

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-508335

(P2004-508335A)

(43) 公表日 平成16年3月18日(2004.3.18)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/191	A 6 1 K 31/191	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/341	A 6 1 K 31/341	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/375	A 6 1 K 31/375	
A 6 1 K 31/704	A 6 1 K 31/704	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-524507 (P2002-524507)	(71) 出願人	502156490
(86) (22) 出願日	平成13年8月24日 (2001.8.24)		オキシカル・ラボラトリーズ・インコーポ
(85) 翻訳文提出日	平成14年5月1日 (2002.5.1)		レイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/026455		アメリカ合衆国、アリゾナ州 86301
(87) 国際公開番号	W02002/020023		プレスコット、インター・カル・ウェイ
(87) 国際公開日	平成14年3月14日 (2002.3.14)		6734
(31) 優先権主張番号	09/654,377	(74) 代理人	100058479
(32) 優先日	平成12年9月1日 (2000.9.1)		弁理士 鈴江 武彦
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100084618
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), AU, CA, CN, IS, JP, KR, M X, NO, NZ, SG, TR, US		弁理士 村松 貞男
		(74) 代理人	100092196
			弁理士 橋本 良郎
		(74) 代理人	100095441
			弁理士 白根 俊郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌化学療法剤を増強するための方法および組成物

(57) 【要約】

【課題】 癌化学療法剤を増強するための方法および組成物

【解決手段】 癌化学療法剤の効果は、ミネラル・アスコルベート、ビタミンC代謝物および/またはビタミンC由来フラノン、例えば4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノンとの組合せにより増強する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

化学療法剤、並びに、ミネラル・アスコルベート、ビタミンC代謝物、およびアスコルビン酸由来フラノン、並びにその混合物からなる群から選択されたメンバーである増強剤を含む癌化学療法組成物。

## 【請求項 2】

前記化学療法剤はドキソルビシンであり、前記ミネラル・アスコルベートはアスコルビン酸カルシウムであり、前記代謝物はトレオン酸カルシウムであり、前記フラノンは4 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 3 ( 2 H ) - フラノンである、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

前記増強剤は、4 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 3 ( 2 H ) - フラノンである、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

ドキソルビシンおよび4 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 3 ( 2 H ) - フラノンを含む癌化学療法組成物。

## 【請求項 5】

腫瘍細胞を請求項 1 に記載の組成物と接触させることを含む、癌化学療法。

## 【請求項 6】

腫瘍細胞を請求項 2 に記載の組成物と接触させることを含む、癌化学療法。

## 【請求項 7】

腫瘍細胞を請求項 3 に記載の組成物と接触させることを含む、癌化学療法。

## 【請求項 8】

腫瘍細胞を請求項 4 に記載の組成物と接触させることを含む、癌化学療法。

## 【請求項 9】

癌化学療法組成物の製造における、4 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 3 ( 2 H ) - フラノンの使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本出願は、2000年9月1日に提出された発明者の同時係属米国特許出願番号第09/654,377号の一部継続出願であり、それに基づく優先権を主張する。

## 【0002】

## 【発明の背景】

本発明は、癌化学療法剤の効力を増強する方法および組成物に関する。

## 【0003】

別の点において、本発明は、癌化学療法剤の効力を向上することが可能であり、よって、これらの薬剤を、前記薬剤の効力を犠牲にすることなく、より低い容量比で使用できるような方法および組成物に関する。

## 【0004】

さらに別の態様において、本発明は、癌細胞アポトーシスを引き起こすか、または増殖速度を減少させる、またはその両方である、化学療法成分の組合せを含む、癌化学療法組成物に関する。

## 【0005】

数多くの癌化学療法剤が知られている。しかし、多くの場合、効果的な容量比での前記薬剤の投与により、その有用性を重度に制限する望ましくない副作用が引き起こされ得る。従って、前記薬剤の化学療法効果を増強し、よって、より低い容量比で効果的に投与でき、これにより、前記の望ましくない副作用は減少または消失する、方法および組成物を提供することは非常に望ましい。別に、前記方法および組成物により、副作用を増加することなく、一定量の化学療法剤の投与から、より大きな化学療法効果を得ることが可能となる。

## 【0006】

10

20

30

40

50

## [ 図面の簡単な説明 ]

発明者は今回、癌化学療法剤の化学療法効果（癌細胞増殖速度の減少および/または癌細胞アポトーシス）は、前記癌化学療法剤を、ミネラル・アスコルベート、ビタミンC代謝物、およびビタミンC由来フラノン、並びにそれらの2つ以上の混合物からなる群から選択したメンバーと配合することにより、有意に増強することを発見した。この技術により、同じ癌化学療法効果が、有意により低い容量比で得られ、化学療法剤を単独投与する場合に必要な速度の僅か約10分の1の容量比で得られる場合もある。さらに、発明者は、前記フラノンは、ミネラル・アスコルベート並びにミネラル・アスコルベートと他のビタミンC代謝物の混合物の腫瘍細胞毒性および/または抗増殖効果を増強することを発見した。

10

## 【0007】

本発明の今回の好ましい実施形態において、発明者は4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)フラノンを、別の癌化学療法剤と組合せる増強成分として使用して、フラノンまたは他の化学療法剤単独よりも大きな化学療法能を有する組成物を得る。次いで、これにより、化学療法剤を単独で、しかしより高い投与量で使用した場合に得られるであろうものと同じ選択的化学療法効果を達成するのに、他の化学療法剤をより少ない投与量で使用できる。

## 【0008】

## 【発明の詳細な記述】

本発明の組成物のフラノン成分は、任意の適切な技術により合成できる。別法として、フラノンと、米国アリゾナ州プレスコット(Prescott, Arizona)所在インターカル社(Inter-Cal Corporation)の登録商標「エステル-C(Ester-C)」で市販で入手可能である血漿に可溶性のミネラル・アスコルベートの混合物を使用できる。

20

## 【0009】

本発明の特に好ましい実施形態によると、発明者は、ドキシソルピシン(アドリアマイシン)、並びに、血漿に可溶性のミネラル・アスコルベート、ビタミンC代謝物およびビタミンC由来フラノンおよびその2つ以上の混合物からなる群から選択されるメンバーである増強剤を含む組成物を提供する。ミネラル・アスコルベートは、無毒性の金属アスコルベート、例えばアスコルビン酸カルシウム、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸亜鉛、アスコルビン酸マグネシウム等である。ビタミンC代謝物は、デヒドロアスコルビン酸、トレオース、エリトレオース、3-ヒドロキシコウジ酸、5-ヒドロキシマルトール、アルドン酸、例えばトレオン酸、キシロン酸およびリキソン酸およびその無毒性ミネラル塩、例えばトレオン酸カルシウム、および対応するアルドノ-ラクトンおよびラクチドを含む。ビタミンC由来フラノンは、例えば、4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノンおよび関連フラノンを含む。

30

## 【0010】

本発明の方法は、上記の増強した癌化学療法組成物の、癌化学療法投与量を、1回投与量または反復投与量として投与することを含む。投与は、癌化学療法剤の投与に通常使用される任意の適切な技術、例えば経口または非経口的な注射であり得る。

40

## 【0011】

## 【例示的实施例】

以下の実施例は、本発明の実施およびその現時点での好ましい実施形態を説明するために提示するものである。これらの実施例は単なる例示であり、特許請求の範囲によってのみ規定される本発明の範囲を限定するものではない。

## 【0012】

## 実施例1

本実施例は、種々のヒト腫瘍由来型および正常細胞型に対する、代表的なフラノンである4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノン、ビタミンC代謝物の細胞死性能、すなわち細胞毒性能を示す。

50

## 【0013】

以前に、ミネラル・アスコルベートと代謝物の組合せに対して感受性であることが示された4つのヒト腫瘍細胞型を評価する。これらの系は、(i)肝腫瘍(SK-Hep-1)、(ii)悪性メラノーマ(Malme-3M)、(iii)神経芽細胞腫(SK-N-MC)および(iv)大腸癌(T84)からなる。非悪性細胞型は、正常ヒト肝臓(WRL68)、正常皮膚線維芽細胞(Malme-3)および正常網膜上皮細胞(ARPE-19)からなる。腫瘍由来系、正常肝臓および皮膚線維芽細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)から得られる。ARPE-19細胞系は、カリフォルニア・インスティテュート・フォー・メディカル・リサーチの同僚からの贈呈である。細胞は、5%CO<sub>2</sub>/95%空気の加湿インキュベータ中の培養液中で増殖および維持する。 10

## 【0014】

高度に精製された合成生成物である4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノンの試料は、2バッチ(調製物1および2)の凍結生成物において、アリゾナ州プレスコット所在インターカル社により提供される。試料を使用しない場合には、受け取った後に直ちに凍結して保存する。マスターストック(1%w/v)のフラノンを、滅菌水中で調製し、各実験期間中は凍結して保存する。処理日に、マスターストックを、滅菌水で連続的に希釈し、10×強度の作業ストックを得る。

## 【0015】

1~2日経過した粘着培養液の亜集密単層(96ウェルプレートの1ウェルあたり10,000細胞の密度で播種)を、0.1容量の連続希釈液(10×濃縮溶液)のフラノンに曝露し、プレートをインキュベータに戻す。フラノン処理(二回目の適用)を、培養培地を交換せずに、それぞれ10×溶液の直接的な添加により48時間後に繰返す。さらに48時間インキュベートした後、培養培地を新しい増殖培地と交換し、その後、対応するフラノン濃度の3回目の適用を行なう。対照ウェルは、等量の滅菌水(フラノン溶液の代わりに)を受け、同様に扱う。48時間の最終インキュベート後(3回の処理後)、細胞溶解液を、単層を0.2mLの溶解溶液で抽出し、次いで低速遠心分離(2500rpm、10分間)により調製する。上清(細胞質溶解液)をとり、アリコート(20μl)中のヒストン-DNA複合体(ヌクレオソーム断片)の存在について、細胞死検出ELISAアッセイ(ロッシュ・ダイアゴニスティック)を使用して吸光度検出(405~410nmでの吸光度)によりアッセイした。 20 30

## 【0016】

3回の連続的な処理後の、正常ヒト肝臓および肝腫瘍細胞に対するフラノンの効果を図1および2に示す。評価した濃度範囲(0.01~0.0001%)において、該化合物は、正常肝細胞で、0.3log未満の細胞死減率という最大変化を生じる(図1)。これに対し、細胞死の鋭い上昇が、0.08~0.88mMのモル濃度範囲のフラノンに対応する、0.001~0.01%の範囲のフラノン濃度で処理した肝腫瘍細胞に見られる(図2)。肝腫瘍細胞におけるこの効果は、フラノン濃度の上昇と共に下降し(0.1%に近づく)、おそらくこれは、最も高い投与量(0.1%フラノン、データは示していない)での培養培地のpHの変化により細胞が減少するからであろう。 40

## 【0017】

図3および4は、悪性メラノーマ(Malme-3M)およびその正常細胞対応物のヒト皮膚線維芽細胞(Malme-3)に対する、2つの異なるフラノンの調製物の効果を示す。肝腫瘍細胞に見られるものと類似した細胞死誘導特異性が、悪性メラノーマで観察される。従って、両方のフラノン調製物が、投与量依存的なメラノーマ系の死(アポトーシスの5から10倍の増加)を誘導し、これに対し、正常皮膚線維芽細胞に対する効果は顕著ではない(アポトーシスにおいてlogの増加は<0.3)。アポトーシス速度の2倍の変化をもたらすのに必要な最小濃度は、肝腫瘍細胞(<0.001%フラノン)よりも、メラノーマ細胞(0.003%フラノン)の方が僅かに高い。

## 【0018】

肝腫瘍およびメラノーマ細胞型に対する効果とは対照的に、フラノンによる大腸癌の処理により、同等な濃度範囲（最大0.01%までのフラノン）で評価した場合に、（非処理対照と比べて）細胞アポトーシス速度のlog変化は<0.5である。より低い濃度範囲では（ARPE-19では最大0.003%およびSK-N-MCでは0.001%まで）、フラノンによる処理は、正常上皮および神経芽細胞の死滅率の有意な変化を誘発しない。

#### 【0019】

従って、悪性および非悪性ヒト肝腫瘍およびメラノーマ細胞系の、ビタミンCの代謝物である4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノンによる処理は、腫瘍特異的な細胞死の誘導により示されるような、悪性細胞に対する化合物の優先的な細胞毒性を示す。

10

#### 【0020】

##### 実施例2

以下の手順は、アスコルビン酸カルシウム(CA)、アスコルビン酸カルシウム-トレオン酸カルシウム組成物(CA+CT)、アスコルビン酸カルシウム-トレオネート-フラノン組成物(CA+CT+FR)および米国アリゾナ州プレスコット所在インターカル社の登録商標エステル-Cで入手できる市販で入手可能なアスコルビン酸カルシウム-代謝物-フラノン組成物(EC)を単独で、および、典型的な癌化学療法剤のアドリアマイシン(ドキシソルピシン)と組合せた活性を実証するために実施する。

#### 【0021】

アスコルビン酸カルシウム(CA)、トレオン酸カルシウム(CT)、4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノン(FR)およびエステル-C(EC)は、米国アリゾナ州プレスコット所在インターカル社から得られる。組織培養等級のアスコルビン酸(AA)は、米国MO州セントルイス所在シグマ・ケミカル社からである。アスコルビン酸カルシウムの組成物(ジ(L-アスコルベート)カルシウム二水和物)は、塩を滅菌水に連続的に溶かし、等しい強度(1%w/v)のマスター-ストック溶液を得ることにより作成する。アスコルビン酸カルシウムとトレオン酸カルシウムと4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノン(CA/CT/FR)の水溶液は、85/7.5/7.5の比で調製する。比較解析のために、同一なアスコルビン酸(AA)等価物を含むストック溶液を使用する。全てのマスターストックは、これらの手順の経過中、室温で保存する。これらから、10x強度の作業ストックを、使用日に連続希釈することにより調製し、下記のようにマイクロタイタープレート中の細胞に適用する。

