

(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2018-507910

(P2018-507910A)

(43) 公表日 平成30年3月22日(2018.3.22)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 31/198 (2006.01)	A 61 K 31/198	4 B 06 3
A61K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00	4 C 08 4
A61K 39/00 (2006.01)	A 61 K 39/00	H 4 C 08 5
A61K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	D 4 C 20 6
A61P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 96 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-560893 (P2017-560893)	(71) 出願人	517281657 ジ・アリゾナ・ボード・オブ・リージェン ツ・オン・ビハーフ・オブ・ジ・ユニバー シティ・オブ・アリゾナ アメリカ合衆国・アリゾナ・85721- 0300・ツーソン・ウエスト・シックス ス・ストリート・220
(86) (22) 出願日	平成28年2月12日 (2016. 2. 12)	(71) 出願人	517282104 キャンサー・プリヴェンション・ファーマ シューティカルズ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国・アリゾナ・85718- ツーソン・イースト・リヴァー・ロード・ 1760・スイート・250
(85) 翻訳文提出日	平成29年10月5日 (2017. 10. 5)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/017751		
(87) 國際公開番号	W02016/130918		
(87) 國際公開日	平成28年8月18日 (2016. 8. 18)		
(31) 優先権主張番号	62/154,804		
(32) 優先日	平成27年4月30日 (2015. 4. 30)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/115,413		
(32) 優先日	平成27年2月12日 (2015. 2. 12)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】神経芽細胞腫を治療する方法

(57) 【要約】

本発明は、a)高レベルのODC活性及び細胞ポリアミン含有量の増加と部分的に関連する神経芽細胞腫(例えは、高リスク神経芽細胞腫)を予防及び/又は治療すること、b)がん患者生存率、特に、がんが高レベルのODC活性及び細胞ポリアミン含有量の増加と一部関連するがん患者の生存率を予測すること、並びにc)ODC1遺伝子の対立遺伝子ヌクレオチド配列、或いはポジション+263及び/又は+316におけるSNPに基づき、そのような患者のために治療オプションを選択することを目的とする方法及びキットを提供する。本発明は、治療の選択を支援する手段として、+263及び/又は+316ポジションにおけるODC1遺伝子型の決定を含むがん治療法も提供し、同法には、いくつかの態様では、単剤療法として又は1つ若しくは複数のその他の薬物と併用して、薬学的に有効な量のジフルオロメチルオルニチン(DFMO)を投与する工程が含まれる。更に、本発明は、がん幹細胞を有することが確認された患者、例えはがん寛解状態にあり再発リスクを有する患者等を予防及び/又は治療する方法を提供する。

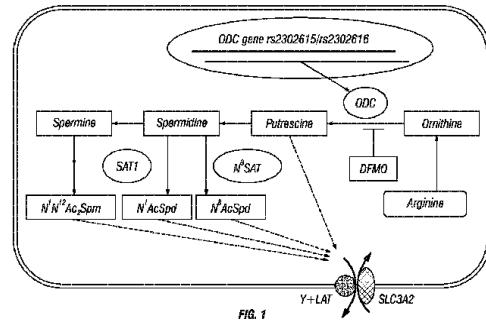


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

それを必要としている患者の神経芽細胞腫を予防的又は治癒的に処置する方法であって、
-ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)を含む有効量の薬物療法を前記患者に実施する
工程を含む前記方法。

【請求項 2】

前記薬物療法が、第2の薬剤を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記第2の薬剤が、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、ポリアミントランスポーターイン
ヒビター、eIF-5a拮抗薬、化学療法薬、又は免疫調節薬である、請求項2に記載の方法。 10

【請求項 4】

前記NSAIDが、スリンダク、セレコキシブ、又はアスピリンである、請求項3に記載の
方法。

【請求項 5】

前記ポリアミントランスポーターインヒビターが、AMTX1501である、請求項3に記載の
方法。

【請求項 6】

前記eIF-5a拮抗薬が、GC7又はプロテアソームインヒビターである、請求項3に記載の
方法。

【請求項 7】

前記プロテアソームインヒビターが、ボルテゾミブである、請求項6に記載の方法。 20

【請求項 8】

前記化学療法薬が、エトボシド、シクロホスファミド、トポテカン、PI3Kインヒビター
、又はオーロラキナーゼインヒビターである、請求項3に記載の方法。

【請求項 9】

前記免疫調節薬が、GD2抗体、GD2ワクチン、GM-CSF、IL-2、又はレチノイドである、請
求項3に記載の方法。

【請求項 10】

前記レチノイドが、イソトレチノインである、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

前記第2の薬剤が、DFMOの投与前に投与される、請求項2に記載の方法。 30

【請求項 12】

前記第2の薬剤が、DFMOの投与と同時に投与される、請求項2に記載の方法。

【請求項 13】

前記薬物療法が、小児投与用に処方化される、請求項1に記載の方法。

【請求項 14】

前記薬物療法が、経口用の液剤、経口用の粉末、コーティングされた錠剤、又はチュア
ブル錠剤として処方化される、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

患者の神経芽細胞腫を予防的又は治癒的に処置する方法であって、 40

a)少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺
伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、

b)前記結果が、ODC1遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+2
63における患者の遺伝子型がTであることを示唆する場合には、-ジフルオロメチルオル
ニチン(DFMO)を含む有効量の薬物療法を前記患者に実施する工程と、
を含む前記方法。

【請求項 16】

工程a)が、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者
の遺伝子型を試験する工程を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

前記結果が、前記遺伝子型を収録する報告を入手すること、又は前記結果を明らかにする患者履歴を得ることにより取得される、請求項15に記載の方法。

【請求項 18】

前記試験が、患者のODC1遺伝子の一方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する、請求項15に記載の方法。

【請求項 19】

前記試験が、患者のODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する、請求項15に記載の方法。

【請求項 20】

前記結果が、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がT/Tであることを示唆する、請求項19に記載の方法。 10

【請求項 21】

前記結果が、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型が、T/Gであることを示唆する、請求項19に記載の方法。

【請求項 22】

少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、

前記結果が、ODC1遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型がGであることを示唆する場合には、有効量の療法を前記患者に唯一実施する工程と、 20

を更に含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 23】

前記患者における聴器毒性を防止する又はそのリスクを低減する、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

前記患者から得た腫瘍サンプル内のODC1遺伝子産物の発現レベルを決定する試験から結果を取得する工程と、

前記結果が、前記腫瘍サンプル内のODC1遺伝子産物の発現レベルが対照サンプルと比較して上昇していることを示唆する場合には、有効量の療法を前記患者に実施する工程と、 30
を更に含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 25】

前記患者が前記薬物療法によりすでに治療を受けていたが低投薬量であった場合には、前記薬物療法は、前記試験の結果を取得する前に前記薬物療法の投薬量を増加させる工程を更に含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 26】

前記薬物療法が、第2の薬剤を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 27】

前記第2の薬剤が、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、ポリアミントランスポーターインヒビター、eIF-5a拮抗薬、化学療法薬、又は免疫調節薬である、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

前記NSAIDが、スリンダク、セレコキシブ、又はアスピリンである、請求項27に記載の方法。 40

【請求項 29】

前記ポリアミントランスポーターインヒビターが、AMTX1501である、請求項27に記載の方法。

【請求項 30】

前記eIF-5a拮抗薬が、GC7又はプロテアソームインヒビターである、請求項27に記載の方法。

【請求項 31】

前記プロテアソームインヒビターが、ボルテゾミブである、請求項30に記載の方法。 50

【請求項 3 2】

前記化学療法薬が、エトボシド、シクロホスファミド、トポテカン、PI3Kインヒビター、又はオーロラキナーゼインヒビターである、請求項27に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記免疫調節薬が、GD2抗体、GD2ワクチン、GM-CSF、IL-2、又はレチノイドである、請求項27に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記レチノイドが、イソトレチノインである、請求項33に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記患者内で新たな神経芽細胞腫が形成されるのを防止する、請求項15に記載の方法。

