂、R₃ および R₄ は、同一であり、そしてアミノ酸残基のN,N-ジメチル置換された誘導体を示し、ここで、該化合物は、R₁、R₂、R₃ および R₄ に、該アミノ酸残基のN,N-ジメチル置換された誘導体のカルボン酸残基を介して結合される、化合物。

【請求項2】

前記アミノ酸が、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、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、スレオニン、トリプトファン、チ

20

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、ホスホスレオニン、ホスホチロシン、N-メチルアルギニン、またはN-アセチルリジンである、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

R₁、R₂、R₃およびR₄は、それぞれ、-O(C=O)CH₂N(CH₃)₂を示す、請求項1または2に記載の化合物。

【請求項4】

請求項1に記載の化合物を合成する方法であって、以下の工程：

10

(a) NDGAおよびアミノ酸のN,N-ジメチル置換された誘導体を混合する工程；および

(b) HClを添加する工程、

を包含し、ここで、これらの工程は、塩酸塩の生成を可能にする条件下で実施される、方法。

【請求項5】

工程(a)は、ジクロロメタン溶液の存在下で実施され、そして該溶液にDCCおよびDMAPを添加することをさらに包含する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

請求項1～3のいずれか1項に記載の化合物と、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を含む、組成物。

20

【請求項7】

前記賦形剤またはキャリアは、生理学的生理食塩水またはPBSである、請求項6に記載の組成物。

【請求項8】

治療によるヒトまたは動物の身体の処置における使用のための、請求項6または7に記載の組成物。

【請求項9】

腫瘍の処置またはウイルスの複製および増殖の阻害における使用のための、請求項6～8のいずれか1項に記載の組成物。

30

【請求項10】

前記腫瘍がHPV誘導性である、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

前記腫瘍が、頸部の腫瘍、口の癌、ペニスの腫瘍、頭部および首の腫瘍からなる群より選択される、請求項9または10に記載の組成物。

【請求項12】

前記腫瘍が、悪性腫瘍および良性腫瘍からなる群より選択される、請求項9～11のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項13】

前記悪性腫瘍が、扁平上皮癌、腺癌、および髄芽腫からなる群より選択される、請求項12に記載の組成物。

40

【請求項14】

前記腫瘍が哺乳動物中に存在する、請求項9～13のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項15】

前記哺乳動物がヒトである、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

前記ウイルスがAZT耐性ウイルスである、請求項9に記載の組成物。

【請求項17】

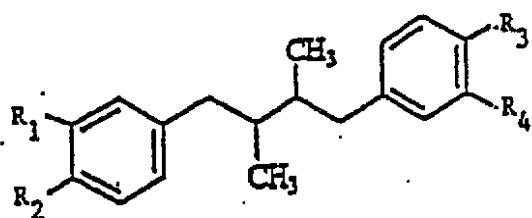
腫瘍の処置またはウイルスの複製および増殖の阻害のための医薬の製造における、請求項1～3のいずれか1項に記載の化合物の使用。

50

【請求項 18】

腫瘍の処置のための医薬の製造における、式：

【化 1】



10

のノルジヒドログアイアレチン酸誘導体の使用であって、ここで、R₁、R₂、R₃およびR₄は、独立して、アミノ酸残基のN,N-ジメチル置換された誘導体を示し、ここで該化合物は、R₁、R₂、R₃およびR₄に、該アミノ酸残基のN,N-ジメチル置換された誘導体のカルボン酸残基を介して結合される、使用。

【請求項 19】

前記アミノ酸が、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、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、スレオニン、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、ホスホスレオニン、ホスホチロシン、N-メチルアルギニン、またはN-アセチルリジンである、請求項18に記載の使用。

20

【請求項 20】

前記腫瘍がHPV誘導性である、請求項18に記載の使用。

【請求項 21】

前記腫瘍が、頸部の腫瘍、口の癌、ペニスの腫瘍、頭部および首の腫瘍からなる群より選択される、請求項20に記載の使用。

【請求項 22】

30

前記腫瘍が、悪性腫瘍および良性腫瘍からなる群より選択される、請求項18に記載の使用。

【請求項 23】

前記悪性腫瘍が、扁平上皮癌、腺癌、および髄芽腫からなる群より選択される、請求項22に記載の使用。

【請求項 24】

前記腫瘍が哺乳動物中に存在する、請求項18に記載の使用。

【請求項 25】

前記哺乳動物がヒトである、請求項24に記載の使用。

【請求項 26】

40

前記医薬が、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を含む、請求項18～25のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 27】

前記賦形剤またはキャリアが、ジメチルスルホキシド(DMSO)、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)、脂質ベースの処方物、および生理学的生理食塩水からなる群より選択される、請求項26に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本明細書中に記載されそして特許請求される本発明は、国立衛生研究所(National Institute of Health)からの助成金のもとで一部行われた。米

50

国政府は、本発明の一定の権利を有する。

【0002】

(発明の背景)

(1. 発明の分野)

本発明は、腫瘍およびウイルス感染の処置のための、ノルジヒドログアイアレチン酸誘導体の使用、特に、天然に存在しているアミノ酸の置換基を含有している誘導体の使用に関する。

【0003】

(2. 背景情報)

発癌は、種々の遺伝的な因子および後成的因子による影響を受ける多段式の事象であり、そして種々の組織に起源する制御されない細胞の増殖の勃発によって象徴される。抗癌研究についての普遍的な目標は、腫瘍の増殖の減少において非常に有効であり、宿主に対して無毒性であり、そしてほとんどの患者について与えることができる、臨床的な処置の開発にある。分裂している細胞に対して固有である標的の阻害に焦点を当てる薬物が、実質的な副作用の危険性を伴わずに有効な化学療法剤であるはずである。

10

【0004】

細胞は、それらが細胞周期を進行する際に、多くのチェックポイントを通過する。特定の基準が、これらのチェックポイントのそれぞれを通過するために満たされなければならない。G2/M移行においては、最も必須の調節因子は、サイクリン依存性キナーゼであるCDC2である。このキナーゼは、調節タンパク質であるサイクリンBに対して強固に結合し、そして成熟促進因子(MPF)と呼ばれる、この複合体はまた、細胞が初期分裂前期に入るように導く多くの事象を刺激する役割を果たす(1)。驚くべきことではないが、MPFのいずれかの成分の欠失または脱活性化(deactivation)は、細胞のG2への進行をブロックする。

20

【0005】

MPFの発現および活性は、種々のレベルで調節される。サイクリンBタンパク質のレベルは、細胞周期の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となり、そして有糸分裂の間に急激に減少する(2)。一方、CDC2タンパク質は、通常は、細胞周期の間に存在するが、レベルは、G2期の最後の段階でわずかに上昇する(3)。タンパク質の活性は、適切なサイクリンとの会合、ならびにホスファターゼであるCDC25Cによるその阻害部位の脱リン酸化に依存する(4、5)。この脱リン酸化の不全が、放射線または化学的な作用によるDNAの損傷に応答して、G2停止を開始することが示されている。最近の証拠はまた、任意の残存している活性なCDC2が、DNAの損傷の後で核の外側に輸送され得ることを示唆する(6)。

30

【0006】

植物のリグナンのノルジヒドログアイアレチン酸(NDGA)の多数の天然に存在している誘導体が、ウイルスの転写の阻害を通じ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(元々、*Larrea Tridentata*から単離され、そしてその後、化学的に合成された)が、HIV(7、8)、HSV(9)、およびHPV(10)のSp1依存性プロモーターの脱活性化によって、そのHIV、HSV、およびHPVの転写物の産生を阻害し得ることを示した。予想外に、これらの誘導体の1つであるテトラ-O-メチルNDGAもまた、哺乳動物の細胞株中での細胞周期の停止を誘導するようである。本明細書中で以下に示される証拠は、M₄Nが検出可能な毒性を伴う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、そしてこのことは、この停止が、サイクリン依存性キナーゼCDC2の阻害に起因するという観察を支持する。

40

【0007】

ヒトパピローマウイルス(HPV)感染は、多くの型の扁平上皮細胞において調節されない細胞増殖を引き起こし、それによって良性の乳頭腫(paliloma)(いぼ)から、頸部(cervical)、ペニスおよび口の癌までの範囲の苦痛を生じる。HP

50

Vとのこれらの癌の強力な関係、および感染の広範囲での出現は、抗H PV治療を開発することの重要性を示す。

【0008】

全てではないがほとんどのウイルス（それらの複製的に活性な変異体を含む）が、宿主依存性である。これらは、ウイルスの増殖をサポートするために特定の細胞性の因子の関与を必要とする。宿主の細胞性因子は、ウイルスタンパク質とは異なり、変異の圧力下にはなく、そして一般的には、構造的に不变性である。従って、ウイルスの生活環の異なる段階でこれらの細胞性因子の利用をブロックする化合物は、おそらく、変異に感受性でない抗ウイルス剤としての良好な候補である。HIV-1の阻害のための別の標的として細胞性の因子を使用するいくつかの研究が、概説されている（11）。

10

【0009】

出願人らは、最初に、クレオソートノキ（Creosote bush）（*Larrea tridentata*）から単離した3'-O-メチル化NDGA（すなわち、Mal.4）が、基底のHIVの転写、Tat調節性のトランス活性化、およびヒトの細胞培養物中でのHIVの複製を、特異的にブロックし得ることを報告した（12、13、14）。Mal.4は、HIVプロウイルス性テンプレートのプロモーターに対する転写因子Sp1の結合を妨害することによってその効果を発揮する。Mal.4の標的は、HIVの長末端反復（LTR）のSp1結合部位である、ヌクレオチド-87～-40にマップされる。変更されていないNDGAは、インビトロで、HIVの転写を阻害せず、そしてSp1の結合に対して影響を有さない（12）。

20

【0010】

しかし、植物のリグナンの単離および精製は、骨の折れる、そしてコストの高い作業である。ヒトにおけるSp1調節性のウイルスおよび腫瘍の増殖の制御における植物のリグナンの可能性のある臨床的用途の予測において、9個の異なるメチル化NDGAの活性が、低いコストで、大量に、親基質としてメチル化されていないNDGAを使用して化学的に合成された（15）。30 μM以下の薬物の濃度で、テトラ-O-メチルNDGAが、Sp1調節性のプロウイルスの転写およびトランス活性化の阻害によるHIVの複製の制御において、最も有効であることが見出された（15）。この研究は、それ以降、単純ヘルペスウイルス（HSV-1およびHSV-2）の増殖の制御にまで拡大されている（16）。単純ヘルペスウイルス最初期（IE）ICP4遺伝子は、HSVの複製に必須である（17）。そのプロモーター領域は、8個のSp1コンセンサス結合部位を保有しており（18）、そのうちの5個が、ICP4遺伝子の発現に必要である。従って、このことは、ICP4遺伝子を、このような試験のための良好な候補にする。出願人らは、3-O-メチルNDGA（Mal.4）およびテトラ-O-メチルNDGA（M₄N）の両方ともが、電気泳動の移動度シフトアッセイによって示されるようなICP4プロモーターへのSp1タンパク質の結合のブロックによる、Vero細胞におけるHSV-ICP4遺伝子の発現の有効な転写インヒビターであることを見出した。

30

【0011】

感染させたVero細胞において、M₄NおよびMal.4の抗HSV活性を試験し、そしてアシクログアノシン（アシクロビル、ACV）の活性と比較した場合に、出願人らは、M₄NについてのIC₅₀が、HSV-1の10回の継代およびHSV-2の4回の継代について11.7 μMから4 μMの間で変化し、は、高い薬物濃度の必要性を明らかに増大する傾向を伴わなかったことを観察した。しかし、ACVについてのIC₅₀は、最初のウイルスの継代についての7 μMから、HSV-1の10回目の継代については444 μMにまで、そしてHSV-2の4回目の継代については>88 μMにまで増大した。このことは、それらの、Vero細胞におけるACVに対する薬物耐性の迅速な増強を示している。結果として、選択指數S.I.（TC₅₀ / IC₅₀）は、M₄Nについては比較的安定なままであるが、ACVについてのS.I.は、Vero細胞中でのウイルスの継代後に60倍低下した（16）。従って、M₄Nは、変異に感受性でない薬物である。これは、ACV耐性HSVを有効に阻害し得る（16）。