20

30

#### 【0022】

アドリアマイシン(ドキシソルピシン)は、シグマ・ケミカル社(Sigma Chemical Company)(ミズーリ州セントルイス(St. Louis, MO))から得られる。ストック溶液は、滅菌水にアドリアマイシン(ADR)を、水または希酢酸溶液(0.01N)にDTICを溶かすことにより作成する。ストックは-10で凍結して保存し、使用前に解凍する。連続希釈液は滅菌水中で作成し、10x強度の溶液を得、この10分の1の容量を処理時に細胞に適用する。

#### 【0023】

標的ヒト腫瘍由来系は、腺癌(肝腫瘍)であるSK-Hep-1および悪性メラノーマであるMalme-3Mからなる。全ての播種培養液は、米国バージニア州マナッサス(Manassas, VA)所在ATCCから得、5%CO<sub>2</sub>/95%空気の加湿インキュベータ中の血清含有増殖培地中で増殖/維持する。SK-Hep-1細胞を、10%FBSと抗生物質を補充した、アール塩と非必須アミノ酸中の、イーグル最小必須培地中で増殖し、Malme-3M細胞を、15%ウシ胎児血清(FBS)と抗生物質を補充したMcCoy培地中で培養する。

40

#### 【0024】

処理のために、指数関数的に増殖している細胞を、0.1~0.2mLの増殖培地中、96ウェルマイクロタイタープレートの1ウェルあたり、1x10<sup>4</sup>個の細胞の密度で播種する。一晚37で細胞を付着した後、複製ウェルを、10分の1容量の10x強度溶液

50

の直接適用により、種々の処理に曝露する。化学療法剤に關与する処理では、10分の1容量のアドリアマイシンの連続希釈液(0.0006~3.0 $\mu$ mol)をウェルに適用し、その後、アスコルベート含有組成物(補助剤)または滅菌水(対照)を適用する。補助剤での処理は、隔日または3日毎に(適用可能な場合)に、増殖培地を交換することなく繰返す。非処理対照は、等量の滅菌水を受ける。補助剤による2~3回の処理後、細胞を、下記のようなBudRで標識する。(いくつかの実験では、ウェルに、BudRの添加前に等容量の増殖培地を再度供給する。これにより、再度全く流さない場合に比べて、より多くの量のBrdUがDNAに取り込まれる)。

#### 【0025】

DNA標識の場合、米国インディアナ州インディアナポリス(Indianapolis, IN)のロッシュ・ダイアゴニスティック細胞増殖ELISA、BudR(比色)アッセイから、以下の手順を採用および修正する。

#### 【0026】

各処理ウェルは、10分の1の体積の10XBrdU含有培地に暴露し、37 $^{\circ}$ Cにて一晩(15~20時間)再インキュベートする。アッセイ用の吸収対照(基質のみ)ブランクを得るために、1セットの対照ウェルを培地のみ(BudRなし)に暴露した。標識期間の後、培養培地を除去し、FixDenatを加えて1工程で、細胞を固定し、DNAを変性させる(室温で30分)。次にFixDenatを除去し、抗BrdUペルオキシダーゼ試薬を加え、室温にて90分間インキュベーションを続ける。後者を除去した後、プレートを3回洗浄し、次に基質溶液を加える。着色が十分に光度検出できるようになるまで、プレートを室温で維持する(5-10分)。このとき、各ウェルに25マイクロリットルの1M硫酸を加えて反応を停止させ、次に振盪器で約1分間混合する。サンプルの吸収は、停止溶液添加後5分以内に、ELISAリーダーで450nmにて測定する。OD<sub>450nm</sub>は、DNAに包含されるBudRレベルの指標であり、細胞増殖速度に比例する。データ分析のために、吸収の平均を各治療の化学療法剤の濃度に対してプロットし、抗増殖効果の用量反応関係を得る。

#### 【0027】

アスコルビン酸塩、エステル-Cおよび3種類のアスコルビン酸ならびに代謝産物の組合わせの、肝腫瘍細胞に対するアドリアマイシンの抗腫瘍活性への影響 図5は、ADR1回およびアジュバント(すなわちAAまたはCA)2回の投与後の、アドリアマイシン(ADR)のみ、ADRおよび0.5mMアスコルビン酸ならびにADRおよびアスコルビン酸カルシウム(0.5mM AA相当物)の用量の効果を示す。

#### 【0028】

アジュバント(AAまたはCA)との組合わせ治療は、ADRのみよりも肝腫瘍増殖を大きく抑制することに注目する。向上効果は、より高いADR用量(0.3マイクロモル)と比較して、低~中程度の濃度のADR用量(0.003~0.03マイクロモル)で顕著である。アスコルビン酸カルシウムは、アスコルビン酸よりも有効である。同様の種類の肝腫瘍抑制は、同じ試験におけるADRとエステルC(0.5mM AA相当物を含む)で見られる。

#### 【0029】

別の手順において、3種類のアスコルビン酸塩代謝産物の組合わせ(85:7.5:7.5の比のCA+CT+FR)のADR活性に対する効果を、CAまたはECと比較して評価する。図7は、3種類の混合物の2つの異なる濃度(0.015%および0.033%)の、ADR1回および混合物3回の投与後の影響を示す。グラフからわかるように、肝腫瘍細胞は、ADRのみよりもADR+3種類の組合わせの後に、より多く増殖する。ここでも、向上効果は、低~中程度の用量(0.0017~0.017マイクロモル)のADRのほうが、試験を行ったより高い用量(0.17マイクロモル)の顕著である。

#### 【0030】

図8は同一実験における、0.003%のCA、BCおよびCA+CT+FRのADR活性に対する相対効果を示す。3種類すべてのアスコルビン酸塩含有組成物は絶えず、低い

10

20

30

40

50

容量の A D R の抗増殖活性を改善し、B C および 3 種類のアスコルビン酸塩および代謝産物混合物は、C A よりも大きな改善を示している。最も顕著なことに、E C および C A + C T + F R は両方とも、0.017 マイクロモルの A D R と合わせて用いると、A D R のみの 10 倍高い用量 (0.17 マイクロモル) と比較して、同等かわずかに高い抗腫瘍効果を示す。

【0031】

3 種類のアスコルビン酸塩および代謝産物組成物の、メラノ - マ細胞のアドリアマイシンの抗増殖活性に対する効果

図 9 および 10 は、2 種類の別個の実験による、3 種類の混合物 (C A + C T + F R、0.033%) と A D R の各種用量のヒトメラノ - マ細胞に対する効果を示す。どちらの実験においても、3 種類の混合物は、化学療法剤の低 ~ 中程度の用量において優先的に、A D R の抗腫瘍活性を増強する。

10

【0032】

したがって、アスコルビン酸塩含有組成物は、細胞増殖イムノアッセイを用いて評価したように、肝腫瘍およびメラノ - マ由来の細胞系の両方に対する、癌化学療法剤 (アドリアマイシン) の抗腫瘍活性を改善する。向上効果は、化学療法剤の低 ~ 中程度の用量にて最も顕著である。アスコルビン酸塩と代謝産物を含む組成物は、アスコルビン酸のみよりもアドリアマイシン活性の向上に効果的である。アスコルビン酸カルシウム、トレオニン酸カルシウムおよびフラノンを (85 : 7.5 : 7.5 の比で) 含む 3 種類の混合物は、低用量のアドリアマイシンと組合せると、10 倍の用量またはアドリアマイシン単独の場合と同様か、やや高いレベルで腫瘍細胞増殖を抑制する。これらの結果は、アスコルビン酸と代謝産物を、潜在的な薬剤関連毒性が低下させる低用量の化学療法と組合せて使用することを示している。

20

【0033】

実施例 3

本例は、DNA 合成中の B r d U 含有に基づく細胞増殖イムノアッセイを使用して、ヒト腫瘍由来メラノ - マおよび肝腫瘍細胞系に対する各種アスコルビン酸塩と代謝産物の混合物の活性を示す。

【0034】

以下の混合物の水溶液は、各実験で使用するために新たに調製した：

30

以下の比における、アスコルビン酸カルシウムおよびトレオニン酸カルシウム (C A / C T) :

99 / 1 (標準混合物)

97.2 / 2.5

95 / 5

92.5 / 7.5 および

90 / 10

以下の比における、アスコルビン酸カルシウムおよび 4 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 3 (2H) - フラノン (C A / F R) :

99.9 / 0.1 (標準混合物)

40

99 / 1

97.2 / 2.5

95 / 5 および

92.5 / 7.5

以下の比における、アスコルビン酸カルシウムおよびトレオニン酸カルシウムおよび 4 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 3 (2H) - フラノン (C A / C T / F R) :

91.5 / 7.5 / 1

90 / 7.5 / 2.5

90 / 7.5 / 2.5

88.5 / 7.5 / 5

50

85 / 7 . 5 / 7 . 5

90 / 10 / 1 および

80 / 10 / 10

アスコルビン酸カルシウム、トレオニン酸カルシウムおよび4 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 3 ( 2 H ) - フラノン は、アリゾナ州プレスコットのインターカル社 ( I n t e r - C a l C o r p o r a t i o n ) より入手した。アスコルビン酸カルシウム ( ジ ( L - アスコルビン酸 ) カルシウム二水和物 ) の組成は、L - アスコルビン酸 ( 82 . 15 % )、カルシウム ( 9 . 45 % ) および水 ( 8 . 44 % ) である。

【0035】

比較分析用の等強度 ( 1 % w / v ) のマスターストックを得るために、水性混合物は、各成分を滅菌水に順番に溶解させて作成した。場合によっては、2種類および3種類の組み合わせ混合物の間の比較用アスコルビン酸相当物を得るために、1 . 08 % の強度のストック溶液を調製した。3種類の実験の間、すべてのマスターストックは室温で保管した。これらより、使用する日に連続希釈によって10 X 強度の作用ストック溶液を調製し、以下で述べるようにマイクロタイタープレート内の細胞に加える。構成代謝物質を「エステル - C」ブランドのカルシウム中における代謝物質を反映させた比で含む標準混合物は、アリゾナ州プレスコットのインターカル社 ( I n t e r - C a l C o r p o r a t i o n ) より入手した。

【0036】

標的ヒト腫瘍由来または正常系は、悪性メラノ - マの M a l m e - 3 M、肝臓腺癌 ( 肝腫瘍 ) の S K - H e p - 1 および正常肝臓細胞系の W R L 6 8 細胞より成る。すべての種培養物は A T C C ( バージニア州マナッサ ) より入手し、5 % C O <sub>2</sub> / 95 % 空気の加湿インキュベータ内で血清含有成長培地中で増殖 / 維持する。M a l m e - 3 M 細胞は、15 % ウシ胎仔血清 ( F B S ) と抗生物質を添加した M c C o y の培地中で培養し、S K - H e p - 1 および C L 4 8 系は、10 % F B S と抗生物質を添加した、アール塩と非必須アミノ酸中のイーグル最小必須培地 ( E M E M ) 中で培養する。

【0037】

以下の手順は、ロッシュ・ダイアゴニスティック ( インディアナ州インディアナポリス ) の細胞増殖 E L I S A、B u d R ( 比色 ) アッセイから採用し、変更する。

【0038】

処理は、指数的に成長する細胞を 0 . 1 ~ 0 . 2 m L の成長培地中に 96 ウェルマイクロタイタープレート当たり  $1 \times 10^4$  の濃度で播種する。一晚の細胞吸着の後、2組のウェルに、10分の1の体積の10 X 強度溶液を直接加えることによって、アスコルビン酸塩 / 代謝産物混合物の連続希釈に暴露させる。成長培地は変更せずにそれぞれのアスコルビン酸塩 / 代謝産物混合物を加えることによって、処理を毎日繰り返す。未処理の対照には、等量の滅菌水を加える。2、3日の処理後、細胞を以下で述べるように B u d R で標識する。( 一部の試験では、B u d R の添加前に、ウェルに等体積の成長培地を再度加える。加えたものは、再度加えなかったものに比べて、D N A 内への B r d 含有量が多くなる )。

【0039】

D N A 標識は、処理した各ウェルを10分の1の体積の10 X B r d U 含有培地に暴露し、37 で一晚 ( 15 ~ 20 時間 ) 再インキュベートする。アッセイの吸収対照 ( 基質のみ ) ブランクを得るために、1組の対照ウェルを培地のみ ( B u d R を含まない ) に暴露する。標識期間の後、培養培地を除去し、F i x D e n a t を加えて1工程で、細胞を固定し、D N A を変性させる ( 室温で30分 )。次に F i x D e n a t を除去し、抗 B r d U ペルオキシダーゼ試薬を加え、室温にて90分間インキュベーションを続ける。後者を除去した後、プレートを3回洗浄し、次に基質溶液を加える。着色が十分に光度検出できるようになるまで、プレートを室温で維持する ( 5 ~ 10 分 )。このとき、各ウェルに25マイクロリットルの1 M 硫酸を加えて反応を停止させ、次にプレートを約1分間振盪器に置く。サンプルの吸収は、停止溶液添加後5分以内に、E L I S A リーダーで450 n

10

20

30

40

50

mにて測定する。450nmにおけるODは、DNAに包含されるBudRレベルの指標であり、細胞増殖速度に比例する。データ分析のために、吸収の平均をアスコルビン酸塩/代謝産物混合物の濃度に対してプロットし、抗増殖効果の用量反応関係を得る。