10

【請求項 3 6】

神経芽細胞腫の予防的又は治癒的な処置に対する患者の適合性を評価する方法であって、

a)少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、

b)前記結果が、ODC1遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTであることを示唆する場合には、前記患者は薬物療法による治療に適するものと識別する工程と、

を含み、

前記療法が、有効量の -ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)を前記患者に投与する工程を含む、

20

前記方法。

【請求項 3 7】

工程a)が、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型を試験する工程を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記結果が、前記遺伝子型を収録する報告入手すること、又は前記結果を明らかにする患者履歴を得ることにより取得される、請求項36に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記試験が、患者のODC1遺伝子の一方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する、請求項36に記載の方法。

30

【請求項 4 0】

前記試験が、患者のODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する、請求項36に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記結果が、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がT/Tであることを示唆する、請求項40に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記結果が、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がT/Gであることを示唆する、請求項40に記載の方法。

40

【請求項 4 3】

少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、

前記結果が、ODC1遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型がGであることを示唆する場合には、有効量の療法を前記患者に実施する工程と、を更に含む、

請求項36に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記患者における聴器毒性又はそのリスクを予防する、請求項43に記載の方法。

【請求項 4 5】

50

前記患者が前記薬物療法によりすでに治療を受けていたが低投薬量であった場合には、前記薬物療法が、前記試験の結果を取得する前に前記薬物療法の投薬量を増加させる工程を更に含む、請求項36に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記薬物療法が、第2の薬剤を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記第2の薬剤が、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、ポリアミントランスポーターインヒビター、eIF-5a拮抗薬、化学療法薬、又は免疫調節薬である、請求項46に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記NSAIDが、スリンダク、セレコキシブ、又はアスピリンである、請求項47に記載の方法。 10

【請求項 4 9】

前記ポリアミントランスポーターインヒビターが、AMTX1501である、請求項47に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記eIF-5a拮抗薬が、GC7又はプロテアソームインヒビターである、請求項47に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記プロテアソームインヒビターが、ボルテゾミブである、請求項50に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記化学療法薬が、エトポシド、シクロホスファミド、トポテカン、PI3Kインヒビター、又はオーロラキナーゼインヒビターである、請求項47に記載の方法。 20

【請求項 5 3】

前記免疫調節薬が、GD2抗体、GD2ワクチン、GM-CSF、IL-2、又はレチノイドである、請求項47に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記レチノイドが、イソトレチノインである、請求項53に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記患者内で新たな神経芽細胞腫が形成されるのを防止する、請求項36に記載の方法。

【請求項 5 6】

神経芽細胞腫に対するリスクを有する患者における神経芽細胞腫の発症又は再発を予防する方法であって、 30

a)少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、

b)前記結果が、ODC1遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTであることを示唆する場合には、有効量の -ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)を前記患者に投与する工程と、
を含む前記方法。

【請求項 5 7】

前記患者が、がん幹細胞を含む、請求項56に記載の方法。 40

【請求項 5 8】

前記患者が、前がん病変関連のODC過活動を含む、請求項56に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記患者が、前がん病変、及び上昇した細胞ポリアミンレベルを含む、請求項56に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記患者が、これまでに少なくとも1ラウンドの抗がん療法を受けたことがある、請求項56に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記患者が、がん寛解状態にある、請求項56に記載の方法。 50

【請求項 6 2】

工程a)が、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型を試験する工程を含む、請求項56に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記結果が、前記遺伝子型を収録する報告入手すること、又は前記結果を明らかにする患者履歴を得ることにより取得される、請求項56に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記試験が、患者のODC1遺伝子の一方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する、請求項56に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記試験が、患者のODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する、請求項56に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記結果が、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がT/Tであることを示唆する、請求項65に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記結果が、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がT/Gであることを示唆する、請求項65に記載の方法。

【請求項 6 8】

少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、

前記結果が、ODC1遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型がGであることを示唆する場合には、有効量の療法を前記患者に実施する工程と、

を更に含む、請求項56に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記患者における聴器毒性又はそのリスクを予防する、請求項68に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記患者が前記薬物療法によりすでに治療を受けていたが低投薬量であった場合には、前記薬物療法が、前記試験の結果を取得する前に前記薬物療法の投薬量を増加させる工程を更に含む、請求項56に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記薬物療法が、第2の薬剤を含む、請求項56に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記第2の薬剤が、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、ポリアミントランスポーターインヒビター、eIF-5a拮抗薬、化学療法薬、又は免疫調節薬である、請求項71に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記NSAIDが、スリンダク、セレコキシブ、又はアスピリンである、請求項72に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記ポリアミントランスポーターインヒビターが、AMTX1501である、請求項72に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記eIF-5a拮抗薬が、GC7又はプロテアソームインヒビターである、請求項72に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記プロテアソームインヒビターが、ボルテゾミブである、請求項75に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記化学療法薬が、エトボシド、シクロホスファミド、トポテカン、PI3Kインヒビター、又はオーロラキナーゼインヒビターである、請求項72に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 8】

前記免疫調節薬が、GD2抗体、GD2ワクチン、GM-CSF、IL-2、又はレチノイドである、請求項72に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記レチノイドが、イソトレチノインである、請求項78に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記患者内で新たな神経芽細胞腫が形成されるのを防止する、請求項56に記載の方法。

【請求項 8 1】

カルチノーマに対するリスクを有する患者におけるカルチノーマの発症又は再発を予防する方法であって、
10

a)前記患者から得たサンプルにおいてがん幹細胞の有無を判定する試験から結果を取得する工程と、

b)前記結果が、患者のサンプルががん幹細胞を含むことを示唆する場合には、有効量の
-ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)を前記患者に投与する工程と、

を含む前記方法。

【請求項 8 2】

前記がん幹細胞の有無が、がん幹細胞バイオマーカーの有無を検出する工程により決定される、請求項81に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記患者が、転移性のがんを有する、請求項81に記載の方法。
20

【請求項 8 4】

前記患者が、これまでに少なくとも1ラウンドの抗がん療法を受けたことがある、請求項81に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記患者が、がん寛解状態にある、請求項81に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記カルチノーマが、結腸直腸がん、神経芽細胞腫、乳がん、膵がん、脳がん、肺がん、胃がん、血液のがん、皮膚がん、精巣がん、前立腺がん、卵巣がん、肝がん、又は食道がん、子宮頸がん、頭部及び頸部のがん、非メラノーマ皮膚がん、又は神経膠芽腫である、請求項81に記載の方法。
30

【請求項 8 7】

前記患者が、前がん病変関連のODC過活動を含む、請求項81に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記患者が、前がん病変、及び上昇した細胞ポリアミンレベルを含む、請求項81に記載の方法。

【請求項 8 9】

工程a)が、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型を試験する工程を含む、請求項81に記載の方法。
40

【請求項 9 0】

前記結果が、前記遺伝子型を収録する報告入手すること、又は前記結果を明らかにする患者履歴を得ることにより取得される、請求項81に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記試験が、患者のODC1遺伝子の一方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する、請求項81に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記試験が、患者のODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する、請求項81に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記結果が、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がT/Tであることを示唆する、請求項92に記載の方法。
50

【請求項 9 4】

前記結果が、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がT/Gであることを示唆する、請求項92に記載の方法。

【請求項 9 5】

少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、

前記結果が、ODC1遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型がGであることを示唆する場合には、有効量の療法を前記患者に実施する工程と、

を更に含む、請求項81に記載の方法。

10

【請求項 9 6】

前記患者における聴器毒性又はそのリスクを予防する、請求項95に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記患者が前記薬物療法によりすでに治療を受けていたが低投薬量であった場合には、前記薬物療法が、前記試験の結果を取得する前に前記薬物療法の投薬量を増加させる工程を更に含む、請求項81に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記薬物療法が、第2の薬剤を含む、請求項81に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記第2の薬剤が、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、ポリアミントランスポーターインヒビター、eIF-5a拮抗薬、化学療法薬、又は免疫調節薬である、請求項98に記載の方法。