40

50

【0012】

S p 1 が重要な細胞性の転写因子であるという事実 (19) に起因して、S p 1 調節性の細胞遺伝子の発現に対する、このクラスの化合物の可能性のある阻害効果に、取り組むべきである。M a 1 . 4 は、一旦それがその結合部位に安定に結合すると、S p 1 と置換し得ない (12)。従って、おそらく、N D G A 誘導体は、定常期の細胞中の S p 1 調節性のハウスキーピング遺伝子の発現に対するよりも、増殖している細胞中の S p 1 調節性の遺伝子に対してより大きな影響を有するようである。後者の場合においては、この薬物は、D N A の合成の間に遺伝子のプロモーター中の S p 1 部位に対して S p 1 タンパク質と競合することが可能であり、一方、前者の場合においては、この薬物は、それらのプロモーターに対してすでに安定に結合した S p 1 タンパク質を有する、ハウスキーピング遺伝子の転写クロマチンに対してほとんど影響を有さない。実際に、そのようなケースにあることが示されている。以下に実証されるように、9600 個の発現された遺伝子を含む遺伝子アレイ研究を使用することによって、出願人らは、ほとんどの S p 1 調節性遺伝子の産物が、同様のレベルで存在し、そして培養物中の頸癌細胞 C 3 の薬物での処置によっては影響されなかったことを見出した (図 5)。それでもなお、確かに、M₄N の比較的低い選択指数は、薬物が全身的に使用されなければならない場合に、最も低い有効濃度にその使用を制限する。一方、ヒトパピローマウイルスは、固体の頸部および口の腫瘍を、H P V E₆ / E₇ 遺伝子の S p 1 調節性の発現によって最初に誘導する (20)。出願人らは、薬物が、インサイチュで送達され得、そして腫瘍の領域でのみ維持され得る場合には、高濃度の薬物が、患者に対する損傷をほとんど伴うことなく、腫瘍を効率良く破壊するために使用され得ると考えた。 10 20

【0013】

(発明の要旨)

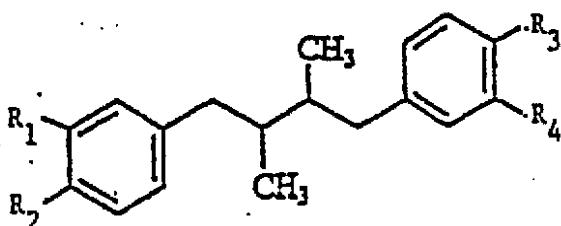
従って、本発明の 1 つの目的は、動物 (特に、哺乳動物、そして最も詳細には、ヒト) の癌性および非癌性の腫瘍の処置における使用のための化合物および組成物を提供することである。本発明のこの局面に従って、腫瘍の増殖を阻害する新規のノルジヒドログアイアレチン酸誘導体が、提供される。

【0014】

ノルジヒドログアイアレチン酸誘導体によって、以下の構造の化合物が意味される：

【0015】

【化 4】



ここでは、R₁、R₂、R₃、およびR₄は、独立して、-O H、-O C H₃、-O (C = O) C H₃、またはアミノ酸残基を示すが、それぞれが同時に-O Hではない。アミノ酸置換基は、とりわけ、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、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、スレオニン、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、ホスホスレオニン、ホスホチロシン、N - メチルアルギニン、およびN - アセチルリジンを含むことが意図される。 40

【0016】

本発明に従う使用に特に好ましい化合物は、M₄N およびG₄N であり、これらは図 1 に示 50

される。

【0017】

本発明のさらなる目的は、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であったが以前には腫瘍の処置のためには使用されていなかった類似の誘導体によって、癌性の腫瘍および非癌性の腫瘍を処置するための方法を提供することである。この方法は、サイクリン依存性キナーゼCDC2を含有している、迅速に増殖する細胞型に対して、特に有効であるはずである。本発明のさらなる目的は、特に、動物細胞、より詳細には、哺乳動物細胞、そして最も詳細には、ヒト細胞の、真核生物細胞周期においてCDC2を阻害する方法を提供することである。

【0018】

10
処置される腫瘍として、本発明の方法に従って使用される上記の化合物に対して感受性である任意の腫瘍が挙げられる。詳細には、これは、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の腫瘍および良性の腫瘍を含む。

【0019】

用語「癌性の腫瘍」は、任意の悪性の腫瘍（転移していても、転移していないてもよい）を含むことが意図される。用語「非癌性の腫瘍」は、任意の良性の腫瘍を含むように意図される。これらの用語は、当業者によって習慣的に理解されているように使用される。

【0020】

本発明の組成物および方法によって処置され得る良性の腫瘍および悪性の腫瘍の例は、Cancer Biology（本明細書中で参考として援用されている、Raymond W. Rudden, Cancer Biology、第3版、Oxford Univ. Press、1995）の表1-1に見出され得る。処置される腫瘍は、ウイルス起源であることが公知の腫瘍、ならびにウイルスに起源しないことが公知の腫瘍を含む。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と予想される。

【0021】

本発明のなお別の目的は、サイクリン依存性キナーゼCDC2サイクルの阻害方法を提供することである。この方法は、細胞増殖（特に、迅速に分裂する細胞型）を阻害することにおいて有用である。

【0022】

30
好ましい実施態様においては、本明細書中に記載されている化合物および組成物は、HPV誘導性の腫瘍の処置において使用される。HPVによって誘導される腫瘍としては、特に、HPV感染に関する、頸部、口、ペニスならびに頭部および首の癌が挙げられるが、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誘導性腫瘍に対する、ノルジヒドログアイアレチン酸誘導体、特に、テトラ-O-メチルノルジヒドログアイアレチン酸（M₄N）およびN,N-ジメチルテトラグリシニルノルジヒドログアイアレチン酸（G₄N）の局所的な適用を含む。

【0023】

本発明のなお別の目的は、アミノ酸置換基を含有している式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である。アミノ酸置換基R₁、R₂、R₃、およびR₄が同一である化合物が、この方法における使用に好ましい。

【0024】

M₄N、G₄N、および他の誘導体が、腫瘍内への局所的な注射によって、一般的には、薬学的に受容可能な希釈剤、賦形剤およびキャリアとともに、投与されることが、意図される。好ましい実施態様においては、M₄Nは、DMSO溶液の形態で腫瘍中に注射され、そしてG₄Nは、PBS溶液中で投与される。G₄Nの使用は、特に、大きな腫瘍（>2cm³）において、M₄Nの使用を補完する。これは、腫瘍のより大きな領域に拡散することを可能にする、その水溶性に起因する。他の水溶性および水不溶性のノルジヒドログアイアレチン酸誘導体が、本発明に従って同様に使用され得る。これらはまた、当該分野で公知でありそして使用されているような、全身的な送達のための脂質ベースの処方物中で使

用され得る。

【0025】

薬学的に受容可能な希釈剤、賦形剤およびキャリアによって、M₄N、G₄Nおよび他の類似の誘導体と適合性であるとして当業者に公知であり、そして本発明に従うヒトまたは他の哺乳動物への局所的な投与に適切であるこのような化合物が、意味される。本明細書中の以下の実施例は、局所的な注射の手段による投与を記載するが、他の局所投与の手段（例えば、局所的な塗布、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。

【0026】

所望の処置効果を得るために投与される化合物の量は様々であるが、当業者によって容易に決定され得る。投与量、投与の頻度、および処置の長さは、環境、主に、腫瘍の大きさおよびタイプに依存する。しかし、毎日～1週間毎の間隔またはそれよりも少ない頻度での、1gの腫瘍の重量あたり10mgから20mgのM₄N単独または同様の量のG₄Nとともにのいずれかでの投与が、例示目的のために記載され得る。単独でまたはG₄Nと組み合せてのいずれかで、200mg/ml濃度のDMSO中に溶解した、50μl～100μlのM₄Nの投与が、1～1.5cm³の腫瘍の多くの症例において有効であると予想される。

10

【0027】

（発明の詳細な説明）

（実験方法）

NDGA誘導体は、化学的に合成された（15）。細胞株C3は、W. Martin Kast of Loyola University Medical Center, Chicago, Illinois, U.S.A.によって提供された、C57BL/6kh起源の、HPV16E+Lおよび活性化されたRasで形質転換された細胞株である。これは、Greenstoneら（21）およびFeltkampら（22、23）によって記載されているように維持され、そして培養される。

20

【0028】

（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N,N-ジメチルテトラグリシニルNDGA、G₄Nの調製のための標準的な手順。NDGA(12.8g、42.3mmol、1.0当量)およびN,N,-ジメチルグリシン(26.2g、254mmol、6.0当量)を含有しているジクロロメタン(250ml)の溶液に対して、DCC(52.4g、254mmol、6.0当量)およびDMAP(2.32g、18.9mmol、1.0当量)を添加した。反応混合物を、室温で窒素下で24時間攪拌した。反応混合物が濾過された後、溶液は、減圧下で濃縮された。次いで、アセトン(250ml)が反応フラスコ中に添加され、そして溶液は、過剰のHCl(g)で泡立てられた。水溶性の沈殿がH₂O中に溶解され、そしてアセトンから室温で2回再沈殿されて、(1)(29.2g、36.8mmol)が、87%の収率で白色の固体として得られた。プロトンNMRスペクトルが、Varian Unity-400(400MHz)スペクトル分析計上で、D₂O溶媒およびTSPを内部標準として使用することによって得られた。炭素-13NMRスペクトルが、Varian Unity-400(400MHz)スペクトル分析計上で、溶媒としてD₂Oを使用することによって得られた。炭素-13化学シフトは、TSPの一重線に対して照合される(0.0ppm)。

30

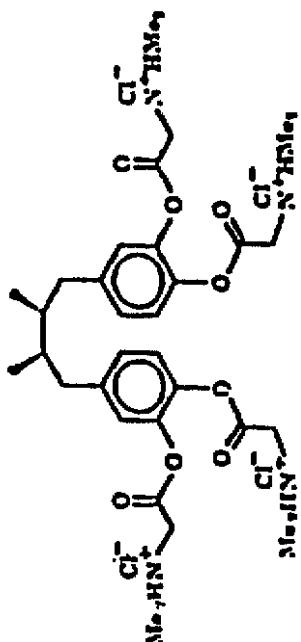
40

【0029】

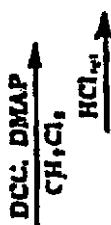
合成はスキーム1に示される。

【0030】

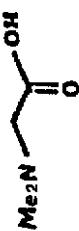
【化5】



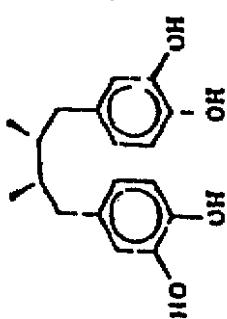
10



20



30



40

一般的な手順。全ての反応は、他に特に示されない限りは、窒素雰囲気下でオープンで乾燥させたガラス容器 (120) の中で行われた。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は、Mallinckrodt Chemical Co. から購入された。アセトンは、4 A モレキュラーシーブで乾燥され、そして蒸留された。ジクロロメタン、酢酸エチル、およびヘキサンは乾燥させられ、そして CaH_2 から蒸留された。1, 4-ジオキサンおよびテトラヒドロフランは、窒素雰囲気下でナトリウムおよびベンゾフェノンからの蒸留によって乾燥された。ノルジヒドログアイアレチン酸は、Fluka Chemical Co. から購入さ

れた。N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、4-ジメチルアミノビリジン (DMAP)、モルヒネ、トリエチルアミン、および炭酸カリウムは、Merck Inc. から購入された。1-プロモ-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は、Aldrich Chemical Co. から購入された。

【0031】

分析用の薄層クロマトグラフィー (TLC) は、Merck Inc. から購入された、予めコーティングされたプレート (シリカゲル 60 F-254) 上で行われた。ガスクロマトグラフィー分析は、25 m の架橋したメチルシリコーンガムキャピラリーカラム (0.32 mm i. d.) を備えた、Hewlett-Packard 5890 Series II 機器上で行われた。窒素ガスが、キャリアガスとして使用され、そして流速は 14.0 mL / 分で一定に維持された。保持時間 t_R は、以下の条件下で測定された：インジェクター温度 260、等温カラムの温度 280。ガスクロマトグラフィーおよび低分解能質量スペクトル分析が、Hewlett-Packard 5971A Mass Selective Detector およびキャピラリーアイドカラムを備えた、Hewlett-Packard 5890 Series II 機器上で行われた。中圧液体クロマトグラフィー (MPLC) による分離は、Jasco Model 1880-PU インテリジェント HPLC ポンプの使用によって 120 mL / 時間の流速で行われた。MPLC パッキング材料、Reversed Phase Silica Gel C18 (粒子の大きさ 0.035 ~ 0.070 mm) は、Knauer Co. から購入された。重量カラムクロマトグラフィーによる精製が、Merek Reagents Silica Gel 60 (粒子の大きさ 0.063 ~ 0.200 mm、70 ~ 230 メッシュ ASTM) の使用によって行われた。