【0040】

図11から16Aにグラフで示した、そのような実験の結果は、以下のことを説明している：

・アスコルビン酸塩、トレオニン酸塩および/またはフラノンを含む混合物は、メラノ-マおよび肝腫瘍細胞種の細胞増殖の腫瘍特異性抑制を誘発する。

【0041】

・CA+CT混合物でトレオニン酸カルシウムの比を1%から7.5%に上昇させると、両方の腫瘍細胞種における2種類の組合せの相対抗腫瘍活性が上昇する。 10

【0042】

・アスコルビン酸カルシウムにフラノンを添加すると、メラノ-マ細胞での抗増殖活性が上昇し、2種類のCA/FR組合せ(92.5%/7.5%の比)は、シミュレートされたCR/FR混合物(99.9%/0.01%の比)よりも高い活性を示す。0.05%用量におけるこれらの2つの混合物には、約9倍の相違がある(ODが0.008対0.088)。

【0043】

・CA+CTの2種類混合物にフラノンを加えると、両方の腫瘍型での活性が向上し、3種類のCA/CT/FRの組合せ(85/7.5/7.5の比)が最適な活性を示す。肝腫瘍に対するフラノン添加の向上効果は、2種(CA+FR)の組合せより、3種混合物でさらに顕著である。FRおよびCTの相対レベルを10%までさらに上昇させても、3種組合せの抗腫瘍活性は向上しない(データは示さず)。 20

【0044】

・腫瘍細胞に見られる効果に対して、3種類の混合物CA/CT/FRは、2種類のCA+CT混合物(92.5/7.5)に含まれるアスコルビン酸に匹敵する(比較的より高い)アスコルビン酸相当物(92.5/7.5/7.5)で試験を行った場合でも、正常肝臓細胞の増殖を抑制しない。

【0045】

したがって、92.5:7.5の比のアスコルビン酸カルシウムおよびトレオニン酸(CA+CT)またはアスコルビン酸カルシウムおよびフラノン(CA+FR)の2種混合物ならびに85:7.5:7.5の比の3成分の3種混合物(CA+CT+FR)は、高速スクリーニングイムノアッセイにおいて、悪性メラノ-マおよび肝腫瘍細胞種に対して最適な抗増殖活性を明示する。このような混合物によって、シミュレートされた標準に含まれるアスコルビン酸よりも、低濃度のアスコルビン酸相当物にて抗腫瘍効果が見られるようになる。 30

【0046】

実施例4

本例は、DNA合成中のBrdU含有に基づく細胞増殖イムノアッセイを使用して、ヒト腫瘍由来メラノ-マおよび肝腫瘍細胞系に対する、代表的なフラノンである、4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノンのみの活性およびフラノンとアドリアマイシンの活性について説明する。 40

【0047】

新たに合成した4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノン(FR)は、アリゾナ州プレスコットのインターカル社(Inter-Cal Corporation)より提供される。マスターストック(強度0.1%または0.75%)は、滅菌水に望ましい量のフラノンを溶解させて作成し、使用するまで凍結保存した(-10にて)。

【0048】

アスコルビン酸カルシウム、トレオニン酸カルシウムおよびエステル-C(EC)も、インターカル社(Inter-Cal Corporation)より入手した。アスコル 50

ビン酸カルシウム（ジ（L-アスコルビン酸）カルシウム二水和物）の組成は、L-アスコルビン酸（82.15%）、カルシウム（9.45%）および水（8.44%）である。望ましい強度のマスターストックを得るために、アスコルビン酸塩と代謝産物の水性混合物は、それぞれの成分を滅菌水に順番に溶解させて調製する。アスコルビン酸カルシウムおよびトレオニン酸カルシウムおよび4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノン(CA/CT/FR)の3種混合物は85/7.5/7.5または87.5/7.5/5.0の比で調製する。これらより、使用する日に連続希釈によって10X強度の作用ストック溶液を調製し、以下で述べるようにマイクロタイタープレート内の細胞に加える。

#### 【0049】

アドリアマイシン（ドキシソルピシン）はシグマ・ケミカル社（Sigma Chemical Company）（ミズーリ州セントルイス）より得る。ストック溶液は、アドリアマイシン（ADR）を滅菌水に溶解させて作成する。ストック溶液は-10で凍結保存し、使用前に解凍する。10X強度溶液を得るために、滅菌水で連続希釈を行い、この0.1体積を処理時に細胞に加える。

#### 【0050】

標的ヒト腫瘍由来系は、肝臓腺癌（肝腫瘍）のSK-Hep-1および悪性メラノーマのMalme-3Mより成る。種培養物はATCC（バージニア州マナッサス）より入手し、5%CO<sub>2</sub>/95%空気の加湿インキュベータ内で血清含有成長培地中で増殖/維持する。SK-Hep-1は、10%FBSと抗生物質を添加した、アール塩と非必須アミノ酸中のイーグル最小必須培地（EMEM）中で培養し、Malme-3M細胞は、15%ウシ胎仔血清（FBS）と抗生物質を添加したMcCoyの培地中で培養する。

#### 【0051】

処理は、指数的に成長する細胞を0.1~0.2mLの成長培地中に96ウェルマイクロタイタープレート当たり $1 \times 10^4$ の濃度で播種する。37で一晩の細胞吸着の後、2組のウェルに、10分の1の体積の10X強度溶液を直接加えることによって、各処理に暴露させる。化学療法剤を含む処理の場合、アドリアマイシンの（指示された用量範囲内の）連続希釈物の10分の1の体積をウェルに加え、次にアジュバント（すなわちフラノンまたはアスコルビン酸および代謝産物）を加える。アジュバントによる処理は、成長培地を変更せずに、毎日または（適用可能な場合は）一日おきに繰り返す。アジュバントによる3回までの処理の後、細胞は以下で述べるように、プロモデオキシウリジン（BudR）によって一晩標識する。（一部の実験では、BudRの添加前に、ウェルに等体積の成長培地を再度加える。加えたものは、再度加えなかったものに比べて、DNA内へのBrd含有量が多くなる）。

#### 【0052】

DNA標識は、以下の手順をロッシュ・ダイアゴニスティック（インディアナ州インディアナポリス）の細胞増殖ELISA、BudR（比色）アッセイから採用し、変更する。処理した各ウェルを10分の1の体積の10XBrdU含有培地に暴露し、37で一晩（15~20時間）再インキュベートする。アッセイの吸収対照（基質のみ）ブランクを得るために、1組の対照ウェルを培地のみ（BudRを含まない）に暴露する。標識期間の後、培養培地を除去し、FixDenatを加えて1工程で、細胞を固定し、DNAを変性させる（室温で30分）。次にFixDenatを除去し、抗BrdUペルオキシダーゼ試薬を加え、室温にて90分間インキュベーションを続ける。後者を除去した後、プレートを3回洗浄し、次に基質溶液を加える。着色が十分に光度検出できるようになるまで、プレートを室温で維持する（5~10分）。このとき、各ウェルに25マイクロリットルの1M硫酸を加えて反応を停止させ、次に振盪器でを約1分間に混合する。サンプルの吸収は、停止溶液添加後5分以内に、ELISAリーダーで450nmにて測定する。OD<sub>450nm</sub>は、DNAに包含されるBudRレベルの指標であり、細胞増殖速度に比例する。データ分析のために、吸収の平均を各処理によるアジュバントまたは化学療法剤の濃度に対してプロットし、抗増殖効果の用量反応関係を得る。

10

20

30

40

50

## 【0053】

試験の濃度範囲(0.003%~0.01%)では、肝腫瘍増殖の濃度依存性低下が見られ、0.01%フラノンは未処理対照と比較して、最高4.6倍の細胞DNA合成の低下を生じる。同様の濃度依存性特性が3種類の別個の実験で得られる。

## 【0054】

ADRは単独で、試験範囲(0.02~0.33マイクロモル)にて肝腫瘍増殖の濃度依存性阻害を引き起こす。フラノン(0.001~0.01%)と組み合わせると、組合せによってさらに高い阻害性が付与され、ADR単独の対応する用量によって得られる阻害に対して、約2から22倍の肝腫瘍阻害の向上が生じる。(2種類の別個の実験より、ADRによる阻害を2倍に向上させるのに必要なフラノンの最低用量は、~0.0016%であり、これは1%エステル-C溶液中のフラノンの絶対に濃度にほぼ一致する)。これらの実験により、比較分析の次の実験で使用するフラノン濃度の範囲が定義される。

10

## 【0055】

試験を行った濃度範囲(0.001~0.01%)では、水溶液中での同一絶対濃度で比較した場合、フラノンは、アスコルビン酸塩/代謝産物の3種混合物またはエステル-C(R)のどちらよりも、肝腫瘍増殖の阻害においてより有効である。

## 【0056】

ADRの最小用量(0.007マイクロモル)およびアジュバントの最大用量(0.01%)において、フラノンはADRの阻害効果を7倍に向上させるのに対して、3種混合物では3.1倍、ECでは2.7倍の向上である。

20

## 【0057】

(0.1%における)フラノンは、化学療法剤の全濃度において、ADRの阻害効果を一貫して向上させる。これに対して、3種混合物とECはADRの中程度の用量(0.136マイクロモル)にて匹敵する向上を示すが、フラノンはADRの低用量(0.005~0.27マイクロモル)にて、どちらよりも優れた性能を示す。

## 【0058】

したがって、フラノン単独で肝腫瘍およびメラノ-マ細胞系の両方の細胞増殖を抑制することができる。さらにフラノンは、化学療法剤(アドリアマイシン)と組み合わせると、アジュバントとして機能することが可能であり、組合せ実験での阻害効果を向上させる。重量対重量ベースでは、フラノンの抗増殖およびアジュバント(相乗)効果は、アスコルビン酸塩/代謝産物の3種混合物またはエステル-Cよりも高く、フラノンの化学構造が、アスコルビン酸塩およびその代謝産物を含む組成物の抗腫瘍効果の原因となる活性成分を含んでいる可能性がある。

30

## 【0059】

本発明を、当業者が理解および実施できるように説明し、現在好ましい実施形態を示した。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

図1は、正常肝細胞に対する、代表的なビタミンC由来フラノン(FR)の、フラノンによる3回の処理適用後の効果を示す。

40

## 【図2】

図2は、ヒト肝腫瘍細胞に対するフラノンの効果を示す。

## 【図3】

図3は、ヒトメラノーマ細胞および正常皮膚線維芽細胞におけるフラノン(1番の調製物)の細胞死活性を示す。

## 【図4】

図4は、ヒトメラノーマ細胞および正常皮膚線維芽細胞におけるフラノン(2番の調製物)の細胞死誘導活性を示す。

## 【図5】

図5は、アドリアマイシン(ADR)単独、ADRと5mMアスコルビン酸(AA)、A

50

D Rと5 m M A Aに等価なアスコルビン酸カルシウム ( C A )の投与量に対する、1および2回適用後の、肝腫瘍に対する効果を示す。

【図6】

図6は、A D Rとエステル - C ( 0 . 5 m MのA Aに等価 )による類似した肝腫瘍抑制を示す。

【図7】

図7は、A D Rと、2つの異なる濃度の3元混合物 ( C A + C T + F R )の、A D Rの1回の適用および混合物の3回の適用後の影響を示す。

【図8】

図8は、C A、E CおよびC A + C T + F RのA D R活性に対する相対効果を示す。 10

【図9】

図9は、2つの異なる試験での、ヒトメラノーマ細胞に対する、種々の投与量のA D Rにおける3元複合体 ( C A + C T + F R )の効果を示す。

【図10】

図10は、2つの異なる試験での、ヒトメラノーマ細胞に対する、種々の投与量のA D Rにおける3元複合体 ( C A + C T + F R )の効果を示す。

【図11】

図11は、B u d Rをベースとした細胞増殖イムノアッセイにより測定した、異なる比のトレオネート対アスコルベートを含む組合せで2回連続的に処理した後の、それぞれメラノーマおよび肝腫瘍細胞に対する効果を示す。 20

【図12】

図12は、B u d Rをベースとした細胞増殖イムノアッセイにより測定した、異なる比のトレオネート対アスコルベートを含む組合せで2回連続的に処理した後の、それぞれメラノーマおよび肝腫瘍細胞に対する効果を示す。

【図13】

図13は、B u d R細胞増殖E L I S Aによりアッセイした、種々の比のフラノン対アスコルベートを含む混合物で3回処理した後の、それぞれメラノーマおよび肝腫瘍細胞に対する感受性を比較する。

【図14】

図14は、B u d R細胞増殖E L I S Aによりアッセイした、種々の比のフラノン対アスコルベートを含む混合物で3回処理した後の、それぞれメラノーマおよび肝腫瘍に対する感受性を比較する。 30

【図15】

図15は、上記のアッセイにおいて、漸増濃度 ( 1 % から 7 . 5 % )のフラノンを含む3元混合物の、それぞれメラノーマおよび肝腫瘍に対する効果を示す。

【図16】

図16は、上記のアッセイにおいて、漸増濃度 ( 1 % から 7 . 5 % )のフラノンを含む3元混合物の、それぞれメラノーマおよび肝腫瘍に対する効果を示す。図16Aは、2元 ( C A + C T )混合物と類似したアスコルビン酸等価物を含む、3元混合物 ( C A ( 9 2 . 5 % ) / C T ( 7 . 5 % ) / F R ( 7 . 5 % ) )の正常肝臓および肝腫瘍細胞に対する効果を示す。 40