20

【請求項 1 0 0】

前記NSAIDが、スリンダク、セレコキシブ、又はアスピリンである、請求項99に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記ポリアミントランスポーターインヒビターが、AMTX1501である、請求項99に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記eIF-5a拮抗薬が、GC7又はプロテアソームインヒビターである、請求項99に記載の方法。

30

【請求項 1 0 3】

前記プロテアソームインヒビターが、ボルテゾミブである、請求項102に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記化学療法薬が、エトポシド、シクロホスファミド、トポテカン、PI3Kインヒビター、又はオーロラキナーゼインヒビターである、請求項99に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記免疫調節薬が、GD2抗体、GD2ワクチン、GM-CSF、IL-2、又はレチノイドである、請求項99に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

前記レチノイドが、イソトレチノインである、請求項105に記載の方法。

40

【請求項 1 0 7】

前記患者内で新たな神経芽細胞腫が形成されるのを防止する、請求項81に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

患者の神経芽細胞腫を予防的又は治癒的に処置する方法であって、
抗GD2療法と、

前記患者内のオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)を阻害する第1の薬剤と、
を含む有効量の薬物療法を前記患者に実施する工程を含む前記方法。

【請求項 1 0 9】

前記抗GD2療法が、GD2抗体又はGD2ワクチンである、請求項108に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

50

抗GD2療法を含むが、患者内のオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)を阻害する薬剤を含まない、有効量の薬物療法を患者に実施する方法と比較して、患者の異痛症のリスクを軽減する、請求項108に記載の方法。

【請求項 111】

患者内のオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)を阻害する第1の薬剤が、-ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)である、請求項108に記載の方法。

【請求項 112】

患者内のオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)を阻害する薬剤と組み合わせたときに、ポリアミン経路を調節して、患者内の全体的なポリアミン含有量を低下させる、第2の薬剤を投与する工程を更に含む、請求項111に記載の方法。

10

【請求項 113】

ポリアミン経路を調節して、患者内の全体的なポリアミン含有量を低下させる第2の薬剤が、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)である、請求項111に記載の方法。

【請求項 114】

前記NSAIDが、アスピリン、スリンダク、又はセレコキシブである、請求項113に記載の方法。

【請求項 115】

少なくとも一方のODC1対立遺伝子プロモーターについて、そのポジション+316における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、

前記結果が、少なくとも一方のODC1対立遺伝子プロモーターについて、そのポジション+316における患者の遺伝子型がGであることを示唆する場合には、有効量の薬物療法を前記患者に実施する工程と、

20

を更に含む、請求項108に記載の方法。

【請求項 116】

少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型を試験する工程を更に含む、請求項115に記載の方法。

【請求項 117】

前記結果が、前記遺伝子型を収録する報告入手すること、又は前記結果を明らかにする患者履歴を得ることにより取得される、請求項115に記載の方法。

30

【請求項 118】

前記試験が、患者のODC1プロモーターの一方の対立遺伝子について、そのポジション+316におけるヌクレオチド塩基を決定する、請求項115に記載の方法。

【請求項 119】

前記試験が、患者のODC1プロモーターの両方の対立遺伝子について、そのポジション+316におけるヌクレオチド塩基を決定する、請求項115に記載の方法。

【請求項 120】

前記結果が、ODC1プロモーターの両方の対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型がGGであることを示唆する、請求項119に記載の方法。

【請求項 121】

前記結果が、ODC1プロモーターの両方の対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型がGAであることを示唆する、請求項119に記載の方法。

40

【請求項 122】

少なくとも一方のODC1対立遺伝子プロモーターについて、そのポジション+263における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、

前記結果が、少なくとも一方のODC1対立遺伝子プロモーターについて、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTであることを示唆する場合には、有効量の薬物療法を前記患者に実施する工程と、

を更に含む、請求項108に記載の方法。

【請求項 123】

少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子

50

型を試験する工程を更に含む、請求項122に記載の方法。

【請求項124】

前記結果が、前記遺伝子型を収録する報告を入手すること、又は前記結果を明らかにする患者履歴を得ることにより取得される、請求項122に記載の方法。

【請求項125】

前記試験が、患者のODC1プロモーターの一方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する、請求項122に記載の方法。

【請求項126】

前記試験が、患者のODC1プロモーターの両方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する、請求項122に記載の方法。

10

【請求項127】

前記結果が、ODC1プロモーターの両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTTであることを示唆する、請求項126に記載の方法。

【請求項128】

前記結果が、ODC1プロモーターの両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTGであることを示唆する、請求項126に記載の方法。

【請求項129】

前記患者が、これまでに少なくとも1ラウンドの抗がん療法を受けたことがある、請求項108に記載の方法。

【請求項130】

前記患者が、がん寛解状態にある、請求項108に記載の方法。

20

【請求項131】

DFMOが全身的に投与される、請求項1、15、36、56、81及び111のいずれか一項に記載の方法。

【請求項132】

DFMOが、経口により、動脈内に、又は静脈内に投与される、請求項131に記載の方法。

【請求項133】

DFMOが、経口により投与される、請求項132に記載の方法。

【請求項134】

有効量のDFMOが、500～1500mg/m²/日である、請求項133に記載の方法。

30

【請求項135】

DFMOが、経口投与用として製剤化される、請求項132に記載の方法。

【請求項136】

DFMOが、小児投与用として製剤化される、請求項132に記載の方法。

【請求項137】

DFMOが、ハード若しくはソフトカプセル、又は錠剤として製剤化される、請求項135に記載の方法。

【請求項138】

DFMOが、12時間毎に投与される、請求項131に記載の方法。

【請求項139】

DFMOが、24時間毎に投与される、請求項131に記載の方法。

40

【請求項140】

DFMOが、少なくとも2回投与される、請求項131に記載の方法。

【請求項141】

DFMO及び第2の薬剤が、異なる経路により投与される、請求項2、26、46、71、98、及び112のいずれか一項に記載の方法。

【請求項142】

DFMOが、第2の薬剤の前、後、前後、又は同時に投与される、請求項2、26、46、71、98、及び112のいずれか一項に記載の方法。

【請求項143】

50

前記患者が固形腫瘍を有し、及び前記固形腫瘍の切除を更に含む、請求項131に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

DFMOが、前記切除の前及び/又は後に投与される、請求項143に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記患者が、ヒトである、請求項1から144のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

前記ヒトが、小児患者である、請求項145に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

DFMOが、エフロルニチン塩酸塩・一水和物である、請求項1から107、111から114、及び131から145のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 1 4 8】

前記エフロルニチン塩酸塩・一水和物が、その2つのエナンチオマーのラセミ混合物である、請求項147に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

NSAIDが、スリンダクの代謝物である、請求項3、27、47、72、99、及び113のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本願は、2015年2月12日付け出願の米国仮特許出願第62/115,413号、及び2015年4月30日付け出願の米国仮特許出願第62/154,804号に基づく優先権利益を主張するものであり、これらの全内容は参照により本明細書に組み込まれる。 20

【0 0 0 2】

本発明は、米国国立衛生研究所より授与された助成No.R01 CA123065及びP50 CA095060に基づく政府支援を受けてなされた。政府は、本発明において所定の権利を有する。