【0032】

赤外 (JR) スペクトルが、Bomen Michelson Series FT-IR スペクトル分析計上で測定された。報告される波数は、ポリスチレン 1601 cm⁻¹ 吸収について言及される。吸収強度は、以下の略号によって記録される：s、強い；m、中程度；w、弱い。プロトン NMR スペクトルは、Varian Unity-400 (400 MHz) スペクトル分析計上で、溶媒としての D₂O、ならびに内部標準としての 3-(トリメチルシリル) プロピオン酸、ナトリウム塩の使用によって得られた。炭素-13 NMR スペクトルは、Varian Unity-400 (100 MHz) スペクトル分析計上で、溶媒として D₂O を使用することによって得られた。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 (60.0 ppm) の中心に対して参照される。多重線は、以下の略号によって記録される：s、一重線；d、二重線；t、三重線；q、四重線；m、多重線；J、カップリング定数 (ヘルツ)。高分解能質量スペクトルは、JEOL JMX-HX110 質量スペクトル分析計によって得られた。

【0033】

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 (2)。ジクロロメタン (250 mL) 中の NDGA (1.12 g, 42.37 mmol, 1.0 当量) および N, N-ジメチルグリシン (26.21 g, 254.2 mmol, 6.0 当量) の溶液に対して、DCC (52.45 g, 254.2 mmol, 6.0 当量) および DMAP (5.176 g, 42.37 mmol, 1.0 当量) を添加した。反応混合物を、室温、窒素下で 24 時間攪拌した。反応混合物中のジシクロヘキシル尿素が濾過された後、得られた溶液は、減圧下で濃縮された。次いで、アセトン (250 mL) が残渣に添加され、得られた溶液は、過剰の HCl (g) で泡立てられた。沈殿を水中に溶解し、そして室温でアセトンの使用によって 2 回再度沈殿されて、2 (28.97 g, 36.86 mmol) が、87% の収率で白色の固体として得られた：¹H NMR (D₂O, 400 MHz) 0.78 (d, J = 6.0 Hz, 6H, 2 × CH₃)、1.73 (m, 2H, 2 × CH)、2.38 (dd, J = 13.2, 9.0 Hz, 2H, 2 × CH₃)。

. 6 H z , 2 H . 2 x A r C H) 、 2 . 7 8 (d d , J = 1 3 . 2 , 4 . 4 H z , 2 H . 2 x A r C H) 、 3 . 0 3 (s , 2 4 H . 8 x C H ₃ N) 、 4 . 5 3 (s , 8 H , 4 x C H ₂ N) 、 7 . 2 2 (m , 4 H . 4 x A r H) 、 7 . 2 9 (d , J = 8 . 4 H z , 2 H . 2 x A r H) ; ¹³C N M R (D ₂ O , 1 0 0 M H z) 1 8 . 1 1 、 4 0 . 8 2 、 4 1 . 7 3 、 4 6 . 7 5 、 5 9 . 5 9 、 1 2 5 . 7 9 、 1 2 6 . 5 8 、 1 3 1 . 6 3 、 1 4 0 . 6 6 、 1 4 2 . 4 7 、 1 4 6 . 1 1 、 1 6 7 . 8 4 ; I R (K B r) 3 4 6 1 (b r) 、 2 9 6 3 (m) 、 1 7 7 7 (s , C = O) 、 1 6 2 0 (m) 、 1 4 7 8 (m) 、 1 3 7 7 (m) 、 1 2 1 0 (m) 、 1 1 0 6 (m) 、 9 6 1 (w) 、 8 5 2 (w) c m ⁻¹ ; (2 - 4 H C 1) の M S (F A B) m / z (相対強度) 6 4 3 (M + , 3 0) 、 6 0 0 (2 0) 、 5 8 8 (4 3) 、 5 1 5 (2 0) 、 4 7 3 (4 2) 、 4 3 0 (1 3) 、 3 8 8 (2 6) 、 1 8 5 (1 8) 、 9 3 (3 8) 、 5 8 (1 0 0) 、 4 4 (2 2) ; (2 - 4 H C 1) の H R M S (F A B) C ₃₄ H ₅₀ N ₄ O ₈ についての計算値 6 4 2 . 3 6 2 8 、 実測値 6 4 2 . 3 6 1 4 ; 分析 . C ₃₄ H ₅₄ N ₄ O ₈ C 1 ₄ についての計算値 : C , 5 1 . 7 8 ; H . 6 . 9 0 ; N . 7 . 1 0 ; O . 1 6 . 2 3 。 実測値 : C , 5 1 . 7 0 ; H . 6 . 8 5 ; N . 7 . 0 5 ; O . 1 6 . 2 1 。 10

【 0 0 3 4 】

他の N , N - ジメチル置換された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された化合物が合成され得ることが、理解される。

【 0 0 3 5 】

(実施例 1)

20

(S P 1 によって調節される H P V E ₆ / E ₇ プロモーター活性を有する M ₄ N およびいくつかの他の N D G A 誘導体の効果)

S P 1 によって調節される H P V E ₆ / E ₇ プロモーター活性を有する M ₄ N およびいくつかの他の N D G A 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試験した。アッセイは、リン酸カルシウム法によって、ルシフェラーゼレポーター遺伝子に融合した H P V 1 6 L C R (P ₉₇ プロモーター) の、 C 3 3 A 細胞への D N A トランスフェクションに依存する。 C 3 3 A は、頸部腫瘍細胞株 (A T C C 登録番号第 H T B - 3 1) である。これは、任意の組み込まれた H P V D N A は含有しないが、 H P V 初期遺伝子プロモーターの強力な発現のために必須の転写因子を有する。 D N A トランスフェクションの 1 日後、ジメチルスルホキシド (D M S O) の助けを用いて溶解させた種々の薬物濃度を、細胞に対して添加した。薬物での処理の 3 0 時間後 (その結果、アッセイは、一時的なトランスフェクション実験については、標準的には 4 8 時間内に完了する) 、細胞を溶解させ、そして特異的なルシフェラーゼ活性を決定した (L u c i f e r a s e A s s a y S y s t e m s , P r o m e g a 、 米国特許第 5 , 2 8 3 , 1 7 9 号) 。 M ₄ N 薬物濃度が増大するに伴って、特異的なルシフェラーゼ活性が低下した。 30

【 0 0 3 6 】

結果 (図 2 に示す) は、 M ₄ N が、ルシフェラーゼアッセイにおいて H P V E ₆ / E ₇ プロモーターで、 S p 1 によって調節される転写開始を劇的に減少させることを示す。

【 0 0 3 7 】

(実施例 2)

40

(M ₄ N での処理の後での、 E ₆ / E ₇ m R N A 合成の阻害)

M ₄ N での処理の後での、 E ₆ / E ₇ m R N A 合成の阻害を、頸部細胞株 C ₃ 中で R T - P C R によって測定した。比較 R T - P C R を、計数した細胞数に対して標準化した全細胞 R N A の量を用いて行った。 R T - P C R 産物を、 2 % のアガロースゲル上で分析した。結果を、図 3 に示す。 R T - P C R の結果は、 E 7 (3 2 1 b p) および E 6 (2 0 4 b p) について予想される大きさの増幅された c D N A が、 2 2 サイクルの増幅のような早い段階で、 D M S O で処理された細胞中で検出されたことを示した。これらの同じ産物は、薬物で処理した R N A 抽出物中では、 3 0 サイクルの増幅後にからうじて検出可能であった。テンプレート P C R コントロールについて、または H P V 1 6 - ネガティブ C 3 3 a 細胞株の全 R N A 抽出物からは、増幅された産物は検出されなかった。 50

【0038】

(実施例3)

(M₄N処理による頸部C3細胞増殖の阻害)

H P V - 1 6 で形質転換した不死マウス上皮細胞 (C3細胞) を、1つのバイアルあたり10⁵個の細胞の密度でプレートした。24時間後、バイアルの1/2に対して、1%のD M S O 中に溶解させた40 μMのM₄Nを含有している増殖培地を与え、一方、他の半分には、1%のD M S O のみを含有している増殖培地を与えた。結果を図4Aに示す。24時間以内に、薬物で処理したC3細胞とコントロールC3細胞との間での細胞の形態学における差異が観察された。薬物で処理した細胞の増殖および分裂は、処理していないコントロールと比較して明らかに減少し、一方、全細胞の計数と比較した生存可能な細胞の割合は、薬物で処理した細胞およびD M S O のみのコントロール細胞の両方について一定のままであった。このことは、M₄Nが細胞分裂を劇的に減少させることを示す。

10

【0039】

培地からのM₄Nの除去後のC3の増殖に対する効果もまた、試験した。C3細胞を、1つのバイアルあたり10⁴個の細胞の密度でプレートした。時間 = 0で、バイアルの2/3に、1%のD M S O 中の40 μMのM₄Nを補充した増殖培地を与えた。残りのバイアルには、1%のD M S O のみを含有している増殖培地を与えた。73時間後、それらの増殖培地中にM₄Nを受容したバイアルの1/2を洗浄し、そして1%のD M S O のみを含有している培地を添加した。細胞のバイアルの他の2/3を洗浄し、そして前に投与したものと同じ培地で置き換えた。図4Bに示す結果は、細胞増殖の速度が、薬物を含有していない培地への交換の後には、M₄Nで処理したサンプル中では顕著には増大しなかったことを示し、このことは、M₄Nが細胞外環境からのその除去の後でもなお細胞分裂を有意に減少させ続けることを示す。

20

【0040】

(実施例4)

(薬物での処理の前および72時間後の、C3細胞中の細胞性遺伝子発現の分析)

9600個の遺伝子アレイを用いて遺伝子発現を研究した(図5)。72時間、M₄N(40 μm)で処理した(C₃ M₄N)および未処理(C₃D M S O)のものに由来するそれぞれのポリA⁺RNAの5マイクログラムを、Genomics 51、313-324、1998に記載されている手順に従って、ヒトの9600個の遺伝子アレイハイブリダイゼーション研究の対において使用した。ハイブリダイゼーション画像を、Nikon 55 mm AF micro Nikonレンズを備えたカラービデオカメラによってキャプチャーし、そしてMacintosh LC630コンピューターによってデジタル化した。単色または2色の態様のいずれかで色素形成酵素の酵素基質反応を通じるこのような検出は再現性があり、そして非常に敏感である(10⁷個の細胞に由来するRNAを用いて、1個の細胞あたり転写物の5個未満のコピーを検出することができる)。

30

【0041】

示差的に発現される遺伝子を示すコンピューターのプリントアウト(C₃ M₄N / C₃ D M S O > 10、およびC₃ D M S O / C₃ M₄N > 10)を、検査のために列挙した。T I F F 形式での画像ファイルおよびM Sエクセル形式でのデータファイルを、Z I Pディスクケットに保存する。遺伝子の名称およびクローンのID番号は、将来のノーザンプロットでの確認のための画像のクローンを得るために利用可能である。

40

【0042】

M₄Nでの処理の72時間後にアップレギュレート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中で、以下は細胞分裂およびアポトーシスに特に関係するものである。いくつかの他の細胞周期に関連する遺伝子もまた、M₄Nに応答して大きくアップレギュレートされる。サイクリン依存性キナーゼC D C 2(実施例11)に加えて、例えば、以下である:

【0043】

【化6】

50

増加		10
サイクリン依存キナーゼインヒビター	(100×)	
アポトーシス (APO-1) 抗原	(100×)	
デスドメイン3DR ₃	(100×)	
Ras-関連タンパク質RAP-1	(60×)	
ヒトマップキナーゼ	(40×)	

以下の細胞周期に関係している遺伝子は、M₄Nに応答して大きくダウンレギュレートされる：

【0044】

【化7】

	処置	未処置	20
サイクリン依存キナーゼ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APO ₂	(3%)	(100%)	
システインプロテアーゼ	(7%)	(100%)	

早い時点（例えば、薬物での処理の1時間後）で、E₆ / E₇ レベルは、コントロールの細胞中でのものと同様であることを見出し、一方、4 . 5時間後には、E₆ / E₇ はもはやRT-PCRによっては検出不可能であった（39）。9600個の遺伝子アレイを用いた遺伝子発現を、薬物の最初の細胞性の効果をさらに低下させるために、これらの短期間処理した細胞（1時間および5時間）から単離したRNAを用いて繰り返すことが可能である。

【0045】

（実施例5）

（M₄Nの局所的な注射によるマウス中でのC3腫瘍増殖の標的化）

36匹のC57bl-16NCRマウスに、マウスの背中の両肩の間に、5 × 10⁵個のC3細胞を注射した。マウスのうちの24匹が、20日以内に腫瘍を生じた。毎日の注射（50μl ~ 100μlのM₄NまたはM₄N / G₄N）（DMSO中の200mg / mlのM₄N、PBS中の200mg / mlのG₄N）は、表1および2、図6および7に示すように、動物中での腫瘍の増殖に対して重大な影響を示した。