【図17】

図17は、肝腫瘍細胞系 ( S K - H e p - 1 )の増殖に対するフラノン単独の効果を示す。

【図18】

図18は、種々の濃度のA D Rに曝露した肝腫瘍細胞の増殖に対する、フラノンの効果を示す。

【図19】

図19は、肝腫瘍細胞の増殖に対する、フラノン単独、C A + C T + F RおよびエステルC ( E C )の効果を示す。

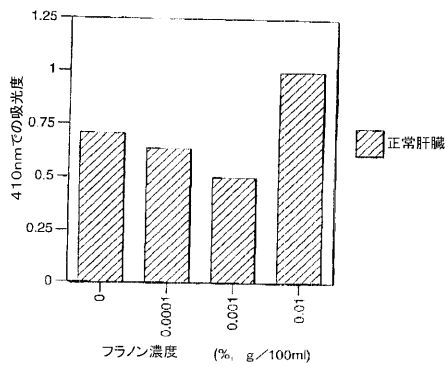
【 図 2 0 】

図 2 0 は、A D R と組合わせた、フラノン、C A + C T + F R および E C の、肝腫瘍細胞の増殖に対する比較活性を示す。

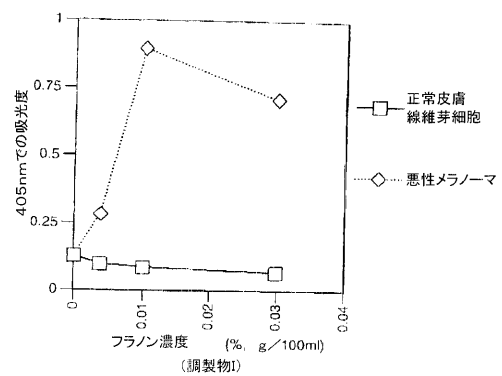
【 図 2 1 】

図 2 1 は、全濃度の A D R における A D R と組合わせた、フラノン、C A + C T + F R および E C の、メラノーマ細胞の増殖に対する効果を示す。

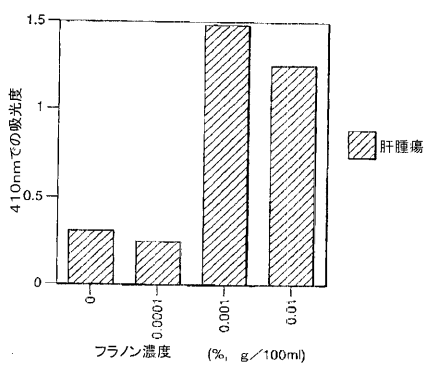
【 図 1 】



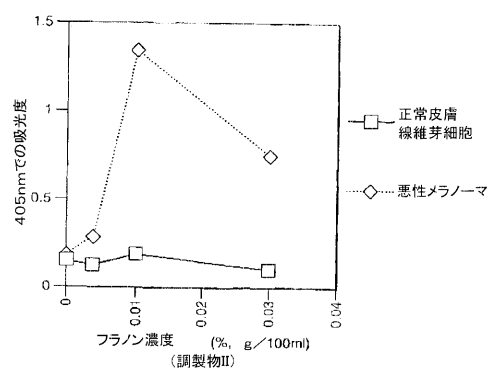
【 図 3 】



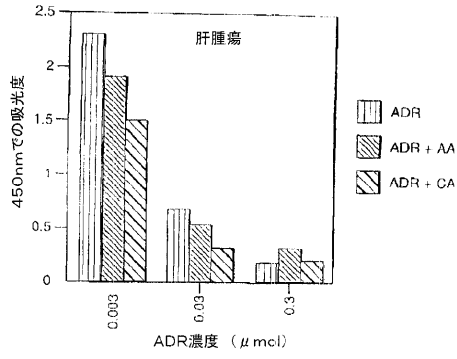
【 図 2 】



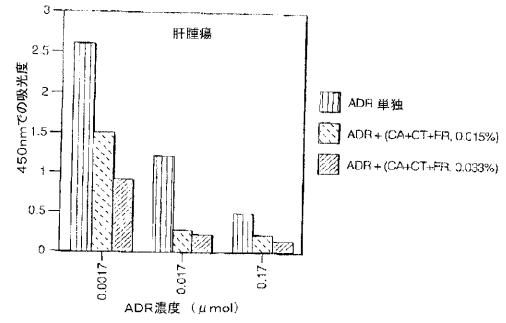
【 図 4 】



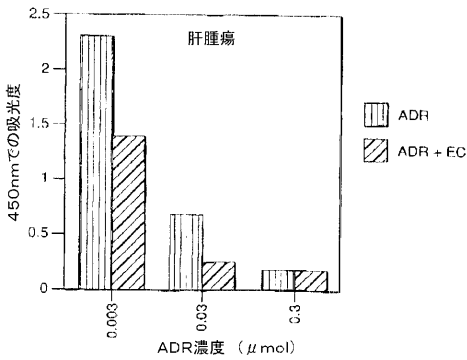
【 図 5 】



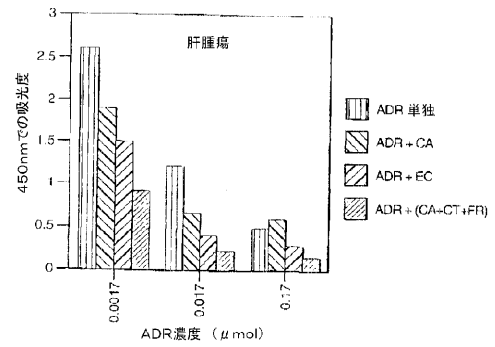
【 図 7 】



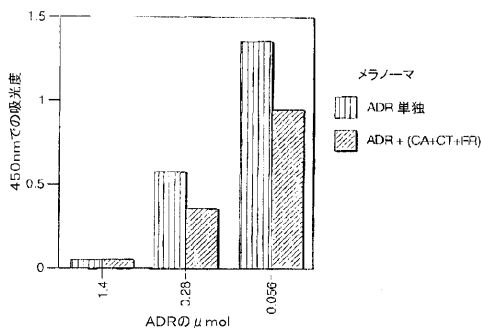
【 図 6 】



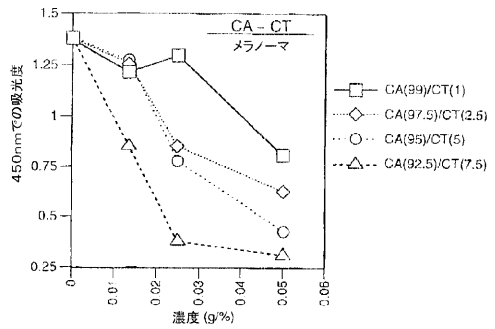
【 図 8 】



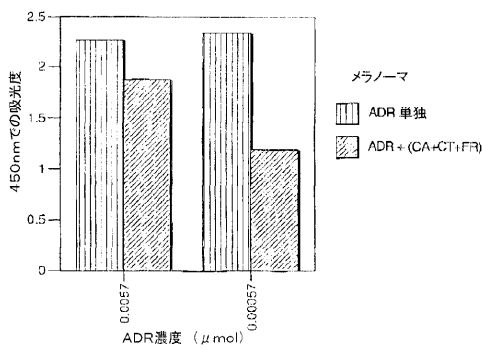
【 図 9 】



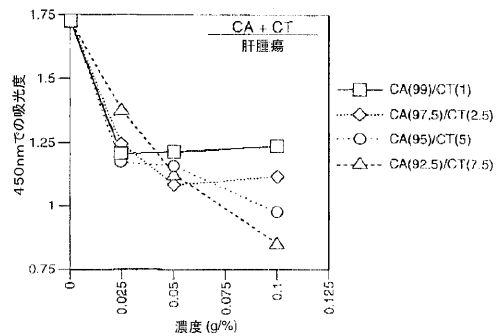
【 図 11 】



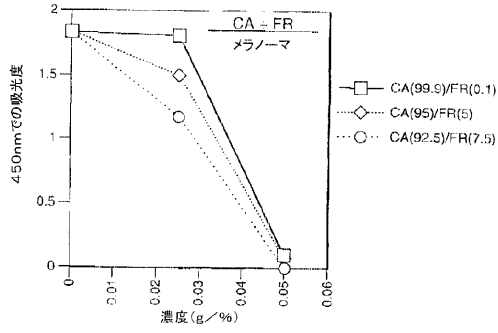
【 図 10 】



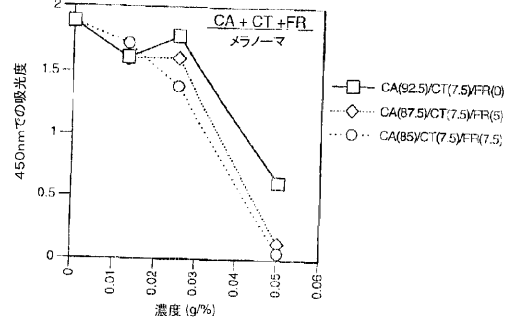
【 図 12 】



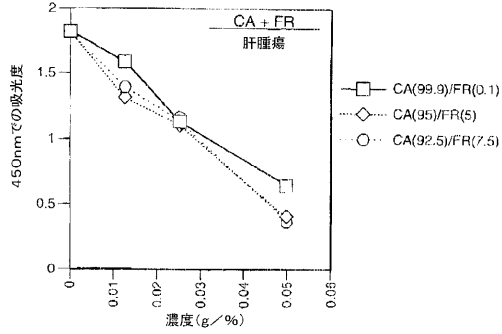
【 図 1 3 】



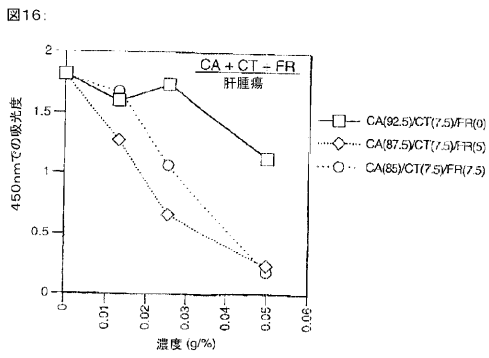
【 図 1 5 】



【 図 1 4 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

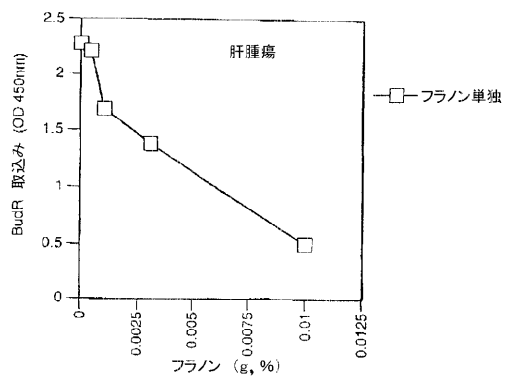
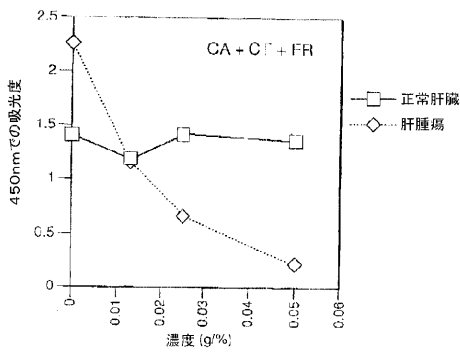
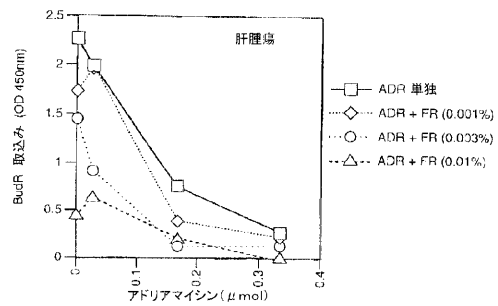


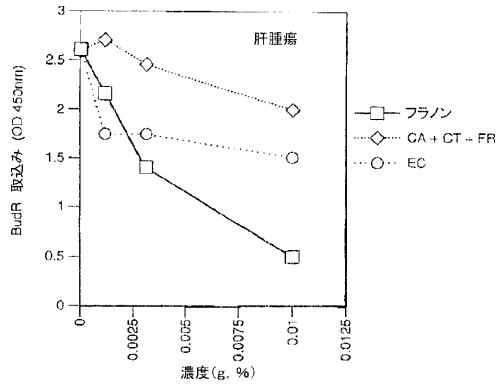
図16A:



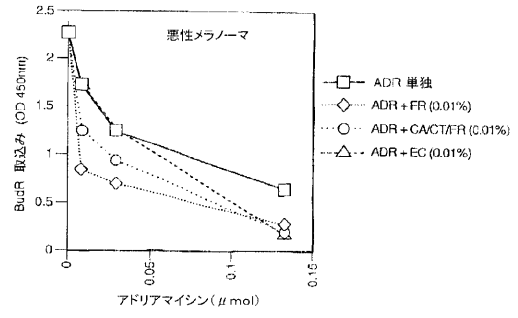
【 図 1 8 】



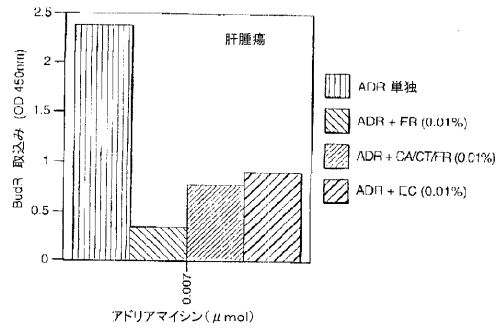
【図 19】



【図 21】



【図 20】



## 【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/20023 A1**

- (51) International Patent Classification: **A61K 31/70** J, [US/US]; 19120 Vineyard Drive, Saratoga, CA 95070 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/26455
- (22) International Filing Date: 24 August 2001 (24.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/654,377 1 September 2000 (01.09.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: 09/654,377 (CIP) Filed on Not furnished
- (71) Applicant (for all designated States except US): OXYCAL LABORATORIES, INC. [US/US]; 6734 Inter-Cal Way, Prescott, AZ 86301 (US).
- (72) Inventor; and  
(75) Inventor/Applicant (for US only): JARIWALLA, Raxit.
- (74) Agent: DRUMMOND, William, II., Drummond & Duckworth, 4590 MacArthur Boulevard, Suite 300, Newport Beach, CA 92660 (US).
- (81) Designated States (national): AU, CA, CN, IS, JP, KR, MX, NO, NZ, SG, TR, US.
- (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- Declaration under Rule 4.17:  
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:  
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/20023 A1

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR POTENTIATING CANCER CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS

(57) Abstract: The effect of cancer chemotherapeutic agents is potentiated by combination with mineral ascorbates, Vitamin C metabolites and/or a Vitamin C-derived furanone, illustratively a 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone.