【0 0 0 3】

1. 本発明の分野

本発明は概して、がん生物学及び医療の分野に関する。より具体的には、カルチノーマ及びそのリスク因子を診断、予防及び治療する方法に関する。 30

【背景技術】

【0 0 0 4】

2. 関連技術の説明

神経芽細胞腫(NB)は、交感神経系の神経堤細胞から生ずる致命的な小児がんである。診断時の平均年齢は17ヶ月であり、50~60%の患者に転移性の疾患が認められる。NBは、多様なリスク群を伴う不均質な疾患である(Maris、2010年)。最大45%の患者が、MYCN増幅又はその他の有害な臨床病理学的特性を有する患者を含む高リスクカテゴリーに分類される。化学療法、手術、放射線、幹細胞レスキューによる高用量化学療法、抗体に基づく療法、及び生物学に基づく療法等の治療の進歩にもかかわらず、高リスク疾患患者の全体的な長期生存率は約50%と不良のままである。この高いリスク群に含まれる約20%の患者は、化学療法に適切に反応することができず、進行性又は難治性の疾患を発症する。アップフロント治療を完了した患者は、>35%の再発リスクを有する(Parkら、2013年;Yuら、2010年;Modakら、2010年)。 40

【0 0 0 5】

細胞表面に発現したGD2ガングリオシドを標的とする抗体を用いた免疫療法と、それに続く導入療法及び強化療法を行うと、それに関連して、高リスク神経芽細胞腫を有する小児において、無再発性の全生存が増加した(Yuら、2010年)。しかし、抗GD2免疫療法は、激しい内臓痛及び接觸に反応した疼痛(異痛症)と関連する(Cheungら、1987年;Wallaceら、1997年)。免疫療法に関連する疼痛の軽減は、高リスクの神経芽細胞腫を有する患者の治療において、未だ対処されていない主要な医療ニーズに該当する。したがって、患者、 50

特に再発性又は難治性NBの患者を対象とする新規療法が求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

- 【特許文献1】米国特許第4,413,141号
- 【特許文献2】米国特許第4,330,559号
- 【特許文献3】米国特許第6,258,845号
- 【特許文献4】米国特許第3,647,858号
- 【特許文献5】米国特許第3,654,349号
- 【特許文献6】米国特許第5,814,625号
- 【特許文献7】米国特許第5,843,929号
- 【特許文献8】米国特許第8,329,636号
- 【特許文献9】米国特許第9,121,852号
- 【特許文献10】米国特許公開第20130217743号
- 【特許文献11】PCT特許国際公開第2014070767号
- 【特許文献12】欧州特許出願第50,424号
- 【特許文献13】欧州特許出願第84,796号
- 【特許文献14】欧州特許出願第258,017号
- 【特許文献15】欧州特許出願第237,362号
- 【特許文献16】欧州特許出願第201,184号
- 【特許文献17】米国特許第4,683,202号
- 【特許文献18】米国特許第4,582,788号
- 【特許文献19】米国特許第4,683,194号
- 【特許文献20】米国特許第4,656,127号
- 【特許文献21】フランス特許第2,650,840号
- 【特許文献22】PCT出願国際公開第91/02087号
- 【特許文献23】PCT出願国際公開第92/15712号
- 【特許文献24】米国特許第5,952,174号
- 【特許文献25】米国特許公開第2011/0256161号
- 【特許文献26】米国特許公開第2012/0172449号
- 【特許文献27】PCT公開番号国際公開第1999/054283号
- 【特許文献28】米国特許第6,083,496号
- 【特許文献29】米国特許第5,456,908号
- 【特許文献30】米国特許第8815872号
- 【特許文献31】国際公開第2012/135641号
- 【特許文献32】米国特許公開第2014/0004132号
- 【特許文献33】米国特許第5,801,005号
- 【特許文献34】米国特許第5,739,169号
- 【特許文献35】米国特許第5,830,880号
- 【特許文献36】米国特許第5,846,945号
- 【特許文献37】米国特許出願公開第20130216528号
- 【特許文献38】米国特許出願公開第20140170155号
- 【特許文献39】PCT出願公開国際公開第2014144763号
- 【特許文献40】米国特許第6,451,995号
- 【特許文献41】米国特許第8,507,657号
- 【特許文献42】米国特許第8,278,065号
- 【特許文献43】米国特許第5,824,311号
- 【特許文献44】米国特許第5,760,395号
- 【特許文献45】米国特許第4,870,287号

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】**【0007】**

本発明によれば、それを必要としている患者の神経芽細胞腫を予防的又は治癒的に治療する方法であって、-ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)を含む有効量の薬物療法を患者に実施する工程を含む方法が提供される。いくつかの実施形態では、薬物療法は、第2の薬剤を更に含む。いくつかの実施形態では、第2の薬剤は、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、ポリアミントラנסポーターインヒビター、eIF-5a拮抗薬、化学療法薬、又は免疫調節薬である。いくつかの実施形態では、非アスピリン含有NSAIDは、スリンダク、セレコキシブ、又はアスピリンである。いくつかの実施形態では、NSAIDは、非アスピリン含有NSAIDである。いくつかの実施形態では、ポリアミントラنسポーターインヒビターは、AMTX1501である。いくつかの実施形態では、eIF-5a拮抗薬は、GC7又はプロテアソームインヒビターである。いくつかの実施形態では、プロテアソームインヒビターは、ボルテゾミブである。いくつかの実施形態では、化学療法薬は、エトポシド、シクロホスファミド、トポテカン、PI3Kインヒビター、又はオーロラキナーゼインヒビターである。いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、GD2抗体、GD2ワクチン、GM-CSF、IL-2、又はレチノイドである。いくつかの実施形態では、レチノイドは、イソトレチノインである。

10

【0008】

本発明に基づき、患者の神経芽細胞腫を予防的又は治癒的に治療する方法であって、(a)少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、(b)結果が、ODC1遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTであることを示唆する場合には、-ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)を含む有効量の薬物療法を患者に実施する工程とを含む方法が提供される。いくつかの実施形態では、方法は、患者内で新たな神経芽細胞腫が形成されるのを防止するのに利用可能である。

20

【0009】

いくつかの実施形態では、工程(a)で得られる結果は、前記遺伝子型を収録する報告を入手すること、又は結果を明らかにする患者履歴を得ることにより取得される。いくつかの実施形態では、工程(a)は、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型を試験する工程を含む。いくつかの実施形態では、試験は、患者のODC1遺伝子の一方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施形態では、試験は、患者のODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施形態では、結果は、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTTであることを示唆する。いくつかの実施形態では、結果は、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTGであることを示唆する。

30

【0010】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、結果が、ODC1遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型がGであることを示唆する場合には、有効量の薬物療法を患者に実施する工程とを更に含む。特定の実施形態では、方法は、患者における聴器毒性又はそのリスクを予防するのに利用可能である。

40

【0011】

いくつかの実施形態では、方法は、患者から得た腫瘍サンプル内のODC1遺伝子産物の発現レベルを決定する試験から結果を取得する工程と、結果が、腫瘍サンプル内のODC1遺伝子産物の発現レベルが対照サンプル(例えば、患者から得た非腫瘍サンプル、又は健康な患者から得たサンプル)と比較して上昇していることを示唆する場合には、有効量の薬物療法を患者に実施する工程とを更に含む。

【0012】

50

いくつかの実施形態では、方法は、患者が薬物療法によりすでに治療を受けていたが低投薬量であった場合には、試験の結果を取得する前に薬物療法の投薬量を増加させる工程を更に含む。いくつかの実施形態では、薬物療法は、第2の薬剤を更に含む。いくつかの実施形態では、第2の薬剤は、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、ポリアミントランスポーターインヒビター、eIF-5a拮抗薬、化学療法薬、又は免疫調節薬である。いくつかの実施形態では、非アスピリン含有NSAIDは、スリンダク、セレコキシブ、又はアスピリンである。いくつかの実施形態では、NSAIDは、非アスピリン含有NSAIDである。いくつかの実施形態では、ポリアミントランスポーターインヒビターは、AMTX1501である。いくつかの実施形態では、eIF-5a拮抗薬は、GC7又はプロテアソームインヒビターである。いくつかの実施形態では、プロテアソームインヒビターは、ボルテゾミブである。いくつかの実施形態では、化学療法薬は、エトポシド、シクロホスファミド、トポテカン、PI3Kインヒビター、又はオーロラキナーゼインヒビターである。いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、GD2抗体、GD2ワクチン、GM-CSF、IL-2、又はレチノイドである。いくつかの実施形態では、レチノイドは、イソトレチノインである。