【0046】

（表1. マウスにおいて生じた単一腫瘍の増殖に対するM₄NおよびG₄Nの効果）

【0047】

【表1】

30

40

マウス 番号	処置期間	病変の大きさ(mm)			切除した病変 の重量(g)		体重(g)			
		1日	7日	21日	16日	24日	1日	16日	24日	
1	DMSO*	3x8x3.3	—	8x7x4	—	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	—	18.1	
4	DMSO	2.5x3.5x2.5	—	18x11x9	—	2.9	17.6	—	20.2	
1-16日										
6	M ₄ N	—	9x5x5	—	0.2	—	19	19.2	—	
7	M ₄ N	—	8x7x7	—	—	0.1	18.2	—	20.4	
11	M ₄ N	1x1.3x1	9.5x10x9	—	—	0	19.5	—	20.2	
14	M ₄ N	3.5x3.8x3.5	8x9x6	—	0.4	—	17	17.6	—	
15	M ₄ N	—	5x4x4	—	0.1	—	18.9	20.0	—	
16	M ₄ N	2.5x2.5x2.5	9x6x4	—	0	—	17.2	17.6	—	
17	M ₄ N	2.3x2.3x2.3	8x6x4	—	0.2**	—	17.3	—	—	
1-10日 8-17日										
18	M ₄ N	G ₄ N	3x2.5x3	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	1.8x1.5x1.8	8x10x5	—	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

* D M S O = 薬物についてのビヒクル

** 15日目に採取した

***ほとんどの壊死性の細胞に含まれる病変がまた、マウス 6、7、11、14、15、17、19、21、28、19に由来する病変中に見出された(図6、7)。薬物での処置の後では、マウス#11および#22においては病変は存在しなかった。コントロールのマウス#1、2、3、4中で見出される腫瘍が、増殖している細胞を含んだ(図2)。

【0048】

(実験手順:)

36匹のC57bl-16NCRマウスに、 5×10^5 個のC3細胞/マウスを注射した。注射は、マウスの背中の両肩の間に皮下で $100 \mu l$ を行った。細胞を、低塩H B S S中に懸濁し、そして均質な懸濁物を、穏やかにボルテックスすることによって維持した。

【0049】

24匹のマウスが腫瘍を発症した。それらの病変の大きさを、ダイアルキャリパーによつ

40

50

て測定した。これらのマウスを、剃毛し、体重を量り、そして処置を開始した（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には、50 μ LのDMSOを毎日腫瘍内注射によって受容させた。実験マウス（10）には、DMSO中に溶解させた（200mg/mL）50 μ LのM₄Nを与えた。さらに10匹のマウスには、8日間のM₄Nでの処置、続いて、8日間の毎日のG₄Nでの処置（50 μ L、PBS中の200mg/mL）を受容させた。注射を、腫瘍のいくつかの領域に対して行った。マウスを、注射の前にエーテルまたはメタファン（metaphane）で麻酔した。

【0050】

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

【0051】

【表2】

マウス 番号	処置期間	病変の大きさ（mm）		切除了した 病変の重量（g）		体重（g）	
		1日	7日	処置*	非処置**	1日	24日
9	M ₄ N	1.3x5x0.75	7x3x8	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
20	1.9 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	—	7x8x6	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

* DMSO中の薬物を、腫瘍の領域に直接注射した

**薬物を使わない隣接している腫瘍に由来する

（表3. マウスにおけるG₄Nの毒性研究）

【0052】

【表3】

群	マウス 番号	経路	1日あたりの 処置	注射 の日	致死率
1	187.5mg/kg	3	皮下	2X	6
2	375mg/kg	3	皮下	1X	6
3	750mg/kg	4	皮下	1X	6
4	375mg/kg	2	IV	2X	6

NCIからのC57BL-16NCR雌性マウスを、この実験において使用した。N,N-ジメチルテトラグリシニルNDGA（G₄N）を、75mg/mLの濃度でPBS中で毎日新しく作製した。1回の処置あたり、群1については0.05mLの注射、群2および4については0.1mLの注射、そして群3については0.2mLの注射を、6日間の間行った。実験は7日間続いた。体重を、注射の前および6日後に決定した。実験期間を通じて有意な体重の変化は観察されなかった。

10

20

30

40

50

【0053】

全ての処置したマウス、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、10、11、12、14、15、16、17 M₄N、番号18～22、24、26～29 M₄N/G₄N）が、腫大を示した。病変の大きさの測定を、ダイアルキャ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。処置レジメおよび結果は以下のとおりであった：

10日目：マウスを再び体重測定した。全てのマウスが、2グラムの成長を示した。

12日目：処置を行わなかった。

13日目：全てのマウスが、非常に異なる程度ではあったが、皮膚が盛り上がった。1匹のM₄Nで処置したマウス（#7）の皮膚は、割れて開き、これは「乾燥した腫瘍」になつた。

14日目：注射の容量を100 μLに増大させた。

15日目：1匹のM₄Nで処置したマウス（#17）が、麻酔の過剰用量／取り扱いによって死亡した。#17の病変の部位の皮膚にはひびが入り、これは「乾燥した腫瘍」を示していた。これを解剖し、そして病変を切り出しそして秤量した。

16日目：さらに4匹のM₄Nで処置したマウス（#6、14、15、16）、3匹のM₄N/G₄Nで処置したマウス（#19、21、28）、および1匹のコントロールマウス（#2）を安樂死させ、解剖し、そして秤量した。残りのコントロールマウス（#1、3、4）を、非侵襲的に試験し、そしてこれらは腫瘍を保有していた。

21日目：コントロールマウスに由来する腫瘍の大きさを、ダイアルキャリパーによって測定した。観察：マウス#10および#12（M₄Nで処置した領域）の病変部位の皮膚にはひびが入り、そして「乾燥した腫瘍」を示していた。

【0054】

24日目：マウス#7の皮膚は再び完全にカバーされた。実験を、この日で終了した。全ての残っているマウス、M₄Nで処置したマウス（#7、9、10、11、12）、およびM₄N/G₄Nで処置したマウス（#18、20、24、26、29）を安樂死させ、解剖し、試験し、そして秤量した。

【0055】

マウス中でのC3腫瘍の増殖に対するM₄NおよびM₄N/G₄Nの効果を、表1および2、ならびに図5および6にまとめる。表1は、単一の腫瘍を保有しているマウス中でのC3細胞の増殖に対する薬物の影響を示す。コントロールの群の4個の切除した腫瘍の平均の重量は1.48gであり、一方、M₄Nで処置したマウスおよびM₄N/G₄Nで処置したマウスに由来する病変の重量は、それぞれ、0.142gおよび0.51gであった。薬物で処置した病変は、主に、乾燥した壊死性の細胞から構成された（図6）。コントロールの群に由来する腫瘍は、均質であるようであり、そして活性に増殖する細胞を含んだ。表2は、複数の腫瘍を保有しているマウス中でのC3腫瘍の増殖に対する薬物の影響を示す。この研究においては、薬物を、腫瘍の1つに注射した。未処置の腫瘍の平均の重量は1.77gであり、一方、M₄Nで処置した病変の平均の重量は、0.15gであった。同様の結果が、M₄N/G₄Nの注射の後に得られた--未処置の腫瘍の平均の重量は1.27gであり、一方、薬物で処置した病変の平均の重量は、わずか0.103gであった。

【0056】

全体の実験期間の間の全てのマウスの体重の変化は、些細なものであるようであった（表1および2）。

【0057】

（実施例6）

マウスの2つの群に由来する薬物で処置した（M₄N）腫瘍およびDMSOビヒクルで処置したマウスまたは未処置のマウス（CON）を、組織病理学的な試験のために調製した。切り出し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%のホルムアルデヒド中で保存した。次いで、固定した組織を、一連の段階的なアルコールおよびキレ

10

20

30

40

50

ンを通じて脱水し、そしてパラフィン中に胞埋した。パラフィン組織ブロックを薄く切片状にし、そしてヘマトキシリソおよびエオシンを用いて顕微鏡分析のために染色した。組織病理学的研究は、コントロールの腫瘍がDMSOでの処置によっては影響を受けず、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、多形性の核の変化、高い有糸分裂形状、紡錘糸状の肉腫の形状、および癌細胞の特徴である周辺組織への浸潤を示す。

【0058】

対照的に、M₄N処置を受容けた腫瘍は、処置が開始された直後に増殖をやめる。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。高倍率で生存可能な少量の薬物の沈殿が存在し、そして局所的な領域は慢性の炎症および纖維症を示す。この治癒効果は、この領域からのこれらの死んだ腫瘍細胞の分離を導く。同じ結果が、M₄Nでの処置のみを用いた場合と同様に、M₄N / G₄Nでの処置を用いて見られる。しかし、G₄Nが水可溶性であるので、これは、M₄Nよりも腫瘍の大きな領域に対して広がり得る。M₄Nとともに共働で使用される場合には、G₄Nは、大きな大きさ(すなわち、2 cm³よりも大きい)の腫瘍を標的化する(treating)際により有効であり得ることが、予想される。

10

【0059】

(実施例7: モルモットでのHSV-1の皮膚感染に対するM₄Nの影響)

薬物M₄Nをまた、モルモットの皮膚感染におけるHSV-1の複製の阻害において試験した。モルモットの皮膚を針で傷つけ(pinch)、そしてHSV抑制剤をそれぞれの穿刺した領域に感染させるように局所的に塗布した。次いで、M₄Nを、注射後、毎日、6日間の間、穿刺して感染させた領域に対して塗布した。

20

【0060】

モルモットの裸にさせた背中の皮膚の6個の領域を、5=DIN針で滅菌的に穴を開けた。2つの領域を、HSV-1(HSV-C、培養上清、または生理食塩水中に単離した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。注射の15分後、30 μlの試験化合物(DMSO中の、ABDS₁、ABDS₂、ACV、およびM₄N(4N) 60 mg/ml)を、1つの領域のそれぞれのパンチして感染させた領域に対して、1日に5回、6日間塗布した。ABDS₁およびABDS₂を、ネガティブコントロールとして含めだ。図8の写真を、6日目に撮影し、そしてこれは、薬物の非存在下(HSV-C、HSV-SC)、有効ではない薬物の存在下(HSV-ABDS₁、HSV-ABDS₂)、および有効な薬物の存在下(HSV-M₄N、およびHSV-ACV)でのHSV-1の複製の程度を示す。6個の大きな融合性の水疱が、HSV-C、HSV-SC、HSV-ABDS₁、HSV-ABDS₂によって処置した領域中で生じ、一方、M₄Nでの処置(4N)およびACVでの処置の後には、感染させた領域中では水疱は観察されなかった。

30

【0061】

M₄NがHSVの複製をブロックし得るという明確な結果を、皮膚の病変の消失によって、そして薬物での処置の4日後にウイルスの脱殻がないことによって示されるように、このモデルシステムにおいて得た。最初の動物実験もまた、M₄Nが、腹膜内で与えられた場合には300 mg/kg程度の高い濃度で、そして皮下またはIVのいずれかによって与えられた場合には375 mg/kg程度の高い濃度で、マウスに対して無毒性であることを示した(表3)(6)。

40

【0062】

(実施例8: インサイチュでの注射を使用する臨床的な処置のためのM₄N)

薬物送達経路としての腫瘍内への直接のM₄Nの投与は、いくつかの特有の欠点を提供する。1) M₄Nは疎水性の化合物であり、そしてDMSO中に極めて可溶性である(200 mg/ml)。従って、少量の薬物の溶液のみが、薬物の有効な投与量を達成するための注射に必要である。上記の実施例5に記載するマウスでの実験においては、数日間の間の、50 μlから100 μlの毎日の注射が、マウスでの腫瘍の増殖を完全に停止させる

50

ために十分であった。疾患を処置するためのDMSOの大きな投与量（1回の処置あたり30mlのIV）の使用について、いくつかの以前の研究が存在している（24）。結果は、明確ではなかった（25）。しかし、全世界で何千万人のヒトが、過去に大きな量のDMSOを用いて安全に試験されている（26）ので、DMSOは、その極少量が使用される場合には、薬物の送達のためのビヒクルとして安全であるはずである。2)インサイチュでの注射によって、薬物の残りの大部分は不溶性であり、そして腫瘍の領域で濃縮され、そして循環系には入らない。従って、全身の毒性は回避される。さらに、その増殖を抑制するために十分な薬物が腫瘍内に残っているので、薬物の持続的な注射は、比較的少ない回数の処置の後には必要はない。実施例5のマウスでの研究においては、腫瘍細胞は、M₄Nの注射の中止の後にもなお、死滅し続けた。従って、薬物が直接標的化される場合には、腫瘍の大きさは、投与される薬物の必要とされる量についての決定的な因子となる。ヒト対マウスの全体重間での差異は、無関係となる。マウスの腫瘍の研究においては、10日間の間の20mg/日が、腫瘍を排除するために十分以上であった。匹敵する大きさ（1~1.5cm³）のヒトの腫瘍を処置するためには、これよりも高い投与量を使用するための理由は存在しないはずである。このことは、ヒトでの治験においてリスクを相当減少させるはずである。