WO 02/20023

PCT/US01/26455

1

**METHODS AND COMPOSITIONS FOR POTENTIATING  
CANCER CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS**

5

This Application is a Continuation-In-Part of and claims convention priority based on my copending USA Application, Serial Number 09/654,377, filed September 1, 2000.

10

**Background of the Invention**

This invention relates to methods and compositions for potentiating the effectiveness of cancer chemotherapeutic agents.

15

In another respect, the invention pertains to such methods and compositions which permit one to increase the effectiveness of cancer chemotherapeutic agents, such that these agents can be used at lower dose rates, without sacrificing the efficacy of the agent.

20

In still another aspect, the invention concerns cancer chemotherapeutic compositions which include a combination of chemotherapeutic components which either cause cancer cell apoptosis or reduced proliferation rate or both.

25

Numerous cancer chemotherapeutic agents are known. In many cases, however, the administration of such agents at effective dose rates may cause undesirable side effects which severely limit their utility. Accordingly, it would be highly desirable to

WO 02/20023

PCT/US01/26455

2

provide methods and compositions that would potentiate the chemotherapeutic effects of such agents, such that they could be effectively administered at lower dose rates, thereby reducing or eliminating such undesired side effects. Alternatively, such methods and compositions would make it possible to achieve greater chemotherapeutic effects from administration of given dose of a chemotherapeutic agent, with no increase in side effects.

**Brief Description of the Drawings**

10 In the drawings:

Fig. 1 illustrates the effect of a representative vitamin C-derived furanone (FR) on normal liver cells and after three treatment applications with the furanone;

15 Fig. 2 illustrates the effect of the furanone on human hepatoma cells;

Fig. 3 illustrates the cell-death activity of the furanone (Preparation No. 1) in human melanoma cells and normal skin fibroblasts;

20 Fig. 4 illustrates the cell-death inducing activity of the furanone (Preparation No. 2) in human melanoma cells and normal skin fibroblasts;

WO 02/20023

PCT/US01/26455

3

Fig. 5 illustrates the effect on hepatoma of a dose of adriamycin (ADR) alone, ADR plus .5mM ascorbic acid (AA), ADR plus calcium ascorbate (CA) at .5mM AA equivalent following one and two applications;

5 Fig. 6 illustrates similar hepatoma suppression with ADR plus Ester-C (0.5mM AA equivalents);

Fig. 7 illustrates the influence of ADR with two different concentrations of the triple mixture (CA + CT + FR) following one application of ADR and three applications  
10 of the mixture;

Fig. 8 illustrates the relative effects of CA, EC and CA+CT+FR on ADR activity;

15 Figs. 9 and 10 illustrate the effects of the triple mix (CA+CT+FR) at various doses of ADR against human melanoma cells in two different tests;

20 Figs. 11 and 12 illustrate the effects on melanoma and hepatoma cells, respectively, after two sequential treatments with combinations containing different ratios of threonate to ascorbate, as measured by the BudR-based cell proliferation immunoassay;

Figures 13 and 14 compare the sensitivity of melanoma and hepatoma, respectively, after three treatments with mixtures containing various ratios of furanone to

WO 02/20023

PCT/US01/26455

4

ascorbate, as assayed by the BudR cell proliferation ELISA;

Figures 15 and 16 illustrate the effect on melanoma and hepatoma, respectively,  
of triple mixtures containing increasing concentrations (from 1% to 7.5%) of furanone, in  
the above assay;

Figure 16A illustrates the effect on normal liver and hepatoma cells of the triple  
mixture (CA(92.5%)/CT(7.5%)/FR(7.5%) containing similar ascorbic-acid equivalents as  
in the double (CA + CT) mixture;

Fig. 17 illustrates the effect of furanone alone on the proliferation of the  
hepatoma cell line (SK-Hep-1);

Fig. 18 illustrates the effect of furanone on the proliferation of hepatoma cells  
exposed to various concentrations of ADR;

Fig. 19 illustrates the effects of furanone alone, CA+CT+FR and Ester C (EC) on  
the proliferation of hepatoma cells;

Fig. 20 illustrates the comparative activity on proliferation of hematoma cells of  
furanone, CA+CT+FR and EC in combination with ADR;

WO 02/20023

PCT/US01/26455

5

Fig. 21 illustrates the effects on proliferation of melanoma cells of furanone, CA+CT+FR and EC in combination with ADR at all concentrations of ADR.

**Brief Description of the Invention**

5

I have now discovered that the chemotherapeutic effect of cancer chemotherapeutic agents (reduction in cancer cell proliferation rate and/or cancer cell apoptosis) is significantly potentiated by combining them with a potentiating component which is a member selected from the group consisting of mineral ascorbates, Vitamin C metabolites and Vitamin C-derived furanones and mixtures of two or more thereof. By this technique, the same cancer chemotherapeutic effect is attained at significantly lower dose rates, in some cases at dose rates only about one-tenth of that required if the chemotherapeutic agent alone is administered. Further, I have discovered that such furanones potentiate the tumor cytotoxic and/or anti-proliferative effects of mineral ascorbates and mixtures of mineral ascorbates and other vitamin C metabolites.

15

In the presently preferred embodiment of the invention I employ a 4-hydroxy-5-methyl-3(2H) furanone as the potentiating component in combination with another cancer chemotherapeutic agent, to yield a composition having greater chemotherapeutic capability than either the furanone or the other chemotherapeutic agent alone. In turn, this allows the use of a lower dose of the other chemotherapeutic agent to achieve the same selective chemotherapeutic effects as would be obtained if the chemotherapeutic agent were employed alone, but at a higher dose.

20

**Detailed Description of the Invention**

The furanone component of the compositions of the present invention can be synthesized by any suitable technique. Alternatively, one can employ a mixture of the furanone and plasma soluble mineral ascorbates available commercially under the registered trademark "Ester-C" from Inter-Cal Corporation, Prescott, Arizona, U.S.A.

According to a particularly preferred embodiment of the invention, I provide a composition comprising doxorubicin (adriamycin) and a potentiating agent which is a member selected from the group consisting of plasma soluble mineral ascorbates, Vitamin C metabolites and Vitamin C-derived furanones and mixtures of two or more thereof. The mineral ascorbate is a non-toxic metal ascorbate, e.g., calcium ascorbate, sodium ascorbate, zinc ascorbate, magnesium ascorbate and the like. The Vitamin C metabolites include dehydroascorbic acid, threose, erythrose, 3-hydroxy kojic acid, 5-hydroxymaltol, aldonic acids, e.g., threonic, xylonic and lyxonic acids and non-toxic mineral salts thereof, e.g., calcium threonate, and corresponding aldono-lactones and lactides. The Vitamin C-derived furanones include, illustratively, 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone and related furanones.

The methods of the present invention comprise administering a cancer chemotherapeutic dose, as a single dose or in repeated doses, of the above-described potentiated cancer chemotherapeutic compositions. Administration can be by any suitable technique normally used to administer cancer chemotherapeutic agents, e.g.,

WO 02/20023

PCT/US01/26455

7

orally or by parenteral injection.

#### **Illustrative Examples**

5 The following examples are presented in order to illustrate the practice of the invention and the presently preferred embodiments thereof. These examples are only illustrative and are not intended as limitations on the scope of the invention, which is defined only in the appended claims.

#### 10 **EXAMPLE 1**

This example illustrates the cell-death, cytotoxic potential of a representative furanone, 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone, a vitamin C metabolite, against various human tumor -derived and normal cell types.

15 Four human tumor cell types, shown previously to be sensitive to combinations of mineral ascorbate plus metabolites are evaluated. These lines consist of: (i) a liver hepatoma (SK-Hep-1), (ii) a malignant melanoma (Malme-3M), (iii) a neuroblastoma (SK-N-MC) and (iv) a colon carcinoma (T84). Non-malignant cell  
20 types consist of: normal human liver (WRL 68), normal skin fibroblasts (Malme-3) and normal retinal epithelial cells (ARPE-19). The tumor-derived lines, normal liver and skin fibroblasts are obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The ARPE-19 cell line is a gift from a colleague at California Institute for

WO 02/20023

PCT/US01/26455

8

Medical Research. Cells are grown and maintained in culture, in a humidified incubator of 5% CO<sub>2</sub>/95% air.

Samples of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone, a highly purified synthesis product are provided by Inter-Cal Corporation, Prescott, Arizona, in two batches (Preparations 1 and 2) of frozen product. The samples are stored frozen immediately after receipt and when not in use. Master stocks (1% w/v) of the furanone are prepared in sterile water and stored frozen for duration of each experiment. On the day of treatment, master stocks are serially diluted in sterile water to obtain 10X strength working stocks.

Subconfluent monolayers of 1-2 old, adherent cultures (seeded at a density of 10,000 cells per well in a 96-well plate) are exposed to 0.1 volume of serial dilutions (10X concentrated solutions) of the furanone and the plate is returned to the incubator. Furanone treatment (second application) is repeated after 48 hrs by direct addition of respective 10X solution without change of culture medium. After further incubation for 48 hrs., the culture medium is replaced with fresh growth medium, followed by a third application of the corresponding furanone concentration. Control wells receive an equal volume of sterile water (in place of furanone solution) and are handled identically. After final incubation of 48 hrs. (following third treatment), cells lysates are prepared by extraction of the monolayer with 0.2 ml of lysis solution followed by low-speed centrifugation (2500 rpm, 10 min). The supernatant (cytoplasmic lysate) is saved and in aliquot (20 microliters) was assayed for the

WO 02/20023

PCT/US01/26455

9

presence of histone-DNA complexes (nucleosomal fragments) by photometric detection (absorbance at 405 - 410 nm) using cell death detection Elisa assay (Roche Diagnostics).

5           The effects of the furanone on normal human liver and hepatoma cells after three sequential treatments are shown in Figures 1 and 2. In the concentration range (0.01 - 0.0001%) evaluated, the compound produces a maximal change in cell-death rate of less than 0.3 logs in normal liver cells (Fig. 1). In contrast, sharp rises in cell death are seen in hepatoma cells treated with furanone concentrations in the 0.001 - 10   0.01% range (Fig. 2), which corresponds to a molarity range of 0.08 - 0.88 mM furanone. This effect in hepatoma cells declines with increasing furanone concentration (approaching 0.1%), possibly due to cell loss occurring from change in pH of the culture medium at the highest dose (0.1% furanone, data not shown).

15           Figures 3 and 4 display the effects of two different preparations of the furanone on malignant melanoma (Malme-3M) and its normal cellular counterpart, human skin fibroblasts (Malme-3). A similar cell-death inducing specificity to that seen in hepatoma cells is observed in malignant melanoma. Thus, both furanone preparations induced dose-dependent death of the melanoma line (from 5 to 10 fold 20   increase in apoptosis) relative to an unremarkable effect on normal skin fibroblasts (<0.3 log increase in apoptosis). The minimal concentration required to produce 2-fold change in apoptosis rate is slightly higher for melanoma cells (0.003% furanone) than that for hepatoma cells (<0.001% furanone).

WO 02/20023

PCT/US01/26455

10

In contrast to the effects on hepatoma and melanoma cell types, furanone treatment of colon carcinoma cells produces <0.5 log change in rate of cellular apoptosis (over that of untreated control) when evaluated in a comparable concentration range (up to a max. of 0.01% furanone). At lower concentration ranges  
5 (up to max of 0.003% in ARPE-19 and 0.001% in SK-N-MC), furanone treatment does not elicit significant changes in death rates of normal epithelial and neuroblastoma cells.

Thus, treatment of malignant and non-malignant human hepatoma and  
10 melanoma cell lines by 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone, a metabolite of vitamin C, shows preferential cytotoxicity of the compound towards malignant cells as indicated by tumor-specific induction of cell death.

#### EXAMPLE 2

15

The following procedures are carried out to illustrate ~~demonstrate~~ the activity of calcium ascorbate (CA), calcium ascorbate-calcium threonate compositions (CA+CT), calcium ascorbate-threonate-furanone compositions (CA+CT+FR) and a commercially available calcium ascorbate-metabolites-furanone composition (EC)  
20 available under the trademark Ester-C® from Inter-Cal Corporation, Prescott, Arizona, USA, alone and in combination with a typical cancer chemotherapeutic agent, adriamycin (doxorubicin).

WO 02/20023

PCT/US01/26455

11

Calcium ascorbate (CA), calcium threonate (CT), 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (FR) and Ester-C (EC) are obtained from Inter-Cal Corporation, Prescott, Arizona, USA. Tissue culture grade Ascorbic acid (AA) is from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA. The composition of calcium ascorbate (calcium di-  
5 (L-ascorbate) dihydrate) is made by sequentially dissolving the salt in sterile water to obtain master-stock solutions of equal strength (1% w/v). Aqueous solution of calcium ascorbate plus calcium threonate plus 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (CA/CT/FR) is prepared at ratio of 85/7.5/7.5. For comparative analysis, stock solutions containing identical ascorbic acid (AA) equivalents are used. All master  
10 stocks are stored at room temperature during the course of these procedures. From these, 10X strength working stocks are prepared by serial dilution on the day of use and are applied to cells in microtiter plates as described below.

Adriamycin (doxorubicin) is obtained from Sigma Chemical Company (St.  
15 Louis, MO). Stock solutions are made by dissolving adriamycin (ADR) in sterile water and DTIC in water or dilute acetic acid solution (0.01N). Stocks are stored frozen at -10 C and thawed prior to use. Serial dilutions are made in sterile water to obtain 10X strength solutions and one tenth volume of this is applied to cells at the  
time of treatment.