10

【0013】

1つの態様では、神経芽細胞腫の予防的又は治癒的な治療に対する患者の適合性を評価する方法であって、(a)少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、(b)結果が、ODC1遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTであることを示唆する場合には、患者は有効量の-D-ジフルオロメチルオルニチン(DMFO)を含む薬物療法による治療に適するものと識別する工程とを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、方法は、患者内で新たな神経芽細胞腫が形成されるのを防止するのに利用可能である。

20

【0014】

いくつかの実施形態では、工程(a)で得られた結果は、前記遺伝子型を収録する報告入手すること、又は結果を明らかにする患者履歴を得ることにより取得される。いくつかの実施形態では、工程(a)は、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型を試験する工程を含む。いくつかの実施形態では、試験は、患者のODC1遺伝子の一方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施形態では、試験は、患者のODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施形態では、結果は、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTTであることを示唆する。いくつかの実施形態では、結果は、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTGであることを示唆する。

30

【0015】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、結果が、ODC1遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型がGであることを示唆する場合には、有効量の薬物療法を患者に実施する工程とを更に含む。特定の実施形態では、方法は、患者における聴器毒性又はそのリスクを予防するのに利用可能である。

40

【0016】

いくつかの実施形態では、方法は、患者から得た腫瘍サンプル内のODC1遺伝子産物の発現レベルを決定する試験から結果を取得する工程と、結果が、腫瘍サンプル内のODC1遺伝子産物の発現レベルが対照サンプル(例えば、患者から得た非腫瘍サンプル、又は健康な患者から得たサンプル)と比較して上昇していることを示唆する場合には、有効量の薬物療法を患者に実施する工程とを更に含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、方法は、患者が薬物療法によりすでに治療を受けていたが低

50

投薬量であった場合には、試験の結果を取得する前に、薬物療法の投薬量を増加させる工程を更に含む。いくつかの実施形態では、薬物療法は、第2の薬剤を更に含む。いくつかの実施形態では、第2の薬剤は、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、ポリアミントラヌスポーターインヒビター、eIF-5a拮抗薬、化学療法薬、又は免疫調節薬である。いくつかの実施形態では、非アスピリン含有NSAIDは、スリンダク、セレコキシブ、又はアスピリンである。いくつかの実施形態では、NSAIDは、非アスピリン含有NSAIDである。いくつかの実施形態では、ポリアミントラヌスポーターインヒビターは、AMTX1501である。いくつかの実施形態では、eIF-5a拮抗薬は、GC7又はプロテアソームインヒビターである。いくつかの実施形態では、プロテアソームインヒビターは、ボルテゾミブである。いくつかの実施形態では、化学療法薬は、エトポシド、シクロホスファミド、トポテカン、PI3Kインヒビター、又はオーロラキナーゼインヒビターである。いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、GD2抗体、GD2ワクチン、GM-CSF、IL-2、又はレチノイドである。いくつかの実施形態では、レチノイドは、イソトレチノインである。

10

20

30

40

50

【0018】

1つの態様では、神経芽細胞腫に対するリスクを有する患者において、神経芽細胞腫の発症又は再発を予防する方法であって、(a)少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、(b)結果が、ODC1遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTであることを示唆する場合には、有効量の-L-ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)を患者に投与する工程とを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、方法は、患者内で新たな神経芽細胞腫が形成されるのを防止するのに利用可能である。

【0019】

いくつかの実施形態では、患者は、がん幹細胞、関連するODC過活動を伴う前がん病変、又は細胞ポリアミンレベルが上昇した前がん病変を含む。いくつかの実施形態では、患者は、これまでに少なくとも1ラウンドの抗がん療法を受けたことがある。いくつかの実施形態では、患者はがん寛解状態にある。

【0020】

いくつかの実施形態では、工程(a)で得られた結果は、前記遺伝子型を収録する報告入手すること、又は結果を明らかにする患者履歴を得ることにより取得される。いくつかの実施形態では、工程(a)は、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型を試験する工程を含む。いくつかの実施形態では、試験は、患者のODC1遺伝子の一方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施形態では、試験は、患者のODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施形態では、結果は、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTTであることを示唆する。いくつかの実施形態では、結果は、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTGであることを示唆する。

【0021】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、結果が、ODC1遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型がGであることを示唆する場合には、有効量の療法を患者に実施する工程とを更に含む。特定の実施形態では、方法は、患者における聴器毒性又はそのリスクを予防するのに利用可能である。

【0022】

いくつかの実施形態では、方法は、患者から得た腫瘍サンプル内のODC1遺伝子産物の発現レベルを決定する試験から結果を取得する工程と、結果が、腫瘍サンプル内のODC1遺伝子産物の発現レベルが対照サンプル(例えば、患者から得た非腫瘍サンプル、又は健康な

患者から得たサンプル)と比較して上昇していることを示唆する場合には、有効量の薬物療法を患者に実施する工程とを更に含む。

【0023】

いくつかの実施形態では、方法は、患者が薬物療法によりすでに治療を受けていたが低投薬量であった場合には、試験の結果を取得する前に薬物療法の投薬量を増加させる工程を更に含む。いくつかの実施形態では、薬物療法は、第2の薬剤を更に含む。いくつかの実施形態では、第2の薬剤は、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、ポリアミントラヌースポーターインヒビター、eIF-5a拮抗薬、化学療法薬、又は免疫調節薬である。いくつかの実施形態では、非アスピリン含有NSAIDは、スリンダク、セレコキシブ、又はアスピリンである。いくつかの実施形態では、NSAIDは、非アスピリン含有NSAIDである。いくつかの実施形態では、ポリアミントラヌースポーターインヒビターは、AMTX1501である。いくつかの実施形態では、eIF-5a拮抗薬は、GC7又はプロテアソームインヒビターである。いくつかの実施形態では、プロテアソームインヒビターは、ボルテゾミブである。いくつかの実施形態では、化学療法薬は、エトボシド、シクロホスファミド、トポテカン、PI3Kインヒビター、又はオーロラキナーゼインヒビターである。いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、GD2抗体、GD2ワクチン、GM-CSF、IL-2、又はレチノイドである。いくつかの実施形態では、レチノイドは、イソトレチノインである。

10

【0024】

1つの態様では、カルチノーマに対するリスクを有する患者におけるカルチノーマの発症又は再発を予防する方法であって、(a)患者から得たサンプルにおいて、がん幹細胞の有無を判定する試験から結果を取得する工程と、(b)結果が、患者のサンプルががん幹細胞を含むことを示唆する場合には、有効量の-D-ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)を患者に投与する工程とを含む方法が提供される。いくつかの実施形態では、方法は、患者内で新たな神経芽細胞腫が形成されるのを防止するのに利用可能である。

20

【0025】

いくつかの実施形態では、がん幹細胞の有無は、がん幹細胞バイオマーカーの有無を検出する工程により決定される。いくつかの実施形態では、患者は転移性のがんを有する。いくつかの実施形態では、患者は、これまでに少なくとも1ラウンドの抗がん療法を受けたことがある。いくつかの実施形態では、患者はがん寛解状態にある。

30

【0026】

いくつかの実施形態では、カルチノーマは、結腸直腸がん、神経芽細胞腫、乳がん、肺がん、脳がん、肺がん、胃がん、血液のがん、皮膚がん、精巣がん、前立腺がん、卵巣がん、肝がん、又は食道がん、子宮頸がん、頭部及び頸部のがん、非メラノーマ皮膚がん、又は神経膠芽腫である。