【0063】

（実施例9：細胞のM₄Nでの処理は、細胞増殖をブロックする）

M₄Nについての本発明者らの以前の研究は、Sp1依存性のプロモーターの非活性化によってウイルスの転写を阻害することができる事を示した。多くの哺乳動物の細胞周期遺伝子もまた、欠くことのできないSp1プロモーターを含み、そして従って、M₄Nはそれらの転写をブロックし得る。この仮説を、多数の種々の細胞株に対するM₄Nの抗増殖効果を試験することによって試験した。本発明の化合物であるNDGAの低い濃度（10μM）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以前に示されている（27）。しかし、この効果は、カテコール酸素の1つをブロックすること、またはNDGAに対する親水性基の付加によって回避され得る（28）。漸増量のNDGA誘導体であるM₄Nを、増殖を阻害するために必要とされる最適な濃度を決定するために、HPV-16/rasで形質転換したC3細胞株（29）の培養物について試験した（図9a）。細胞は、M₄Nに対して十分に応答して、40~60μMまでの濃度の範囲にわたって72時間後に細胞分裂をやめた。これらの濃度での3日後、細胞の数は、処置の開始時点（0日、図9）での数と等しいままであった。細胞の増殖におけるより穏やかな減少が、より低い薬物濃度で観察され、そしていくらかの細胞死が、60μMよりも大きい濃度で見られた。

【0064】

C3細胞株に対するM₄Nの抗増殖の影響は、単にSp1依存性のHPV-16/E6/E7オンコジーンプロモーターを非活性化する薬物の能力に起因するのではない。なぜなら、同様の増殖の阻害が、そのE6/E7オンコジーンがSp1依存性ではないレトロウイルスプロモーターの制御下にある、HPV-16で形質転換されたTC-1細胞株において観察されたからである（30）（図9d）。さらに、C33a細胞株（図9c）、HPVネガティブであるヒトの頸癌細胞株、およびCEM-T4株（図9b）、ヒトの白血病細胞株（31）の増殖もまた、M₄Nでの処理によってブロックされた。薬物で処理した4つの細胞株においては、停止した細胞のほぼ全て（>95%）が、M₄Nの濃度が「閾」値（C3細胞については60μM、TC-1細胞については40μMなど）を超えるまでは、生存可能であった。これらの濃度を上回ると、生細胞の割合が、急激に減少する。興味深いことに、停止した細胞は、薬物への長期化した曝露の後にもなお、>95%の生存性を維持した。C3細胞は、40μMのM₄Nでの処理の8日後に、細胞死の増大を示さなかった（図9e）。

【0065】

（実施例10：M₄Nで処理された細胞はG2期で停止する）

一旦、M₄Nで処理された細胞が、なお生存可能でありながら増殖を停止することが確立

10

20

30

40

50

されると、細胞DNA内容物の分析および細胞構造の蛍光試験を、細胞が停止する細胞周期における時点を決定するために使用した。 M_4N に対して72時間曝露した細胞は、コントロールと比較して、増大したG2/M DNA内容物を示した(図10a~d)。最も極端な応答は、C3およびCEMT4細胞株によって見られ、ここでは、>90%の細胞がG2/M DNA内容物を示す。

【0066】

G2での停止または有糸分裂のブロックとを区別するために、チューブリン(緑)およびチューブリン(赤)に対する抗体を、 M_4N での処理の72時間後のC3細胞株中の中心体の状態を決定するために使用した。図11aに示すように、 M_4N で処理した細胞の中心体は、2倍であったが、細胞の核中になお互いに隣り合って配置されている。中心体は前記の初期の間に分離するので、これらの細胞は有糸分裂を開始していないと結論付けられ得る。反対に、コントロール細胞のチューブリン染色は、G1またはS期に特徴的な散在性のパターンを有する(32)。 M_4N で処理した細胞中のクロマチンの濃縮の欠如もまた、DAPI染色を用いて観察され(図12b)、これは、細胞がG2期から先に進めないことのさらなる証拠である(33)。

【0067】

(実施例11: CDC2の産生は40μMの M_4N によって阻害される)

G2からの細胞の進行は、MPFの産生に依存する。そのタンパク質成分の状態を、40μMの M_4N で処理したC3細胞中で試験した。非同期の細胞を、1%のDMSO中に M_4N 、または1%のDMSOのみのいずれかを含有している培地の中で24時間または72時間、増殖させた。細胞を回収し、そして等量の全細胞性タンパク質を、ウェスタンプロットティングによって分析した。CDC2の量における明らかな減少を、 M_4N での処理の72時間後に観察した(図12a)。しかし、同じメンブレンを切り出し、そして再度プローブすることによって検出したサイクリンBのレベルは、変化しないことを見出した。これらの結果は、これらの条件下で、停止はおそらく、p53に対する応答ではないようであることを示す。なぜなら、p53の過剰発現がサイクリンBの減少を導くことが示されているからである(34、35)。ウェスタン分析の結果と一致して、CDC2キナーゼ活性は、 M_4N での処理の72時間で排除された(図12a)。これらの実験は、薬物がCDC2タンパク質の産生を阻害することによって作用し、それによってMPFの活性の喪失を生じるという見解を支持する。

【0068】

S p 1 依存性のウイルスの転写をブロックする M_4N の能力を実証する本発明者らの以前の研究は、CDC2タンパク質の減少の可能性のある機構として、CDC2 mRNA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(サイクリンBタンパク質の遺伝子はその発現のためにはS p 1を必要とはしない)が、正常なレベルで産生され、一方、CDC2タンパク質(CDC2タンパク質の遺伝子はそのプロモーター中に2つの必須のS p 1部位を有している)は、その量が実質的に減少されるという知見と一致する。この仮説を試験するために、ノーザンプロット分析を、5~72時間の間、40μMの M_4N で処理したC3細胞から回収したRNAについて行った。図12bに示すように、CDC2 mRNAの量は、 M_4N での処理のわずか24時間後に減少し、そして72時間後にはほぼ排除された。S p 1によっては調節されないハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの産生を、RNAローディングコントロールとして使用し、そしてそのレベルは、40μMの M_4N によっては影響を受けなかった。

【0069】

C3細胞株の使用は、本発明者らにとって、 M_4N によって媒介される細胞周期の停止の機構の分析のためのさらなるコントロールとなる。なぜなら、他のS p 1 依存性の遺伝子プロモーターもまた、おそらく、 M_4N での処理によって阻害されるからである。この可能性を、S p 1 依存性のHPV-16 E6/E7プロモーターからの転写物に対する M_4N の影響を分析することによって、C3細胞中で試験した。5から72時間の間40μMの M_4N で処理したC3細胞から単離したRNAのRT-PCR分析は、E7転写物のレ

10

20

30

40

50

ベルにおける明確な減少を示した(図12c)。GAPDHを、再び、この実験の内部コントロールとして使用し、そしてそのレベルは、薬物での処理によっては影響を受けなかった。これらの結果は、M₄NがSp1によって調節されるプロモーターの転写を減少させることのさらなる証拠を提供する。

【0070】

(実施例12:ゲル移動度シフトの分析における、G₄NによるSp1結合活性の阻害) Sp1ファミリーのタンパク質は、結合の際にDNAの主溝に対する湾曲を誘導する(36)。Sp1タンパク質のzincフィンガードメインは、GC Box配列である5'-GGGGCGGGG-3'の結合を担う。コンピューターによる分析によって、NDGAのアミノエステル誘導体であるG₄Nが、主溝においてこのような配列と安定な複合体を形成し得ると決定した。G₄NがSp1ブロッカー、ならびにSp1置換因子(disciplinacrer)として作用し得るかどうかを決定するために、本発明者らは、Sp1/エンハンサー相互作用研究を、G₄Nの存在下または非存在下で、試験するためのSp1のDNA結合ドメインのみを使用するゲル移動度シフトの分析によって行った。ブロッキング実験においては、種々の濃度のG₄Nを、最初に³²Pで標識したDNAとともに結合緩衝液中で25度30分間、インキュベートした。組換えSp1タンパク質のDNA結合ドメイン(Sp1-167D)を次に添加し、そしてさらに30分間、大過剰のBSAタンパク質の存在下でインキュベートした。置換実験においては、組換えSP1-167Dを最初にDNAに結合させ、次いでG₄Nをインキュベーションの第2の工程で添加した。G₄NおよびSp1-167D濃度、ならびにインキュベーションおよびゲル電気泳動の条件は、両方の実験において同一であった(実験の節)。図13に示すように、いずれの場合においても、G₄Nは、Sp1-167Dタンパク質との相互作用からDNAを維持することが可能であることを見出した。Sp1のDNA結合ドメインのみが試験される場合には、G₄Nは、ゲル移動度シフトの分析によって示されるように、エンハンサーに対して結合することからSp1をブロックするよりも、結合したSp1の置換においてより有効であるようであった(図13、A、B、D)。本発明者らはまた、結合したG₄NがSp1-167Dによって置換され得るかどうかを試験した。この実験においては、G₄NによるSp1-167Dの結合の阻害を、最初に移動度シフトの分析によって証明した(図13C、レーン2および5)。G₄Nが結合した錆型をさらなるSp1-167Dでチャレンジした場合には、本発明者らは、Sp1-167D/DNA複合体のバンドの強度の投与量依存性の増大を観察し(図6C、レーン6、7)、このことは、この錆型からのSp1-167DによるG₄Nの置換を示す。

【0071】

(実施例13:G₄NによるHIVプロモーター活性のSp1によって調節されるTatトランス活性化の阻害) 以前に報告されているように、メチル化NDGA誘導体は、HIV、HSVのICP4、HPVのE6/E7遺伝子を含む種々のウイルスのプロモーターのエンハンサー部位へのSp1の結合をブロックし得る(37、38、39)。本発明者らはさらに、以前に記載されているような、SEAPアッセイにより、Cos細胞中のHIVプロモーター活性のTatトランス活性化に対するG₄Nの影響を試験した。基底レベルのHIV-LTRによって駆動されるSEAPの発現は、Cos細胞中でからうじて検出可能であることが以前に見出された。Cos細胞がCMVプロモーターによって駆動されるTat遺伝子で同時トランスフェクトされる場合には、SRAPの発現において60倍以上の増大が存在する(37)。このような、HIV-LTRプロモーター活性のTatによって駆動されるトランス活性化は、Sp1によって調節されることが以前に示されている(37、40)。本発明者らは、G₄Nの存在下で、用量依存性の様式でのHIVのトランス活性化の阻害を観察した(図14)。G₄Nについての36μMのIC₅₀値の平均値は、3-O-メチルNDGAであるM_{1.4}のもの(IC₅₀ 25μM)に匹敵し、そしてテトラ-メチルNDGAであるM₄Nのもの(IC₅₀ 11μM)よりもいくらか高かった。この差異はおそらく、細胞への薬物の取り込みに影響を与える試験化合物の化学的な性質に起因する。