20

Target human tumor-derived lines consist of SK-Hep-1, a liver  
adenocarcinoma (hematoma) and Malme-3M, a malignant melanoma. All seed

WO 02/20023

PCT/US01/26455

12

cultures are obtained from ATCC, Manassas, VA, USA and are propagated/maintained in serum-containing growth medium in a humidified incubator of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. SK-Hep-I cells are grown in Eagle's minimum essential medium (EMEM) in Earle's salts plus non-essential amino acids supplemented with 10% FBS plus antibiotics and Malme-3M cells are cultured in McCoy's medium supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) plus antibiotics.

For treatment, exponentially growing cells are seeded at a density of  $1 \times 10^4$  cells per well of 96-well microtiter plate in 0.1 - 0.2 ml of growth medium. After overnight cell attachment at 37 C, duplicate wells are exposed to various treatments by direct application of one-tenth volume of 10x strength solution. For treatments involving chemotherapeutic agent, one-tenth volume of serial dilutions of adriamycin (0.0006 - 3.0 micromolar) are applied to wells followed by application of ascorbate-containing composition (adjuvant) or sterile water (control). The adjuvant treatment is repeated every other day or on the third day (as applicable) without change of growth medium. Untreated controls receive an equivalent amount of sterile water. After 2 - 3 treatments with adjuvant, cells are labeled with BudR as described below. (In some experiments, wells are refed an equal volume of growth medium prior to additional of BudR. This gives a higher amount of BrdU incorporation into DNA relative to no refueling).

For DNA labeling, the following procedure is adapted and modified from the Cell Proliferation ELISA, BudR (Colorimetric) assay of Roche Diagnostics,

Indianapolis, IN, USA: Each treated well is exposed to one-tenth volume of 10X BrdU-containing medium and reincubated at 37 C overnight (15 - 20 hrs.). One set of control wells is exposed to medium only (no BudR) to obtain an absorbance-control (substrate only) blank for the assay. After the labeling period, the culture medium is removed and the cells are fixed and DNA denatured in one step by adding FixDenat (30 min at RT). Then, FixDenat is removed, the anti-BrdU-peroxidase reagent is added and incubation continues for 90 min at RT. After removal of the latter, the plate is washed 3 times, followed by addition of substrate solution. The plate is kept at RT until color development became sufficient for photometric detection (5-10 min). At this time, reaction is stopped by addition to each well of 25 microliter 1M sulfuric acid followed by mixing for approximately 1 min on the shaker. The absorbance of the samples is measured in an ELISA reader at 450 nm, within 5 minutes after adding stop solution. The OD<sub>450nm</sub> is a measure of the level of BudR incorporation into DNA, which is proportional to rate of cell proliferation. For data analysis, the mean of the absorbance is plotted against concentration of chemotherapeutic drug for each treatment to obtain a dose-response relationship of the anti-proliferative effect.

Influence of Ascorbate, Ester-C and Triple Ascorbate plus Metabolites

Combination on Anti-Neoplastic Activity of Adriamycin Against Hepatoma Cells

Fig. 5 shows the effects of a dose of adriamycin (ADR) alone, ADR plus

WO 02/20023

PCT/US01/26455

14

0.5mM ascorbic acid and ADR plus calcium ascorbate (0.5mM AA equivalents) following one application of ADR and two applications of adjuvant (i.e. AA or CA). Note that combined treatment with adjuvant (AA or CA) gives greater suppression of hepatoma proliferation than ADR alone. The enhancing effect is prominent at low to moderate doses of ADR (0.003 - 0.03 micromolar) compared to higher ADR dose (0.3 micromolar). Calcium ascorbate is more effective than ascorbic acid. Similar type of hepatoma suppression is seen with ADR plus Ester-C (containing 0.5 mM AA equivalents) in the same test.

In another procedure, the effects of a triple ascorbate metabolites combination (CA+CT+FR @ ratio of 85:7.5:7.5) on ADR activity is evaluated in parallel with CA or EC. Fig. 7 shows the influence of 2 different concentrations (0.015% and 0.033%) of the triple mixture following one application of ADR and three applications of the mix. As can be seen from the graph, greater proliferation of hepatoma cells occurs following ADR + triple combination compared to ADR alone. Again, the enhancing effect is more prominent at low to moderate doses (0.0017 - 0.017 micromolar) of ADR than the higher dose (0.17 micromolar) ADR tested.

Fig. 8 shows the relative effects of 0.033% CA, EC and CA+CT+FR on ADR activity in the same experiment. All three ascorbate-containing compositions consistently improve the anti-proliferation activity of low doses of ADR, with EC and the triple ascorbate plus metabolites mix producing greater improvement than CA. Most notably, both EC and CA+CT+FR when used in combination with 0.017

WO 02/20023

PCT/US01/26455

15

micromolar ADR gives about the same or slightly better anti-neoplastic effect as compared to a 10-fold higher dose (0.17 micromolar) of ADR alone.

Effect of Triple Ascorbate plus Metabolites Composition on Anti-Proliferative Activity of Adriamycin in Melanoma Cells

5

Figures 9 and 10 show the effects of the triple mix (CA+CT+FR, at 0.033%) plus various doses of ADR against human melanoma cells, from two different tests. In both tests, the triple mix potentiates the anti-neoplastic activity of ADR preferentially at low to moderate doses of the chemotherapeutic drug.

10

Thus, ascorbate-containing compositions improve the anti-neoplastic activity of cancer chemotherapeutic agents (adriamycin), against both hepatoma and melanoma-derived cell lines as evaluated using a cell-proliferation immunoassay.

15

The enhancing effect is most prominent at low to moderate doses of the chemotherapeutic drug. Compositions containing ascorbate plus metabolites are more effective in enhancing adriamycin activity than ascorbate alone. Triple mixtures containing calcium ascorbate, calcium threonate and furanone (at ratio of 85:7.5:7.5) when combined with low-dose adriamycin suppress tumor cell proliferation at a level similar to or slightly better than a 10-fold higher dose or adriamycin alone. These results indicate the use of ascorbate plus metabolites in combination with low-dose chemotherapy with reduction of potential drug-associated toxicity.

20

WO 02/20023

PCT/US01/26455

16

**Example 3**

This example illustrates the activity of various ascorbate plus metabolite mixtures against human tumor-derived melanoma and hepatoma cell lines, using cell-proliferation immunoassay based on BrdU incorporation during DNA synthesis.

5

Aqueous solutions of the following mixtures are freshly prepared for use in each experiment:

Calcium ascorbate plus calcium threonate (CA/CT) at ratios of:

10 99/1 (standard mix),

97.2/2.5

95/5

92.5/7.5 and

90/10

15

Calcium ascorbate plus 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (CA/FR) at ratios of:

99.9/0.1 (standard mix)]

99/1

97.2/2.5

20

95/5 and

92.5/7.5

Calcium ascorbate plus calcium threonate plus 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone

WO 02/20023

PCT/US01/26455

17

(CA/CT/FR) at ratios of:

91.5/7.5/1

90/7.5/2.5

90/7.5/2.5

5 88.5/7.5/5

85/7.5/7.5

90/10/1 and

80/10/10

10 Calcium ascorbate, calcium threonate and 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone which is obtained from Inter-Cal Corporation, Prescott, Arizona. The composition of calcium ascorbate (Calcium di-(L-ascorbate) dihydrate) is L-ascorbic acid (82.15%), calcium (9.45%) and water (8.44%).

15 Aqueous mixtures are made by sequentially dissolving individual components in sterile water to obtain master-stock solutions of equal strength (1% w/v) for comparative analysis. In some cases, stock solutions of 1.08% strength are prepared to obtain comparable ascorbic-acid equivalents between double and triple combination mixtures. All master stocks are stored at room temperature during the

20 course of these experiments. From these, 10X strength working stocks are prepared by serial dilution on the day of use and applied to cells in micro titer plates as described below. The standard mixes contain constituent metabolites at ratios reflecting those in "Ester-C" brand Calcium Ascorbate are obtained from Inter-Cal

WO 02/20023

PCT/US01/26455

18

Corporation, Prescott, Arizona..

5 Target human tumor-derived or normal lines consist of Malme-3M, a malignant melanoma, SK-Hep-1, a liver adenocarcinoma (hepatoma) and WRL 68 cells, a line of normal liver cells. All seed cultures are obtained from ATCC (Manassas, VA) and are propagated/maintained in serum-containing growth medium in a humidified incubator of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. Malme-3M cells are cultured in McCoy's medium supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) plus antibiotics and SK-Hep-1 and CL-48 lines are grown in Eagles' minimum essential medium 10 (EMEM) in Earle's salts plus non-essential amino acids supplemented with 10% FBS plus antibiotics.

15 The following procedure is adapted and modified from the Cell Proliferation ELISA, BudR (Colorimetric) assay of Roche Diagnostics (Indianapolis, IN).

For treatment, exponentially growing cells are seeded at a density of  $1 \times 10^4$  cells per well of 96-well micro titer plate in 0.1 - 0.2 ml of growth medium. After overnight cell attachment at 37 C, duplicate wells are exposed to serial dilutions of ascorbate/metabolite mixture by direct application of one-tenth volume of 10x 20 strength solution. The treatment is repeated daily by application of respective ascorbate/metabolite mixture without change of growth medium. Untreated controls receive an equivalent amount of sterile water. After 2-3 daily treatments, cells are labeled with BudR as described below. (In some experiments, wells are re-fed an

WO 02/20023

PCT/US01/26455

19

equal volume of growth medium prior to addition of BudR. The gave a higher amount of BrdU incorporation into DNA relative to no refluiding).

For DNA labeling, each treated well is exposed to one-tenth volume of 10X  
5 BrdU-containing medium and reincubated at 37 C overnight (15-20 hrs). One set of control wells is exposed to medium only (no BudR) to obtain an absorbance-control (substrate only) blank for the assay. After the labeling period, the culture medium is removed and the cells are fixed and DNA denatured in one step by adding FixDenat (30 min at RT). Then, FixDenat is removed, the anti-BrdU-peroxidase reagent is  
10 added and incubation continued for 90 min at RT. After removal of the latter, the plate is washed 3 times, followed by addition of substrate solution. The plate is kept at RT until color development becomes sufficient for photometric detection (5-10 min). At that time, reaction is stopped by addition of 25 microliter 1M sulfuric acid to each well and the plate is placed for approximately one minute on the shaker. The  
15 absorbance of the samples is measured in an ELISA reader at 450 nm, within 5 min after adding stop solution. The OD at 450 nm is a measure of the level of BudR incorporation into DNA, which is proportional to rate of cell proliferation. For data analysis, the mean of the absorbance is plotted against concentration of ascorbate/metabolite mixture to obtain a dose-response relationship of the anti-  
20 proliferative effect.

The results of such experiments, shown graphically in Figs. 11 - 16A, illustrate that:

WO 02/20023

PCT/US01/26455

20

- Mixtures containing ascorbate, threonate and/or furanone at various ratios elicit tumor-specific suppression of cell proliferation in melanoma and hepatoma cell types.
- 5
- Increasing the ratio of calcium threonate from 1% to 7.5% in the CA + CT mixture, enhances the relative anti-tumor activity of the double combination in both tumor cell types.
- 10
- Addition of furanone to calcium ascorbate enhances anti-proliferative activity in melanoma cells, with the double CA/FR combination (92.5%/7.5% ratio) displaying higher activity than the simulated CA/FR mixture (99.9%/0.1% ratio). There is approximately a 9-fold difference between these two mixtures at the 0.05% dose (OD of 0.008 vs 0.088).
- 15
- Addition of furanone to the CA +CT double mixture enhances its activity in both tumor cell types, with the triple CA/CT/FR combination (85/7.5/7.5 ratio) giving optimal activity. The enhancing effect of furanone addition against hepatoma is more prominent in the triple mix than in the double (CA +FR) combination. Further increases in the relative level of FR and CT to 10% do
- 20
- not improve the anti-tumor activity of the triple combination (data not shown).

WO 02/20023

PCT/US01/26455

21

- In contrast to the effects seen in tumor cells, the triple mixture CA/CT/FR does not suppress proliferation in normal liver cells, even when tested at (relatively higher) ascorbic acid equivalents (92.5/7.5/7.5) comparable to that contained in the double CA + CT mixture (92.5/7.5).

5

Thus, double mixtures of calcium ascorbate plus calcium threonate (CA + CT) or calcium ascorbate plus furanone (CA + FR) at ratios of 92.5 : 7.5 and triple mixtures of the three components (CA + CT + FR) at ratio of 85 : 7.5 : 7.5 manifest optimal anti-proliferative activity against malignant melanoma and hepatoma cell types in a rapid screening immunoassay. Such mixtures allow anti-tumor effects to be observed at lower ascorbic-acid equivalents than that contained in simulated standards.

10

#### Example 4

15

This example illustrates the activity of the representative furanone, 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone, alone and the furanone plus adriamycin against human hepatoma and melanoma cells, using cell-proliferation immunoassay based on BrdU incorporation into cellular DNA.

20

A newly synthesized batch of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (FR) is provided by Inter-Cal Corp., Prescott, Arizona. Master stock solutions (0.1% or 0.75% strength) are made by dissolving desired amount of furanone in sterile water

WO 02/20023

PCT/US01/26455

22

and stored frozen (at -10 C) until use. Calcium ascorbate (CA), calcium threonate (CT), and Ester-C (EC) is also obtained from Inter-Cal. The composition of calcium ascorbate (calcium di-L-ascorbate) dihydrate is L-ascorbic acid (82.15%), calcium (9.45%) and water (8.44%). Aqueous mixtures of ascorbate plus metabolites are prepared by sequentially dissolving individual components in sterile water to obtain master-stock solution of desired strength. A triple mix of calcium ascorbate plus calcium threonate plus 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (CA/CT/FR) is prepared at ratio of 85/7.5/7.5 or 87.5/7.5/5.0. Master stocks are kept at room temperature during the course of the experiment. From these, 10X strength working stocks is prepared by serial dilution on the day of use and applied to cells in microtiter plates as described below.