【0027】

いくつかの実施形態では、患者は、ODC過活動と関連した前がん病変を含む。いくつかの実施形態では、患者は、前がん病変、及び上昇した細胞ポリアミンレベルを含む。

【0028】

いくつかの実施形態では、工程(a)で得られた結果は、前記遺伝子型を収録する報告を入手すること、又は結果を明らかにする患者履歴を得ることにより取得される。いくつかの実施形態では、工程(a)は、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型を試験する工程を含む。いくつかの実施形態では、試験は、患者のODC1遺伝子の一方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施形態では、試験は、患者のODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施形態では、結果は、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTTであることを示唆する。いくつかの実施形態では、結果は、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTGであることを示唆する。

40

【0029】

50

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、結果が、ODC1遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型がGであることを示唆する場合には、有効量の薬物療法を患者に実施する工程とを更に含む。特定の実施形態では、方法は、患者における聴器毒性又はそのリスクを予防するのに利用可能である。

【0030】

いくつかの実施形態では、方法は、患者から得た腫瘍サンプル内のODC1遺伝子産物の発現レベルを決定する試験から結果を取得する工程と、結果が、腫瘍サンプル内のODC1遺伝子産物の発現レベルが対照サンプル(例えば、患者から得た非腫瘍サンプル、又は健康な患者から得たサンプル)と比較して上昇していることを示唆する場合には、有効量の薬物療法を患者に実施する工程とを更に含む。

10

【0031】

いくつかの実施形態では、方法は、患者が薬物療法によりすでに治療を受けていたが低投薬量であった場合には、試験の結果を取得する前に薬物療法の投薬量を増加させる工程とを更に含む。いくつかの実施形態では、薬物療法は、第2の薬剤を更に含む。いくつかの実施形態では、第2の薬剤は、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、ポリアミントランスポーターインヒビター、eIF-5a拮抗薬、化学療法薬、又は免疫調節薬である。いくつかの実施形態では、非アスピリン含有NSAIDは、スリンダク、セレコキシブ、又はアスピリンである。いくつかの実施形態では、NSAIDは、非アスピリン含有NSAIDである。いくつかの実施形態では、ポリアミントランスポーターインヒビターは、AMTX1501である。いくつかの実施形態では、eIF-5a拮抗薬は、GC7又はプロテアソームインヒビターである。いくつかの実施形態では、プロテアソームインヒビターは、ボルテゾミブである。いくつかの実施形態では、化学療法薬は、エトポシド、シクロホスファミド、トポテカン、PI3Kインヒビター、又はオーロラキナーゼインヒビターである。いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、GD2抗体、GD2ワクチン、GM-CSF、IL-2、又はレチノイドである。いくつかの実施形態では、レチノイドは、イソトレチノインである。

20

【0032】

1つの態様では、DFMOで治療される患者の尿中ポリアミンレベルを評価する工程を含むDFMO療法の有効性を予測する方法であって、尿中ポリアミンレベルが高ければ、DFMO療法について有効性が改善していることが予測される方法が提供される。いくつかの実施形態では、患者は、がん、例えば結腸直腸がん、神経芽細胞腫、乳がん、膵がん、脳がん、肺がん、胃がん、血液のがん、皮膚がん、精巣がん、前立腺がん、卵巣がん、肝がん、又は食道がん、子宮頸がん、頭部及び頸部のがん、非メラノーマ皮膚がん、又は神経膠芽腫等を有する。いくつかの実施形態では、高尿中ポリアミンレベルとは、対照となる健常対象に見出されるレベルの少なくとも2倍高いレベルである。

30

【0033】

1つの態様では、患者の神経芽細胞腫を予防的又は治癒的に治療する方法であって、抗G D2療法と、患者内のオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)を阻害する第1の薬剤とを含む有効量の薬物療法を患者に実施する工程を含む方法が提供される。いくつかの実施形態では、抗GD2療法は、GD2抗体及び/又はGD2ワクチンを含む。いくつかの実施形態では、方法は、抗GD2療法を含むが、患者内のオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)を阻害する薬剤を含まない、有効量の薬物療法を患者に実施する方法と比較して患者の異痛症のリスクを軽減する。いくつかの実施形態では、第1の薬剤は、-ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)である。いくつかの実施形態では、DFMOは、抗GD2療法実施後の少なくとも約6時間、12時間、24時間、36時間、48時間、3日間、4日間、5日間、6日間、1週間、2週間、3週間、1ヶ月間、2ヶ月間、又は3ヶ月間、患者に投与される。いくつかの実施形態では、DFMOは、抗GD2療法実施前の少なくとも約6時間、12時間、24時間、36時間、48時間、3日間、4日間、5日間、6日間、1週間、2週間、3週間、1ヶ月間、2ヶ月間、又は3ヶ月間、患者に投与される。いくつかの実施形態では、方法は、患者内のオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)を

40

50

阻害する薬剤と組み合わせたときに、ポリアミン経路を調節して、患者内の全体的なポリアミン含有量を低下させる、第2の薬剤を投与する工程を更に含む。いくつかの実施形態では、ポリアミン経路を調節して、患者内の全体的なポリアミン含有量を低下させる第2の薬剤は、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、例えばアスピリン、スリンクダク又はセレコキシブ等である。いくつかの実施形態では、患者は、少なくとも1ラウンドの抗がん療法をこれまでに受けたことがある。いくつかの実施形態では、患者は、がん寛解状態にある。

【0034】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも一方のODC1対立遺伝子プロモーターについて、そのポジション+316における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、結果が、少なくとも一方のODC1対立遺伝子プロモーターについて、そのポジション+316における患者の遺伝子型がGであることを示唆する場合には、有効量の薬物療法を患者に実施する工程とを更に含む。いくつかの実施形態では、結果は、前記遺伝子型を収録する報告を入手すること、又は結果を明らかにする患者履歴を得ることにより取得される。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型を試験する工程を含む。いくつかの実施形態では、試験は、患者内のODC1遺伝子の一方の対立遺伝子について、そのポジション+316におけるヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施形態では、試験は、患者内のODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+316におけるヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施形態では、結果は、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型がGGであることを示唆する。いくつかの実施形態では、結果は、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+316における患者の遺伝子型がGAであることを示唆する。特定の実施形態では、方法は、患者における聴器毒性又はそのリスクを予防するのに利用可能である。

10

20

30

40

【0035】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも一方のODC1対立遺伝子プロモーターについて、そのポジション+263における患者の遺伝子型を決定する試験から結果を取得する工程と、結果が、少なくとも一方のODC1対立遺伝子プロモーターについて、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTであることを示唆する場合には、有効量の薬物療法を患者に実施する工程を更に含む。いくつかの実施形態では、結果は、前記遺伝子型を収録する報告を入手すること、又は結果を明らかにする患者履歴を得ることにより取得される。いくつかの実施形態では、結果は、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型を試験する工程により取得する。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも一方のODC1対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型を試験する工程を含む。いくつかの実施形態では、試験は、患者内のODC1遺伝子の一方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施形態では、試験は、患者内のODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263におけるヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施形態では、結果は、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTTであることを示唆する。いくつかの実施形態では、結果は、ODC1遺伝子の両方の対立遺伝子について、そのポジション+263における患者の遺伝子型がTGであることを示唆する。

【0036】

上記実施形態のいずれかの変形形態では、DFMOは、全身的に投与される。いくつかの実施形態では、DFMO及び第2の薬剤は、異なる経路で投与される。いくつかの実施形態では、DFMO又は第2の薬剤は、経口により、動脈内に、又は静脈内に投与される。いくつかの実施形態では、DFMOは、経口により投与される。いくつかの実施形態では、DFMOの有効量は500mg/日である。いくつかの実施形態では、DFMOは、静脈内に投与される。いくつかの実施形態では、DFMOの有効量は約0.05～約5.0g/m²/日である。いくつかの実施形態では、DFMO及び第2の薬剤は、経口投与用として製剤化される。いくつかの実施形態では、DFMO