10

20

30

40

50

【0072】

(実施例14: G_4N による細胞培養物中でのSIV-1およびHIV-1の産生の阻害)
) HIV-1およびSIVの両方ともが、レトロウイルスであり、これらは、それらの複製を完全にするために宿主ゲノムへの組込みを必要とする。これらの両方ともが、それらのプロウイルスの転写のために宿主の転写因子に依存する。Sp1は、ほぼ同一の態様の転写の調節を共有しているこれらの2つのウイルスにおいて、このような発現のための中心的な役割を果たす。SIVに感染したアカゲザルを G_4N の抗ウイルス効果を試験するための動物モデルとして使用する予想においては、本発明者らは、174×CEM細胞中のSIVの阻害における G_4N の効果と、H9細胞中のHIVの阻害における効果とを研究し、そして比較した。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の阻害の研究のために、 10^7 個の174×CEM細胞を、高力価のSIVmac239ストックとともに37で2時間混合し、次いで、吸着されていないウイルスを除去するために冷却したPBS緩衝液で2回洗浄した。細胞懸濁物を、3個の96ウェルプレートのそれぞれのウェルに等分した。種々の濃度の G_4N 溶液を、新しく調製したストックから作製し、そして別々に等分し、そして1つの96ウェルプレート中の列の6個のウェルのそれぞれに入れた。培養上清を、感染後(P.I.)4日毎に回収し、そして適切な濃度の薬物を含有している新しい培地を上清の回収後に培養物に添加した。ウイルスの産生を、示すように(図15)、改変したp27コア抗原捕捉ELISAによってアッセイした。5μMより高い濃度で G_4N を使用した場合には、SIVの産生は検出されなかった。2.5μMよりも低い G_4N 濃度では、SIVの産生は、薬物の非存在下でのウイルスの産生と比較して、4日目および8日目の感染後培養物に由来する培養上清中で検出された(図15)。 G_4N (250μM以下)は、MTTアッセイによって決定した場合は、感染させていない174×CEM細胞に対しては毒性の影響を示さなかった。同様の実験を、H9細胞において G_4N によるHIV-1の阻害の研究のために行った。H9細胞を、 $1 \times 10^5 / ml$ で継代培養し、そしてHIV-1のAZT耐性株(HIV-1RTMF)を用いて感染させた。種々の濃度の G_4N を、感染の2時間後に添加した。新しい培地との交換を、4日ごとに行った。 G_4N の存在下での細胞の増殖を、9日の実験期間の間、注意深くモニターした。ウイルスの産生を、p24コア抗原捕捉ELISAによってアッセイした。示すように(図16)、80μMの濃度の G_4N は、H9細胞中のHIVの複製を完全に阻害した。HIV-1 RTMFの阻害については、12μM G_4N のIC₅₀を見出した。再び、アッセイの範囲内(および250μM未満)では未感染のH9細胞に対する毒性は検出されなかった。

【0073】

本明細書中に引用した参考文献を、利便性のために以下に列挙し、そして参考として本明細書によって援用する。

【0074】

【表4】

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.)
5. Murray, A.W., 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.)
7. Hwu, J. R., Tseng, W. N., Gnabre, J., Giza, P. and Huang, R. C. C. (1998) Antiviral Activities of Methylated Nordihydroguaiaretic Acids (I) Synthesis, Structure Identification and Inhibition of Tat Regulated HIV Transactivation. *J. Med. Chem.* 41:2994-3000.
8. Gnabre, J.N., et al., Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription and Replication by DNA Sequence-Selective Plant Lignans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 11239-11243.(1995.)
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.)

(参考文献)

10. Craigol, 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. (1997) Mini Review. Cellular Factors as Alternative Targets for inhibition of HIV- 1. *Antiviral Res.* **33**, 144 i -1452.
12. Gnabre, J. N., Brady, J. N., Clanton, D. J., Ito, Y., Dittmer, J., Bates, R. B. and Huang, R. C. (1995) 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.
13. 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.
14. 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.
15. Hwu, J. R., Tseng, W. N., Gnabre, J., Giza, P. and Huang, R. C. C. (1998) Antiviral Activities of Methylated Nordihydroguaiaretic Acids (I) Synthesis, Structure Identification and Inhibition of Tat Regulated HIV Transactivation. *J. Med. Chem.* **41**:2994-3000.
16. Chen, H., Teng, L., Li, J.-N., Park, R., Mold, D. E., Gnabre, J., Hwu, J. R., Tseng, W. N. and Huang, R. C. C. (1998) Antiviral Activities of Methylated Nordihydroguaiaretic Acids (II) Targeting Herpes Simplex Virus replication by the Mutation Insensitive Transcription Inhibitor Tetra-O-methyl-NDGA. *J. Med. Chem.* **41**:3001-3007.

(表4の27'3)

17. Honess, R. W., and Roizman, B. (1988) Regulation fo Herpes Virus Macromolecular Synthesis. 1. Cascade Regulation of Synthesis of Three Groups of Viral Proteins. *J. Virol.* 1974, 14, 8.

18. Courrey, A. J., and Tjian. R. (1988) Analysis of Sp1 in vivo Reveals Multiple Transcription Domains. Including a Novel Glutamine-rich Activation Motif. *Cell* 55, 887.

19. Some of the Sp1-regulated cellular genes: Sartorelli, V.; Webster, K. A.; Kedes, L. Muscle-specif~c expresison of the cardiac alpha-actin gene requires myoD1, CarG-hox binding factor and Sp1. *Gene Dev.* 1990, 4, 1811. Dailey, L.; 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-I binding at the initiation site. *Mol. Cell Biol.* 1990, 10, 653.

Abravaya, K.; Phillips, B.; Morimoto, R. I. Heat shock-induced interaction so 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 fo a human epidermal keratin gene: Sequences and nuclear factors involve din 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 huyman cmyc promoter. *Mol. Cell Biol.* 1993, 13, 5710. Sanchez, H. B.; Yieh, L.; 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 form growth hormone gene promoter. *Mol.I Cell. Biol.* 1990, 10, 1811.

(第4の77'3.)

20. 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.

21. 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. 10

22. 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.

23. 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. 20

24. Jacob, S. W. and Herschler (1986) Pharmacology of DMSO. *Academic Press, Inc.*

25. Jack, C., and Torre, de la (1983) Biological Actions and Medical Applications of Dimethyl Sulfoxide. New York Academy of Sciences, New York, N.Y. 30

26. 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.

27. Biswal, S.S., et al., Glutathione Oxidation and Mitochondrial Depolarization as Mechanisms of Nordihydroguaiaretic Acid-induced Apoptosis in Lipoxygenase-deficient Fl5.12 Cells. *Toxicol. Sci.*, 53, 77-83.(2000.) 40

(参考文献)

28. 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-Transfomed Cells. *Eur. J. Immunol.*, **23**, 2242-2249.(1993.) 10

30. 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.)

31. Foley, G.E., et al., Continuous Culture of Human Lymphoblasts From Peripheral Blood of a Child With Acute Leukemia. *Cancer*, **18**, 522-529.(1965.)

32. Shiebel, E., Gamma-Tubulin Complexes: Binding to the Centrosome, Regulation and Microtubule Nucleation. *Current Opinion Cellular Biology*, **12**, 113-118.(2000.) 20

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

34. Taylor, W.R., et al., Mechanisms of G2 Arrest in Response to Overexpression of p53. *Molecular Biology of the Cell*, **10**, 3607-3622.(1999.)

35. Innocente, S.A., et al., p53 Regulates a G2 Checkpoint Through Cyclin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2147-2152.(1999.) 30

36. Sjottem, E.; Anderson, C.; Johansen, T. Structural and Functional Analyses of DNA Bending Induced by Sp1 Family Transcription Factors. *J.Mol. Bio.*, **1997**, 267, 490-504.

37. Gnabre, J.N.; Brady, J.N.; Clanton, D.J.; Ito, Y.; Dittmer, J.; Bates, R.B.; huang, R.C. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription and Replication by DNA Sequence-Selective Plant Lignans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, 92, 11239-11243

38. Chen, H.; Teng, L.; Li, J.N.; Park, R.; Mold, D.E.; Gnabre, J.; Hwu, J.R.; Tseng, W.N.; huang, R.C. Antiviral activities of Methylated Nordihydroguaiaretic Acids. 2. Targeting Herpes Simplex Virus 40

(表4のつづき)

Replication by the Mutation Insensitive transcription Inhibitor Tetra-O-Methyl - NDGA J. Med. Chem., 1998, 41 (16), 3001-3007.

39. Craig, J.; Callaham, M.; Huang, R.C.; DeLucia, A.L. Inhibition of Human Papilloma virus Type Gene Expression by Nordihydroguaiaretic Acid Plant Lignan Derivatives Antiviral Res. 2000 In Press.

40. Hwu, J.R.; Tseng, W.n.; Gnabre, J; Giza, P.; Huang, R.C. Antiviral Activities of Methylated Nordihydroguaiaretic Acids. 1. Synthesis, Structure Identification and Inhibition of Tat-Regulated HIV Transactivation. J.Med. Chem., 1998, 41 (16), 2994-3000.

41. 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., 1989, 81(8), 557-586.

10

20

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、M₄NおよびG₄Nの構造を示す。【図2】 図2Aは、E₆ / E₇プロモーターの領域 (pPV16P97) およびSp1タンパク質への結合部位を示す、HPV-16LCRを示す。図2Bは、C-33A細胞中でのE₆ / E₇プロモーター活性に対するM₄Nの影響を示す（種々の濃度のM₄Nによるルシフェラーゼ遺伝子の転写により駆動されるE₆ / E₇プロモーターの阻害）。

30

【図3】 図3A～3Cは、40 μMのM₄Nによる、ウイルスのE₆およびE₇ RNA転写物の阻害を示す。増殖培地中で71時間、40 μMのM₄NまたはDMSOのみのいずれかで処理したC3細胞から単離した全RNAを、比較RTPCRに供した。RTPCRサンプルを、増加した増幅サイクルの後で取り出し、そしてアガロースゲル上で分析した。ゲル写真(3Aおよび3B)は、これらのサイクルでの、増殖培地中でのM₄Nの存在(+)または非存在(-)を示し、そしてサイズマーカーとして使用したpGMTベクターの2つの消化物を示した。増幅マップ(3C)は、2つの予想される大きさの増幅産物を示し、これらは、初期のウイルスのRNA転写物の異なるスプライシングによって得られた。【図4A】 図4Aは、M₄NによるC3細胞の増殖の阻害を示す。

40

【図4B】 図4Bは、M₄Nの除去後のC3細胞の増殖の阻害を示す。【図5】 図5A～5Bは、GENE Assay分析によって試験した、C3細胞中の遺伝子発現に対するM₄Nの影響を示す。5A. DMSA処理の>2時間後のC3細胞中で発現されるGENE(C3 DMSO)。5B. 溶媒としてDMSOを使用するM₄N処理の>2時間後のC3細胞中で発現されるGENE(C3 M₄N)。【図6】 図6A～6Bは、M₄N処理後の腫瘍保有マウスの目視観察を示す。6A. 単一の腫瘍を保有しているマウスを、DMSO(#3)またはM₄N(#7)のインサイチュでの注射で処置した。M₄Nのインサイチュでの注射はまた、マウス#9において増殖した2つの腫瘍のうちの1つに対してもなされた。6B. 表2に記載するような、同じマウス#9に由来する未処置の腫瘍およびM₄Nで処置した腫瘍(白色の瘢痕)。

50

【図7】 図7は、マウス中での腫瘍の増殖に対する、M₄NおよびM₄N/G₄Nの組織病理学的な影響を示す。

パネルの第1列目は、DMSOでの処置(CON)後の、マウス#12、10、27、および20(M₄N)由来の比較的少量の薬物で処置した(M₄NまたはM₄N/G₄N)病変と比較した、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、1000×の倍率で試験したこれらの腫瘍の例である(A、B、C、DMSOで処置したマウス、D、未処置のマウス、E、F、G、H、M₄NまたはM₄N/G₄Nで処置したマウス)(表1および表2)。

【図8】 図8は、薬物の非存在下(HSV-C、HSV-SC)、有効ではない薬物の存在下(ABDS₁['HSV-ABDS₁']、ABDS₂['HSV-ABDS₂']])、および有効な薬物の存在下(M₄N['HSV-4N'])およびACV['HSV-ACV']でのHSV-1の複製を示す。

【図9】 図9は、M₄Nが哺乳動物細胞中で増殖の停止を生じることを示す。(a~d) C3、CEM-T4、C33a、およびTC-1細胞を、種々の濃度のM₄Nで処理した。実験の開始時に存在する細胞の数を、0日として示す。3日後、生存可能な細胞の数を計数し、そしてM₄Nの濃度に対してプロットした。(e) C3細胞を、T-25フラスコ中に分け、1つのフラスコあたり5×10³個の細胞を有するようにし、そして培地中の1%のDMSO中のM₄N、または培地中の1%のDMSOのみのいずれかを入れた(最初の培地交換)。3日後、M₄Nで処理した細胞の1/2に、1%のDMSOのみを含有している新しい培地(M-D)を入れ、一方、残りの細胞には、同じ条件で新しい培地を入れた(第2回目の培地交換)。細胞を毎日計数し、そして処理の回数に対してプロットした。

【図10】 図10は、M₄Nで処理した細胞はG2/M中で停止することを示す。C3細胞(a)、C33a細胞(b)、CEM-T4細胞(c)、およびTC1細胞(d)を、1%のDMSO、またはM₄Nとともに1%のDMSO(M₄N)のいずれかを含有している培地中で3日間、増殖させた。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、そして続いてフローサイトメトリーによって分析した。データを、細胞の数(3~5×10⁴個の全細胞)対ヨウ化プロピジウムでの染色の強度として表示した。細胞周期の示される段階が標識され、そして染色強度によって決定されるように、相対的な細胞性のDNAの引き立たせ(component)に対応する。