Adriamycin (doxorubicin) is obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Stock solutions are made by dissolving adriamycin (ADR) in sterile water. Stocks are stored frozen at -10 C and thawed prior to use. Serial dilutions are made in sterile water to obtain 10X strength solutions and 0.1 volume of this is applied to cell at the time of treatment.

Target human tumor-derived lines consist of SK-Hep-1, a liver adenocarcinoma (hepatoma) and Malme-3M, a malignant melanoma. Seed cultures are obtained from ATCC (Manassas, VA) and propagated/maintained in serum-containing growth medium in a humidified incubator of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. SK-Hep-1 cells are grown in Eagles' minimum essential medium (EMEM) containing Earles'

WO 02/20023

PCT/US01/26455

23

salts plus non-essential amino acids supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) plus antibiotics and Malme-3M cells are cultured in McCoy's medium supplemented with 15% FBS plus antibiotics.

5 For treatment, exponentially growing cells are seeded at a density of  $1 \times 10^4$  cells per well in a 96-well microtiter plate in 0.1 - 0.2 ml of growth medium. After overnight cells attachment at 37 C, duplicate wells are exposed to various treatments by direct application of one-tenth volume of 10x strength solution. For treatments involving chemotherapeutic agent, one-tenth volume of serial dilutions of adriamycin  
10 (in the indicate dosage range) are applied to wells followed by application of adjuvant (i.e. furanone or ascorbate plus metabolites). The treatment with adjuvant is repeated daily or every other day (as applicable) without change of growth medium. Untreated controls received an equivalent amount of sterile water. After ~3 treatments with adjuvant, cells are labeled overnight with bromo-deoxyuridine  
15 (BudR), as described below. (In some experiments, wells are re-fed an equal volume of growth medium prior to addition of BudR. This gave a higher amount of BrdU incorporation into DNA relative to no refluiding).

For DNA labeling, the following procedure is adapted and modified from the  
20 Cell Proliferation ELISA, BudR (Colorimetric) assay of Roche Diagnostics (Indianapolis, IN). Each treated well is exposed to one-tenth volume of 10X BrdU-containing medium and reincubated at 37 C overnight (15-20 hrs). One set of control wells is exposed to medium only (no BudR) to obtain an absorbance-control

WO 02/20023

PCT/US01/26455

24

(substrate only) blank for the assay. After the labeling period, the culture medium is removed and the cells are fixed and DNA denatured in one step by adding FixDenat (30 min at RT). Then, FixDenat is removed, the anti-BrdU-peroxidase reagent added and incubation continued for 90 minutes at room temperature. After removal of the  
5 latter, the plate is washed 3 times, followed by addition of substrate solution. The plate is kept at room temperature until color development became sufficient for photometric detection (5-10 min). At this time, reaction is stopped by addition to each well of 25 microliter 1M sulfuric acid followed by mixing for approx. 1 min on the shaker. The absorbance of the samples is measured in an ELISA reader at 450  
10 nm, within 5 min after adding stop solution. The  $OD_{450nm}$  is a measure of the level of BrdR incorporation into DNA, which is proportional to rate of cell proliferation. For data analysis, the mean of the absorbance is plotted against concentration of adjuvant or chemotherapeutic drug from each treatment to obtain a dose-response relationship of the anti-proliferative effect.

15

The concentration range of the tests (0.003-0.01%), a dose-dependent reduction of hepatoma proliferation is seen, with 0.01% furanone producing ~ 4.6 fold reduction in cellular DNA synthesis compared to untreated control. A similar dose-dependent profile is obtained in 3 independent experiments.

20

ADR alone produces dose-dependent inhibition of hepatoma proliferation in the range of the tests (0.02 - 0.33 micromoles). When combined with furanone (0.001 - 0.01%), the combination confers greater inhibition, producing from approximately <

WO 02/20023

PCT/US01/26455

25

2 to 22 fold enhancement of hepatoma inhibition over that obtained with corresponding dose of ADR alone. (From two independent experiments, the minimal dose of furanone required to produce 2-fold enhancement of ADR inhibition is ~ 0.0016%, which corresponds approximately to the absolute concentration of furanone in a 1% Ester-C solution.) These experiments define the range of furanone concentration which is to be used in subsequent experiments of comparative analysis.

In the concentration range tested (0.001 - 0.01%), furanone is more effective in inhibiting hepatoma proliferation than either the triple ascorbate/metabolite mix or Ester-C® when compared at the same absolute concentration in aqueous solution.

At the minimal dose of ADR (0.007 micromolar) and maximal dose of adjuvant (0.01%), furanone enhances the inhibitory effect of ADR by 7-fold compared to 3.1 and 2.7 fold enhancements one obtains respectively with the triple mix and EC.

Furanone (at 0.1%) consistently enhances the inhibitory effect of ADR at all concentrations of the chemotherapeutic drug. In contrast, whereas the triple mix and EC gives comparable enhancement at moderate doses of ADR (0.136 micromolar), furanone performs better than either composition at low doses of ADR (0.005 - 0.27 micromolar).

WO 02/20023

PCT/US01/26455

26

Thus, furanone alone is capable of inhibiting cell proliferation in both  
hepatoma and melanoma cell lines. Additionally, furanone can function as an  
adjuvant in combination with a chemotherapeutic drug (adriamycin), enhancing its  
inhibitor effects in combinatorial experiments. On a weight-to-weight basis, the anti-  
5 proliferative and adjuvant (synergistic) effects of furanone are higher than those of  
triple ascorbate/metabolite mix and Ester-C, indicating that the chemical structure of  
furanone may contain the active component responsible for the anti-tumor effects of  
compositions containing ascorbate and its metabolites.

10 Having described my invention in such terms as to enable those skilled in the  
art to understand and practice it and, having identified the presently preferred  
embodiments there, I CLAIM:

WO 02/20023

PCT/US01/26455

27

1. A cancer chemotherapeutic composition comprising a  
chemotherapeutic agent and a potentiating agent which is a member selected from the  
group consisting of a mineral ascorbates, Vitamin C metabolites and ascorbic acid-  
5 derived furanones and mixtures thereof.
2. The composition of Claim 1, wherein said chemotherapeutic agent is  
doxorubicin, said mineral ascorbate is calcium ascorbate, said metabolite is calcium  
threonate and said furanone is a 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone.  
10
3. The composition of Claim 1, wherein said potentiating agent is a 4-  
hydroxy-5-methyl-3(2H) furanone.
4. A cancer chemotherapeutic composition comprising doxorubicin and a  
15 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone.
5. The method of cancer chemotherapy comprising contacting tumor cells  
with the composition of Claim 1.
- 20 6. The method of cancer chemotherapy comprising contacting tumor cells  
with the composition of Claim 2.

WO 02/20023

PCT/US01/26455

28

7. The method of cancer chemotherapy comprising contacting tumor cells with the composition of Claim 3.

8. The method of cancer chemotherapy comprising contacting tumor cells with the composition of Claim 4.

9. In the manufacture of a cancer chemotherapeutic composition, the use of a 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone.