50

は小児投与用、例えば経口用の液剤、経口用の粉末、コーティングされた錠剤、又はチュアブル錠剤等として製剤化される。いくつかの実施形態では、DFMO又は第2の薬剤は、ハード若しくはソフトカプセル、又は錠剤として製剤化される。いくつかの実施形態では、DFMOは、12時間毎に投与される。いくつかの実施形態では、DFMOは、24時間毎に投与される。いくつかの実施形態では、DFMOは第2の薬剤の前に投与される。いくつかの実施形態では、DFMOは、第2の薬剤を投与する前の少なくとも約6時間、12時間、24時間、36時間、48時間、3日間、4日間、5日間、6日間、1週間、2週間、3週間、1ヶ月間、2ヶ月間、又は3ヶ月間投与される。いくつかの実施形態では、DFMOは第2の薬剤の後に投与される。いくつかの実施形態では、DFMOは、第2の薬剤を投与した後の少なくとも約6時間、12時間、24時間、36時間、48時間、3日間、4日間、5日間、6日間、1週間、2週間、3週間、1ヶ月間、2ヶ月間、又は3ヶ月間投与される。いくつかの実施形態では、DFMOは、第2の薬剤の前後で投与される。いくつかの実施形態では、DFMOは、第2の薬剤と同時に投与される。いくつかの実施形態では、DFMOは少なくとも二回投与される。いくつかの実施形態では、第2の薬剤は、少なくとも二回投与される。

10

【0037】

上記実施形態の任意の変形形態では、患者は固形腫瘍を有し、前記方法は前記固形腫瘍の切除を更に含み得る。いくつかの実施形態では、DFMO及び第2の薬剤は、前記切除前に投与される。いくつかの実施形態では、DFMO及び第2の薬剤は、前記切除後に投与される。

20

【0038】

上記実施形態の任意の変形形態では、カルチノーマは、結腸直腸がん、神経芽細胞腫、乳がん、膵がん、脳がん、肺がん、胃がん、血液のがん、皮膚がん、精巣がん、前立腺がん、卵巣がん、肝がん、又は食道がん、子宮頸がん、頭部及び頸部のがん、非メラノーマ皮膚がん、又は神経膠芽腫である。

【0039】

上記実施形態の任意の変形形態では、患者はヒト患者である。いくつかの実施形態では、ヒト患者は小児患者である。

【0040】

上記実施形態の任意の変形形態では、DFMOは、エフロルニチン塩酸塩・一水和物であり、例えばその2つのエナンチオマーのラセミ混合物が挙げられる。

30

【0041】

上記実施形態の任意の変形形態では、NSAIDはスリンダクの代謝物である。

【0042】

本発明のその他の目的、特性及び長所は、下記の詳細な説明から明らかとなる。但し、この詳細な説明から、本発明の精神及び範囲内の様々な変更及び改変が当業者にとって明白となるので、詳細な説明及び具体的な実施例は、好ましい本発明の実施形態を示しつつも、もっぱら実例として提示されるものと理解すべきである。

【0043】

下記の図面は、本明細書の一部をなし、また本発明の特定の態様を更に示すために含まれる。本明細書に提示する特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせて、これらの図面の1つ又は複数を参照すれば、本発明をより深く理解することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】神経芽細胞腫におけるDFMOの有効性に関する遺伝的及び代謝的マーカーを示す図である。ODCの転写は、SNP rs2302615(Martinezら、2003年;Zellら、2009年)、及びrs2302616(Garcia-Huidobroら、2014a年)を含む特別な遺伝的変動により影響を受ける。DFMOの標的であるODCは、オルニチンを脱炭酸してジアミンのプロレシンを形成し、ジアミンのプロレシンは次に長鎖アミンに代謝される。スペルミジンは、N¹又はN⁸の位置でこのアミンをモノアセチル化する2つのアセチルトランスフェラーゼの基質である。スペルミンは、これらトランスフェラーゼ(SAT1)の一方の基質であり、このアミンをジアセチル化する

50

。ブトレシン、モノアセチルスペルミジン(N^1AcSpd/N^8AcSpd)、及びジアセチルスペルミン($N^1N^{12}Ac_2Spm/DAS$)は、いずれも溶質輸送体トランスポーター SLC3A2/Y +LATの基質であり、これらのアミンを排出する。

【図2】NMTRC 002(N=21、但し4例は除外された[無進行性])に参加した適格性を有する全患者に関する無増悪性の生存(PFS)を示す図である。平均PFS=420日。

【図3】NMTRC 002-DFMO単独及びエトポシド併用による難治性又は再発性の神経芽細胞腫に関する安全性試験のデザインを示す図である。^{*}評価には下記事項が含まれた:1. 応答評価:CT、MIBG、VMA、骨髄;2. 生物学的評価:骨髄から単離された腫瘍細胞を、MYCN状態について評価した。スポット尿サンプルをポリアミンレベルについて試験した。DFMO用量漸増: レベル1=500mg/m² BID、レベル2=750mg/m² BID、レベル3=1000mg/m² BID、レベル4=1500mg/m² BID。

【図4】サイクル1の治療期間中に750mg/m²の投与を受けた患者3例に関する、血漿DFMO濃度と時間測定の関係を示す図である。

【図5】NMTRC003階層1 CONSORTフロー図である。

【図6 A】ITT母集団に関するEFS及びOSを示す図である。すべての患者に関するEFS及びOSを示す。

【図6 B】ITT母集団に関するEFS及びOSを示す図である。これまでにANBL0032に参加したことのある患者に関するEFS(上部実線)を、ANBL0032トライアル結果(下部実線)と比較して示す。

【図6 C】ITT母集団に関するEFS及びOSを示す図である。これまでにANBL0032に参加したことのある患者に関するOSを、ANBL0032トライアル結果と比較して示す。

【発明を実施するための形態】

【0045】

高リスク神経芽細胞腫(NB)は、小児腫瘍学における課題として存続し、小児がんによる全死亡の15%を占める。ほとんどの患者は寛解に達することができるが、約50%が再発する。再発すると、現在のところ、これら的小児に対する治癒的治療法はなく、またこれらの小児につき、5年生存率は<10%である。したがって、新規な治療アプローチが、これらの小児を治療するのに必要とされる。第2の寛解を実現することができた再発患者は、疾患のエビデンスを有さないが、なおも6ヶ月～1年以内に再発する可能性があるので、再発治療トライアルへの適格性を有さない。再発の予防は、そのような患者における転帰を改善するための1つのアプローチである。本明細書に提示する治療法では、いくつかの実施形態において、寛解状態にある小児にとって十分に忍容性のある標的薬物治療を用いながら、この概念を取り組んでいる。

【0046】

本明細書では、任意の小児母集団を対象とした、DFMOの経口投与形態に関する第1の臨床試験について報告する。500～1500mg/m²の用量のDFMOを1日2回、経口投与すると、小児患者において良好な忍容性を示すことが判明した。このトライアルの結果は、経口DFMO用量が、250～500mg/m² 1日1回であり、治療期間が3～4年にわたる、成人を対象としたがんの化学予防試験において認められたこの薬剤の安全性を裏づける(Meyskensら、2008年; Bailleuら、2010年)。このトライアルで使用された用量は、成人投与と同様に、尿中ポリアミンの減少及び認められた応答により明らかとなる生物活性を実現するように選択された。

【0047】

ODC遺伝子のrs2302616においてマイナーティップ对立遺伝子を有し、再発性又は難治性のNBを有する小児は、尿中ポリアミンマーカーのレベルがより高いこと、またこの遺伝子座にメジャーG对立遺伝子を有する小児と比較して、DFMOを含有する療法に対してより良好に反応することが見出された。いくつかの実施形態では、この患者サブセットは、ポリアミンに対して依存性を示し、またこの経路を標的とする療法から利益を得るのに十分適する。