【図11】 図11は、40μMのM₄Nで処理したC3細胞がG2細胞の構造を実証することを示す。C3細胞を、1%のDMSO(コントロール)、または40μMのM₄Nとともに1%のDMSO(M₄N)のいずれかを含有している培地中で3日間、カバースライド上で増殖させた。サンプルをエタノールで固定し、そして(緑)および(オレンジ)チューブリンに対する抗体(a)、またはDAPI-DNA染色(b)とともにインキュベートした。細胞を、蛍光顕微鏡で試験した。

【図12】 図12は、CDC2およびウイルス癌遺伝子がM₄Nによって減少されることを示す。C3細胞を、1%のDMSO(D)、または40μMのM₄Nを含む1%のDMSO(M)のいずれかを含有している培地中で、種々の時間(数字は時間で)の間増殖させた。示された時間の後、全タンパク質または全RNAを細胞から単離した。ウェスタンプロット(a-上段の2つのパネル)を、CDC2またはサイクリンBに対する抗体を使用して、同じニトロセルロースフィルターを用いて行った。キナーゼアッセイ(a-下段の2つのパネル)を、-³²P-ATPおよびヒストンH1とのインキュベーションによる、サイクリンBに対する抗体での免疫沈降の後で行った。PAGEゲルのクマシ染色を、ローディングのコントロールとして含んだ。24時間および72時間の薬物での処理についてのキナーゼアッセイを、別々に行った。

ノーザンプロット(b)を、全RNA抽出物について行った。フィルターを、CDC2またはGAPDHについてのランダムプライムした³²P標識したDNAとともに一晩インキュベートし、洗浄し、そして3日間フィルムに対して暴露した。同じフィルターを、CDC2およびGAPDH RNAを試験するために使用した。

10

20

30

40

50

r t P C R 分析 (c) を、 H P V - 1 6 E 7 または G A P D H のいずれかの領域に対してハイブリダイズするプライマーを用いて、全 R N A 抽出物について行った。両方のプライマー対を、同じ条件で使用し、そして生成物をアガロースゲル電気泳動によって分析した。

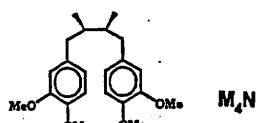
【図 1 3】 図 1 3 は、 H I V S p 1 結合部位 (- 8 7 から - 4 9) との G₄N の相互作用の、電気泳動の移動度のシフトアッセイ (E M S A) を示す。 (A) ³²P で標識した H I V S p 1 D N A テンプレートへの S p 1 - 1 6 7 D の結合の G₄N による阻害。 レーン 1 、テンプレートのみ； レーン 2 、テンプレートおよび 0 . 1 μ g の S p 1 - 1 6 7 D ； レーン 3 ~ 9 、漸増濃度の G₄N (0 . 1 μ g の S P 1 - 1 6 7 D の添加の前に、 0 . 2 5 ~ 1 . 7 5 m M) とともにインキュベートしたテンプレート。 (B) H I V テンプレートに結合した S p 1 - 1 6 7 D の G₄N 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 S p 1 - 1 6 7 D および 1 0 0 倍過剰の未標識のテンプレート； レーン 3 、テンプレートおよび 0 . 1 μ g の S p 1 - 1 6 7 D ； レーン 4 ~ 1 0 、漸増濃度の G₄N (0 . 2 5 ~ 1 . 7 5 m M) とともにチャレンジした S p 1 / D N A 複合体； レーン 1 1 、 1 . 7 5 m M の G₄N を含有している反応緩衝液中でインキュベートしたテンプレート。 (C) テンプレートに結合した G₄N の S p 1 - 1 6 7 D 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漸増量の S p 1 - 1 6 7 D (0 . 0 7 5 、 0 . 1 5 0 、 0 . 3 0 0 μ g) ； レーン 5 ~ 8 、 1 . 2 m M の G₄N を含有している反応緩衝液中でインキュベートし、 続いて漸増量の S p 1 - 1 6 7 D (0 . 0 7 5 、 0 . 1 5 0 、 0 . 3 0 0 μ g) でチャレンジしたテンプレート、 レーン 8 、 S p 1 - 1 6 7 D を受容させなかった。 (D) G₄N の漸増濃度に応答して減少する S p 1 - 1 6 7 D / D N A 複合バンドの強度のプロットは、 (A) - - - - - および (B) - - - - - を使用した。 使用したゲルは、 5 % の非変性ポリアクリルアミドであり、 それぞれのレーンに、実験のセクションおよび R e f [1] に記載するように、 それぞれの反応容量の 5 μ l を受容させた。

【図 1 4】 図 1 4 は、 G₄N による C o s 細胞中での H I V T a t によって調節されるトランス活性化の阻害を示す。

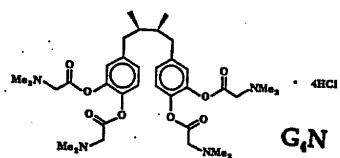
【図 1 5】 図 1 5 は、 G₄N の存在を伴う S I V の產生を示す。 1 0 ⁷ 1 7 4 × 細胞を、 2 4 時間混合し、 3 7 で 2 時間の間、 S I V m a c 2 3 9 (4 n g の p 2 7) のストックを回収した。 細胞を再懸濁し、 そして 1 0 0 μ l の培地中の 1 × 1 0 ⁵ 細胞を、 3 個の 9 6 ウエルプレートのそれぞれのウェルに対して添加した。 新しく作成したストックから種々の濃度の G₄N を調製し、 そして 6 個の指定したウェルのそれぞれに添加した。 培養上清を、 ウィルスの產生の分析のために、 4 日および 8 日後に回収した。 ウィルスの產生を、 実施例のセクションに記載するように、 改変した p 2 7 キャプシドタンパク質抗原捕捉 E L I S A によってアッセイした。

【図 1 6】 図 1 6 は、 G₄N による H 9 細胞中での H I V p 2 4 抗原の產生の阻害を示す。 阻害の割合を、 A Z T 耐性 H I V 株である H I V - 1 R T M F でのウィルス感染の 9 日後に、 G₄N で処理した H 9 細胞、 および処理していない H 9 細胞の 2 つの 2 連の培養物の平均から p 2 4 レベルを比較することによって計算した。

〔 図 1 〕

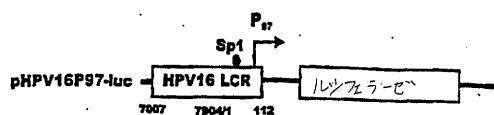


meso-1,4-ビス(3,4-ジメチルシフェニル)-(2R,3S)-ジメチルエタン



meso-1,4-ビス[3,4-(ジメチルアミ)アセトキ]フェニル]-(2R,3S)-ジメチルブタン二酸

〔 図 2 〕



C33A細胞におけるpPVP97-ペニシラーゼ活性に対するM₄Nの効果

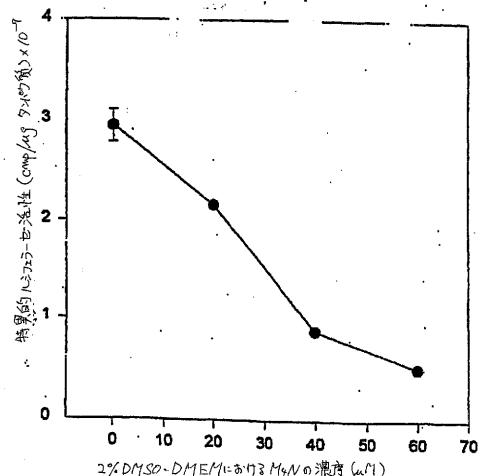


FIGURE 2

(3)

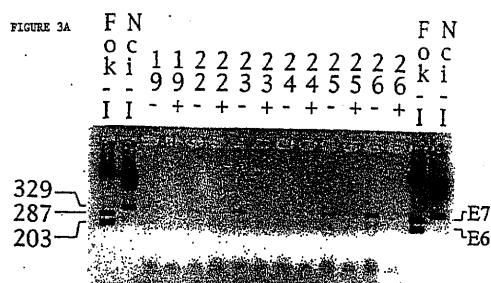
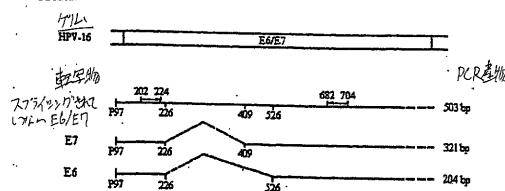


FIGURE 3B

	F N										R N										
O C	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	O C	2	2	2	2	3	3	3	3	3	
K i	7	7	8	8	9	9	0	0	0	0	K i	7	7	8	8	9	9	0	0	0	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
I I	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	A A	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
329	-										-										E7
287	-										-										E6
203	-										-										E6

FIGURE 3C.



〔 図 4 A 〕

40_MM4Nの有りおよび無しでのC3の増殖

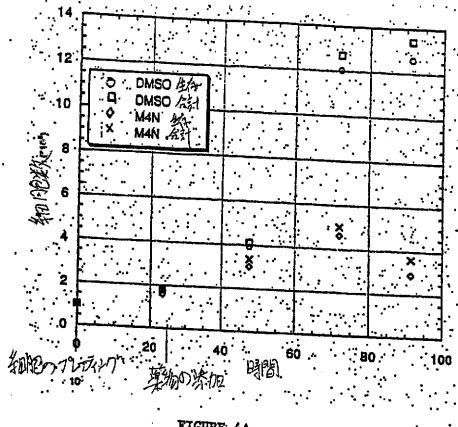


FIGURE 4A

【図4B】

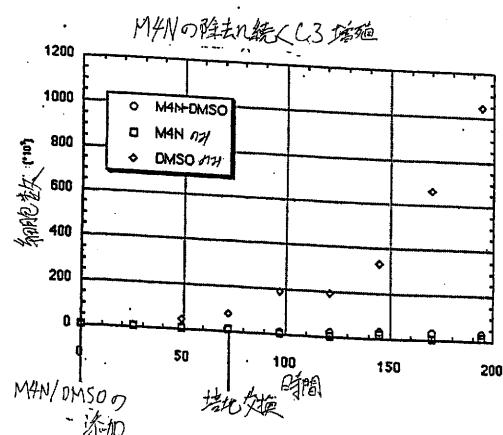
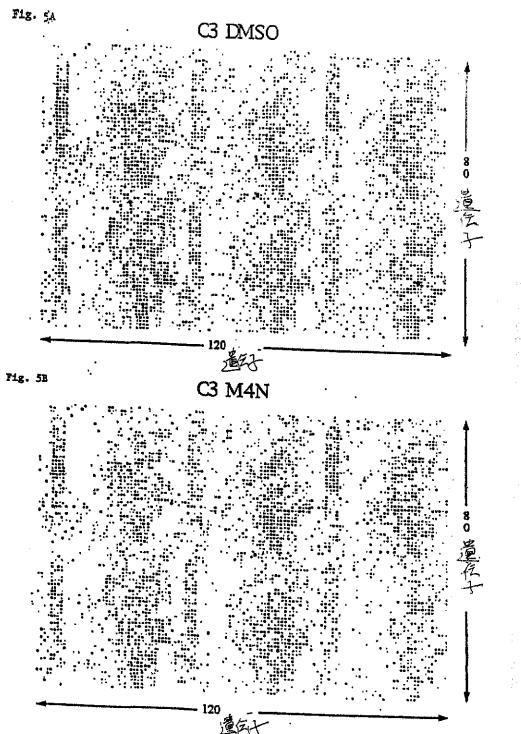