10

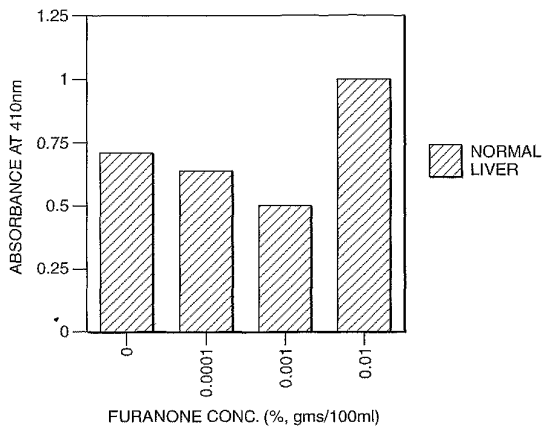


FIG. 1

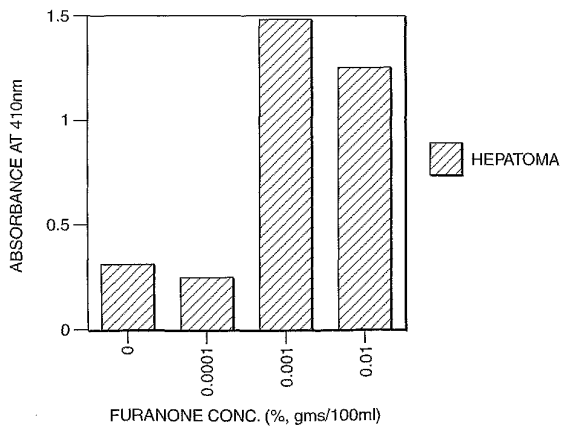


FIG. 2

WO 02/20023

2/11

PCT/US01/26455

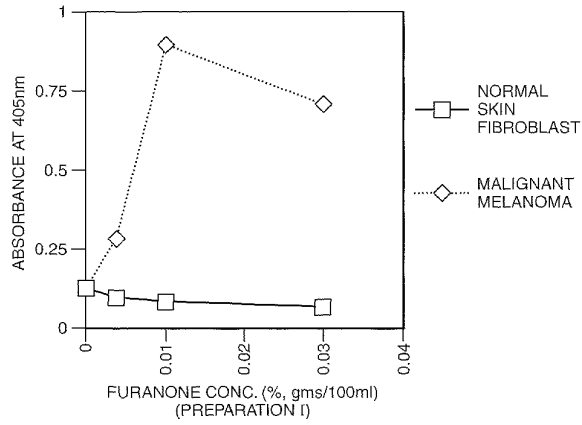


FIG. 3

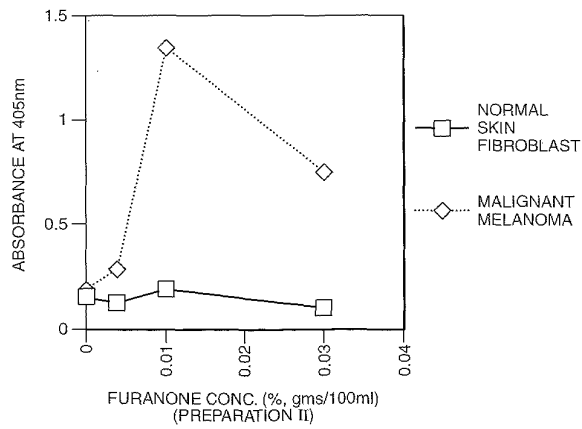


FIG. 4

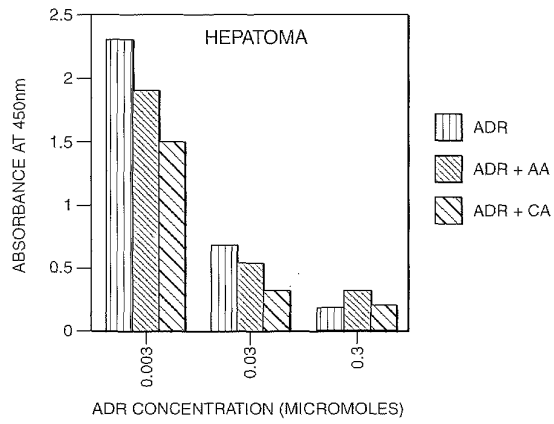


FIG. 5

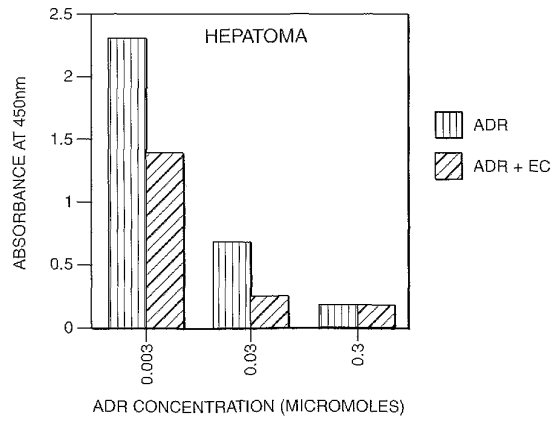


FIG. 6

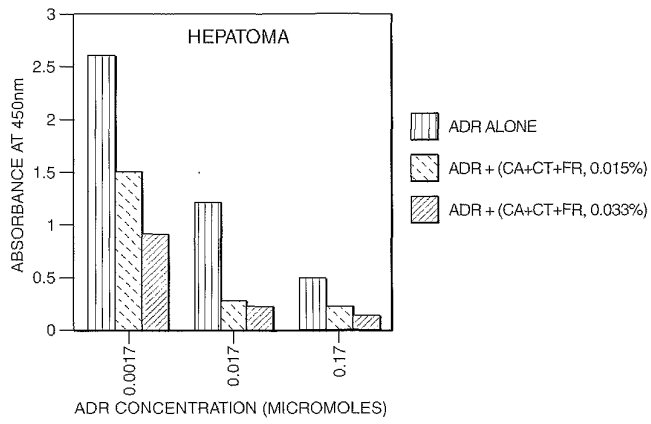


FIG. 7

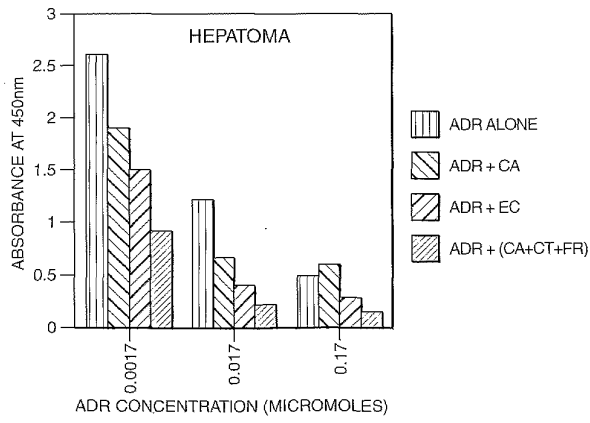


FIG. 8

WO 02/20023

5/11

PCT/US01/26455

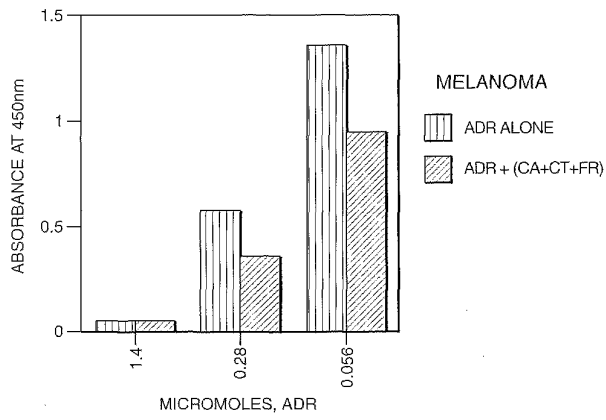


FIG. 9

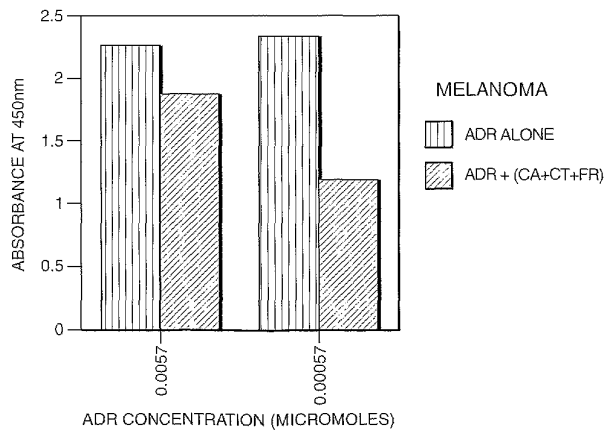


FIG. 10

WO 02/20023

6/11

PCT/US01/26455

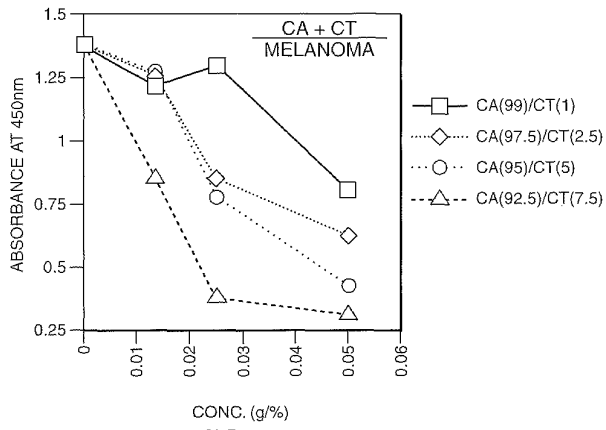


FIG. 11

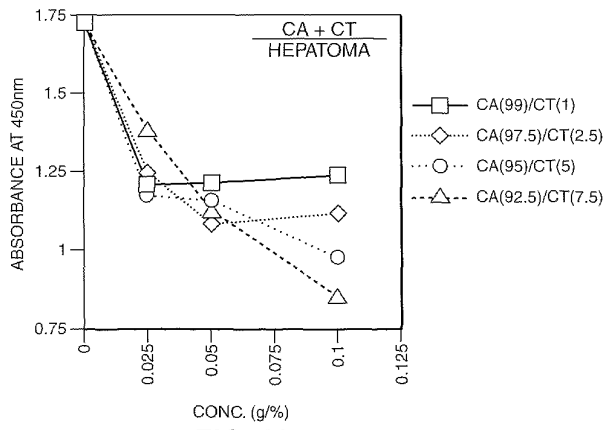


FIG. 12

WO 02/20023

7/11

PCT/US01/26455

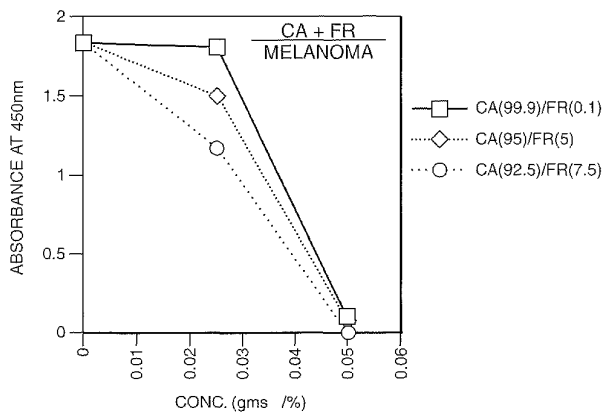


FIG. 13

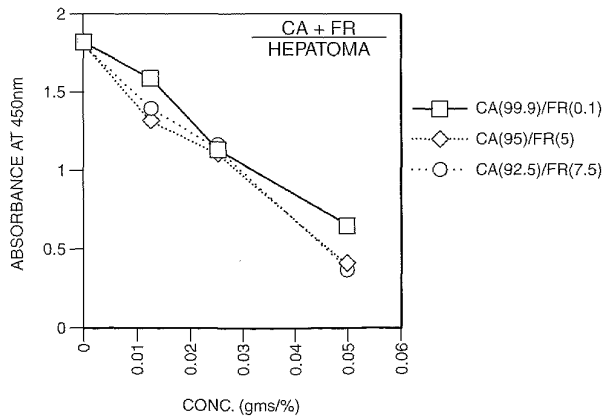


FIG. 14

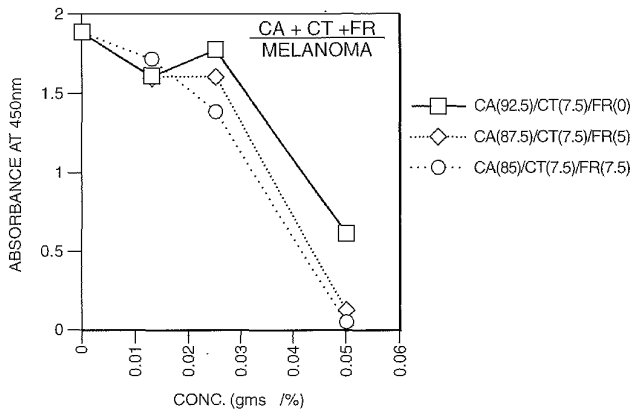


FIG. 15

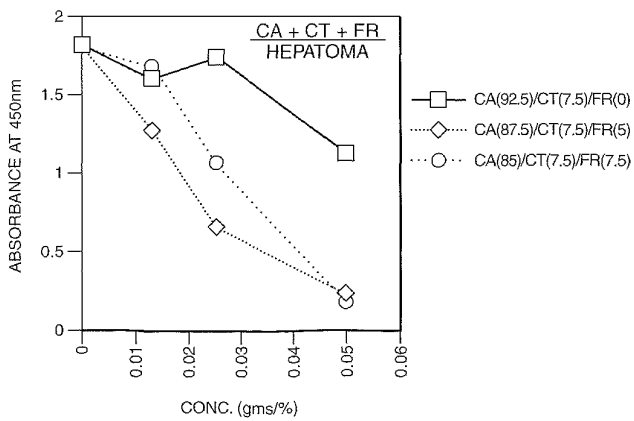


FIG. 16

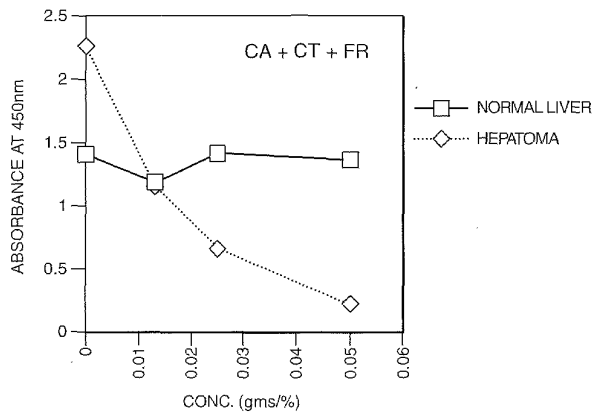


FIG. 16A

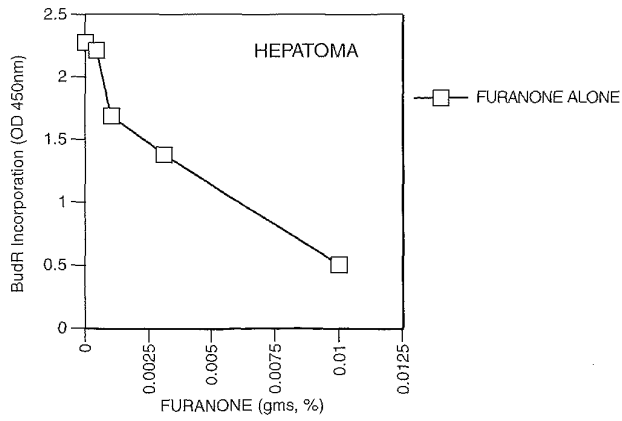


FIG. 17

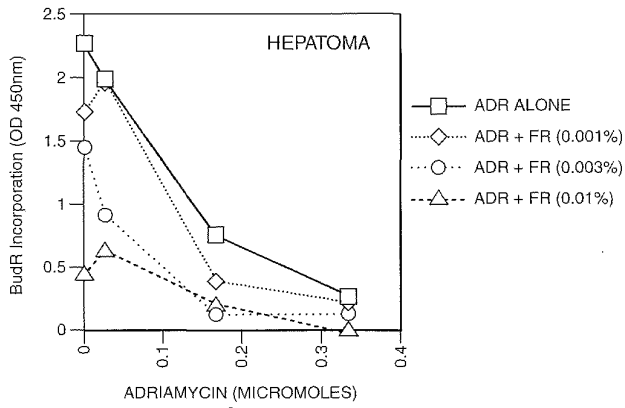


FIG. 18

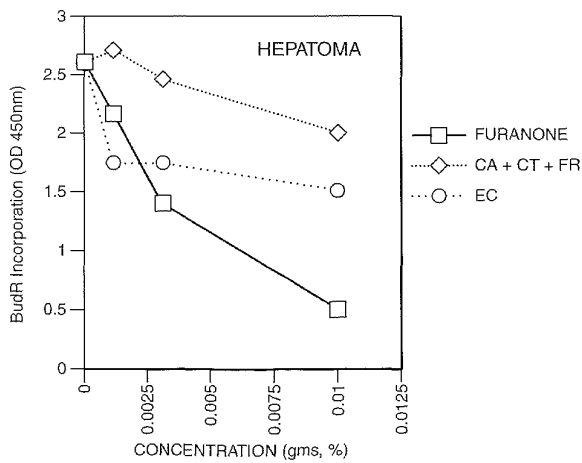


FIG. 19

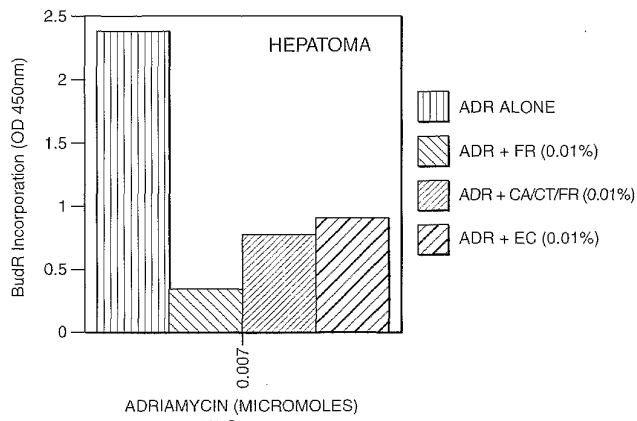


FIG. 20

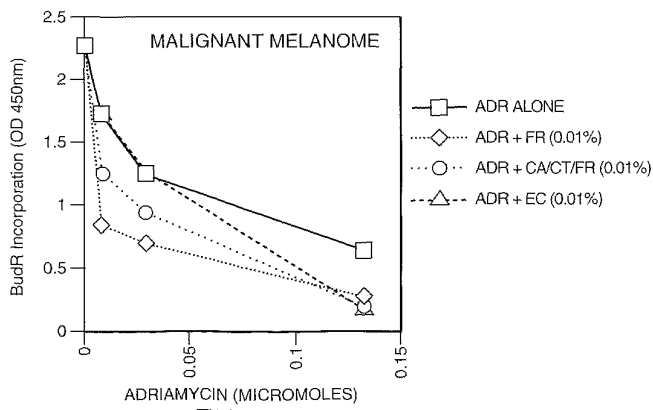



FIG. 21

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP01/26455
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 31/70 US CL : 514/54 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/54 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 87/03481 A1(AMERICAN BIOTECHNOLOGY COL., LTD) 18 June 1987, see page 6, lines 1-18.	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:    "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance    "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "E" earlier document published on or after the international filing date    "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed    "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 OCTOBER 2001		Date of mailing of the international search report 19 NOV 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 806-9250		Authorized officer: ELLI PESELEV  Telephone No. (703) 808-1235

---

 フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 2 1

(72)発明者 ジャリワラ、ラキシット・ジェイ  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 5 0 7 0 サラトガ、バインヤード・ドライブ 1 9 1 2  
 0

Fターム(参考) 4C084 AA20 MA02 NA05 ZB262 ZC752  
 4C086 AA01 AA02 BA03 BA18 EA10 MA02 MA04 MA09 NA05 ZB26  
 ZC75  
 4C206 AA01 AA02 DA07 MA02 MA04 MA13 MA28 NA05 ZB26 ZC75