FIGURE 4B

【図5】



【図6】

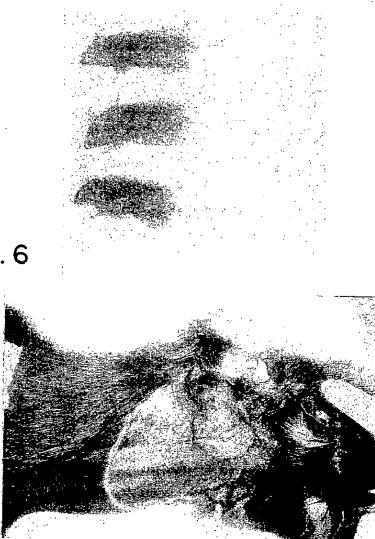


FIG. 6

【図7】

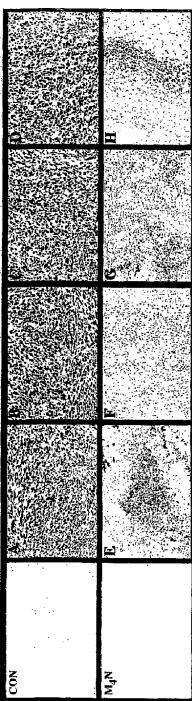


FIG. 7

【図8】

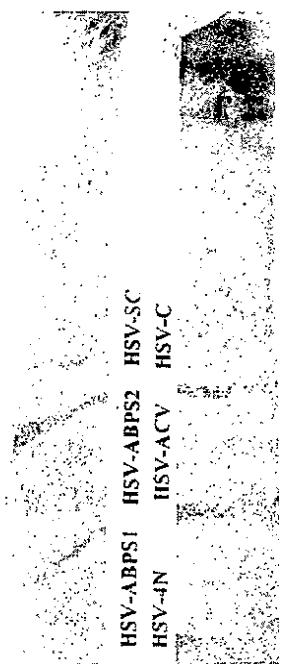
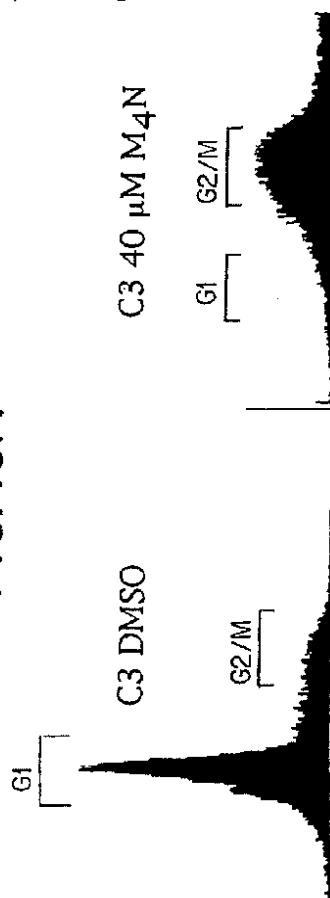


FIG. 8

FIG. 10A



【図10A】

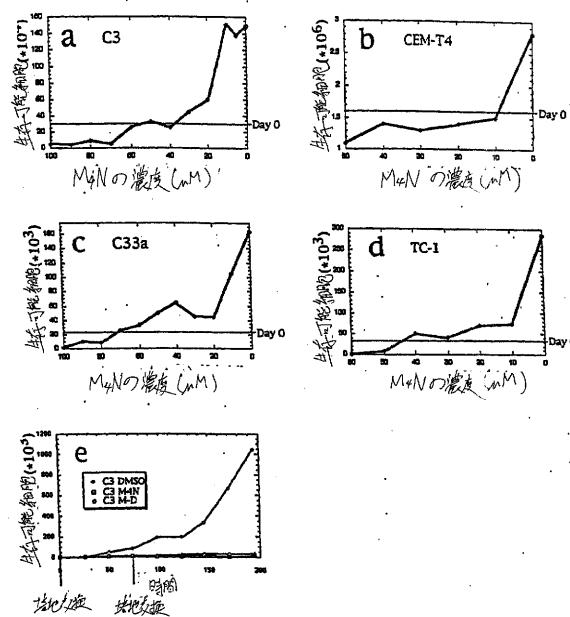
FIG. 10B

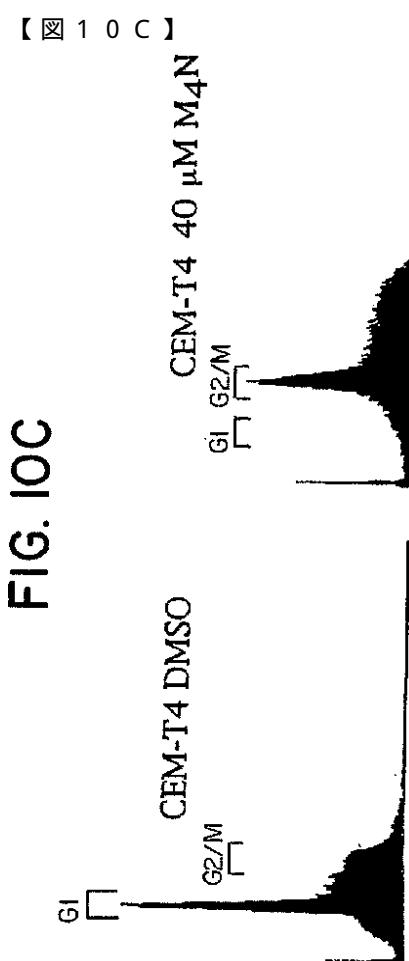


【図10B】

【図9】

FIGURE 9





【図 11】

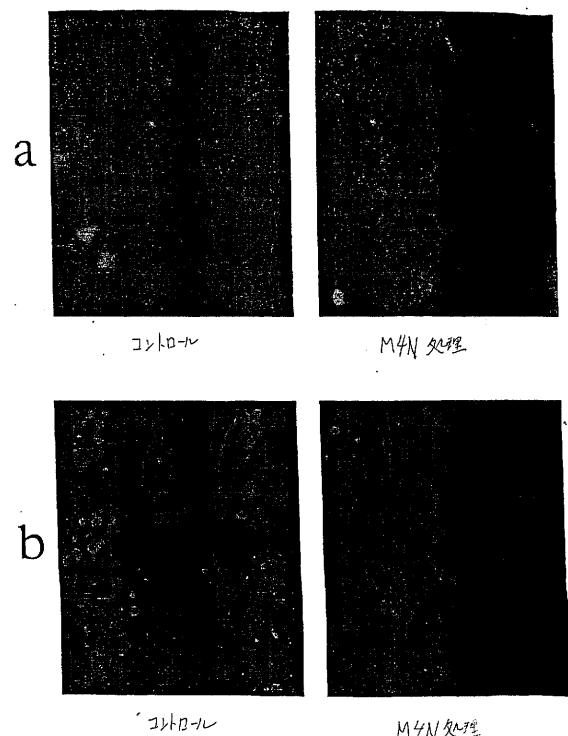
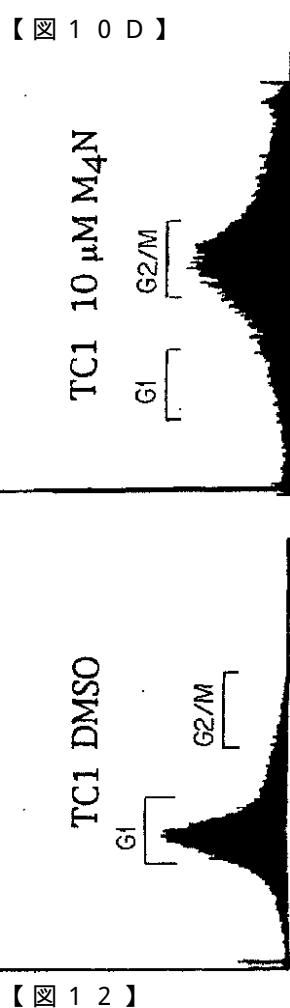
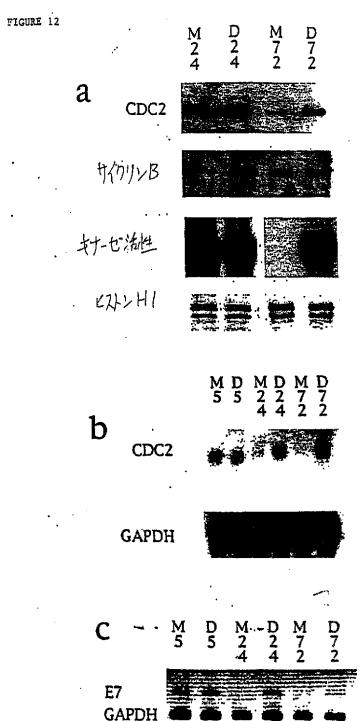


FIGURE 11



【図 12】



【図13】

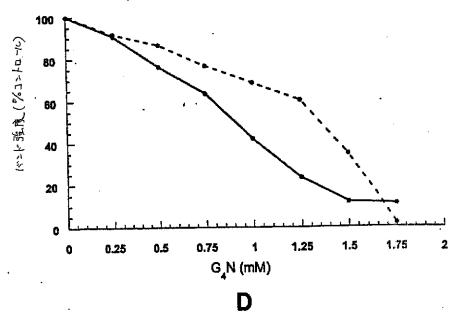
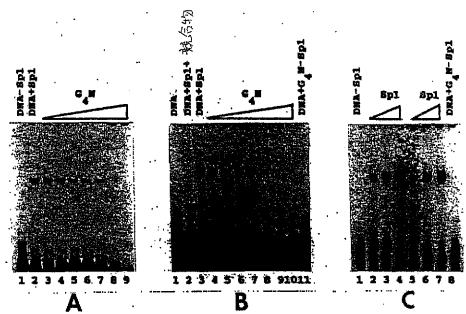
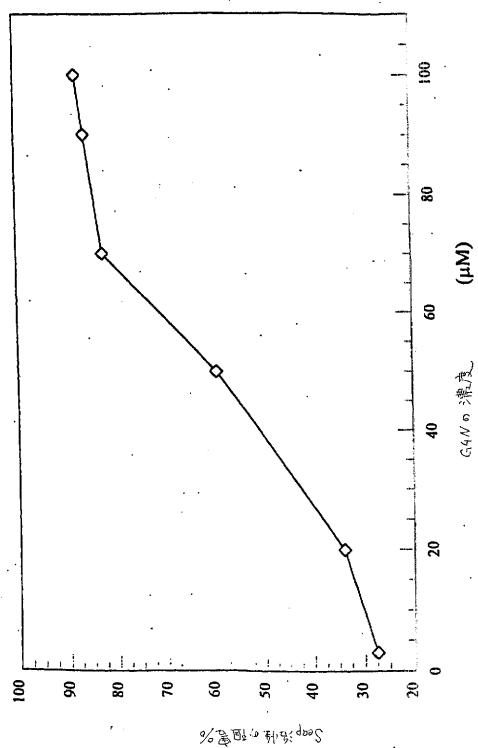
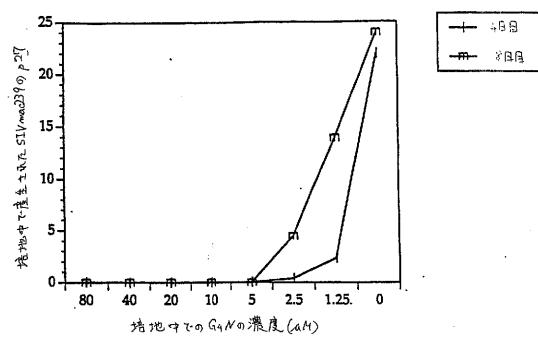


FIGURE 13

【図14】



【図15】



【図16】

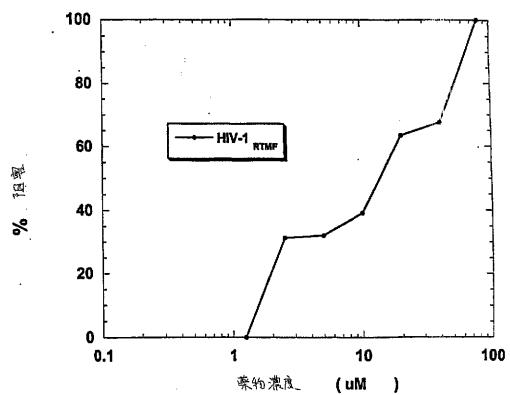


FIGURE 16

フロントページの続き

(72)発明者 ファン, ルチシー.
アメリカ合衆国 メリーランド 21218, バルチモア, ノース チャールズ ストリート
3400, ジョンズ ホプキンス ユニバーシティ

(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 21222, ダンダルク, ビーチ ドライブ 8208

(72)発明者 ウ, ジル
台湾 シンチュウ 30043, ナショナル シン フア ユニバーシティ, デパートメント
オブ ケミストリー, オルガノシリコン アンド シンセシス ラボラトリー

(72)発明者 キング, ケヤン
台湾 シンチュウ 30043, ナショナル シン フア ユニバーシティ, デパートメント
オブ ケミストリー, オルガノシリコン アンド シンセシス ラボラトリー

(72)発明者 ハキメラヒ, ジョラム ホセイン
台湾 タイペイ 11529, ナンカン, アカデミア シニカ, インスティチュート オブ
ケミストリー

審査官 天野 貴子

(56)参考文献 特開昭64-079112 (JP, A)

Gnabre JN, Ito Y, Ma Y, Huang RC. , Isolation of anti-HIV-1 lignans from *Larrea tridentata* by counter-current chromatography. , Isolation of anti-HIV-1 lignans from *Larrea tridentata* by counter-current chromatography. , 1996年 1月 8日, 719(2), 353-364

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/223

C07C 229/12

CA(STN)

REGISTRY(STN)