【0048】

更に、細胞表面に発現したGD2ガングリオシドを標的とする抗体を用いた免疫療法と、

10

20

30

40

50

それに続く導入療法及び強化療法を行うと、それに関連して、高リスク神経芽細胞腫を有する小児において、無再発性の全生存が向上した(Yuら、2010年)。しかし、抗GD2免疫療法は、激しい内臓痛及び接触に応答する疼痛(異痛症)と関連する(Cheungら、1987年;Wallaceら、1997年)。Silvaら(2011年)は、ラットの足にフロイントアジュバント注射することにより誘発された異痛症及び浮腫は、ODC1の発現及び活性を誘発すること、ブトレシン又はその他のポリアミンを注射すると、その他の刺激が存在しなくても異痛症及び浮腫が誘発されたこと、並びに炎症誘発性疼痛の動物モデルにおいて、アジュバントにより誘発された異痛症及び浮腫が、DFMO(足1本当たり $10\mu\text{mol}$ の用量)により抑制されたことについて報告した。したがって、実施例6に示す通り、患者の神経芽細胞腫を予防的又は治癒的に治療する方法は、抗GD2療法及びDFMOを含む有効量の薬物療法を患者に実施する工程を含み得る。

10

【0049】

I. がん及びDFMOにおけるポリアミン

抗腫瘍活性を有する、ポリアミンの生合成に関係する酵素の新規インヒビターの同定により、ポリアミンホメオスタシス、及びがん化学療法戦略の設計に対する関心が近年復活した(Mamontら、1978年;Porterら、1992年;Seilerら、1998年)。ポリアミン合成を選択的薬理学的に妨害すると、in vitro及びin vivoの両条件下で腫瘍細胞増殖阻害を引き起こす(Mamontら、1978年;McCann及びPegg、1992年)。更に、特定の腫瘍細胞におけるODC活性の劇的な増加は、G1-S変化と関連した(Fullerら、1977年;Kahana及びNathans、1984年;Kaczmarekら、1987年)。理論に縛られものではないが、これに対する分子的基礎は、ODCはc-Myc及びMYCNにより制御され得る遺伝子に属し、(Bello-Fernandezら、1993年;Penaら、1993年;Wagnerら、1993年;Lutzら、1996年;Luら、2003年)、c-Myc及びMYCNのいずれも細胞周期への出入りを制御するという事実に由来する。細胞増殖は、ポリアミンに依存するので、ポリアミン生合成を妨害することは、様々な悪性腫瘍を含む増殖性疾患に対するおそらくは有望な治療アプローチと考えられる(Heby及びPersson、1990年;Auvinenら、1992年;McCann及びPegg、1992年)。-ジフルオロメチルオルニチン(DFMO又はエフロルニチン又は2-(ジフルオロメチル)-dL-オルニチン)は、ODCの酵素活性化型の不可逆的インヒビターであり(Metcalfら、1978年;Poulinら、1992年)、実験的な腫瘍においてポリアミン枯渇の治療有効性を試験するためのプロトタイプツールである(McCann及びPegg、1992年;Meyskens及びGerner、1999年)。DFMOは、多くのがん細胞の細胞増殖を阻害すること、及び細胞分化を誘発することが公知である(Chapman、1980年;Melinoら、1988年)。これらのプロセスは、ブトレシン(Put)及びスペルミジン(Spd)プールの明らかな枯渇を伴う(Pegg、1988年;Heby及びPersson、1990年;McCann及びPegg、1992年)。またDFMOは、ヒト胃がんモデルにおいてアポトーシスを誘発すること、及び転移を阻害することも明らかである(Takahashiら、2000年)。

20

【0050】

DFMOは、マウスにおいてAPC-依存性の腸内腫瘍発生を抑制する(Erdmanら、1999年)。ヒトにDFMOを毎日経口投与すると、ODC酵素活性が阻害され、またいくつかの上皮組織内のポリアミン含有量を低下させる(Loveら、1993年;Gernerら、1994年;Meyskensら、1994年;Meyskensら、1998年;Simoneauら、2001年;Simoneauら、2008年)。DFMOは、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)のスリンダクと併用すると、ランダム化臨床トライアルのプラセボと比較して、大腸腺腫を有する個人における腺腫再発率が顕著に低下している(Meyskensら、2008年)。

30

【0051】

DFMO及び良性前立腺肥大の治療におけるその使用が、2つの特許、米国特許第4,413,141号、及び同第4,330,559号に記載されている。米国特許第4,413,141号は、DFMOがin vitro及びin vivoの両方においてODCの強力なインヒビターとなることを記載する。DFMOを投与すると、細胞内のブトレシン濃度及びスペルミジン濃度の低下を引き起こすが、これらのポリアミンは、細胞内で通常活発に産生される。更に、DFMOは、標準腫瘍モデルにおいて試験したとき、新生細胞増殖を遅延させる能力を有することが明らかにされている。米国

40

50

特許第4,330,559号は、良性前立腺肥大の治療を目的とするDFMO及びDFMO誘導体の使用について記載する。良性前立腺肥大は、急速な細胞増殖により特徴付けられる多くの疾患状態と同様に、ポリアミン濃度の異常な上昇を伴う。

【0052】

DFMOについて認められた副作用として、 $4\text{g}/\text{m}^2/\text{日}$ の高用量における、但し中止すると消散する聴覚に対する効果が挙げられる。このような聴覚に対する効果は、 $0.4\text{g}/\text{m}^2/\text{日}$ の低用量では最長1年間投与しても認められない(Meyskensら、1994年)。更に、薬物を中止すると消散する、浮動性めまい(dizziness)/めまい(vertigo)のいくつかの症例が認められる。血小板減少症が、主としてDFMOの高「治療」用量($>1.0\text{g}/\text{m}^2/\text{日}$)を用いた試験で、及び主に化学療法をこれまでに受けたことがあるがん患者又は骨髄に障害を有する患者において報告されている。DFMO療法と関連した毒性は、限定された臨床トライアルにおいて、一般的にその他の種類の化学療法ほど重度ではないが、用量関連の血小板減少症を促進することが判明している。更に、ラットにおける試験は、DFMOを12日間連続的に投与すると、対照と比較して血小板数が有意に低下することが明らかにされている。その他の調査でも類似した観察所見が得られ、その場合、血小板減少症が連続的なi.v. DFMO療法の主要な毒性である。これらの所見は、DFMOは、巨核細胞の骨髄前駆体のODC活性を有意に阻害し得ることを示唆する。DFMOは、増殖性の修復プロセス、例えば上皮創傷治癒等を阻害し得る。

10

【0053】

高用量DFMO($4\text{g}/\text{m}^2/\text{日}$)を投与された患者の8.4%で、オージオメトリー試験による聴覚消失/変化が報告されているが、これは中止すると消散する。発疹及び脱毛症が3%の患者で報告されている。無食欲及び腹痛がDFMOで治療された患者の2%で報告されている。浮動性めまい(1%)、頭痛(2%)及び発作(8%)を含む、稀であるが重篤な副作用が、静脈内DFMOを投与された患者で報告されている。骨髄抑制(白血球減少症[37%]、貧血[55%]、及び血小板減少症[14%]を含む)が、静脈内高用量で報告されているが、低用量(500mg)では通常生じない。

20

【0054】

【表1】

Table 1.DFMO 毒性の潜在リスク

起こり得る 患者100例当たり10~30例で 生ずる	起こりにくい 患者100例当たり3~10例で生 ずる	稀 患者100例当たり3例未満しか 生じない
<ul style="list-style-type: none"> ・赤血球及び白血球の減少 <ul style="list-style-type: none"> a) 赤血球数が少ないと、 疲労及び衰弱を感じる可 能性があり、輸血を必要 とする場合もある。 b) 白血球数が少ないと、 感染症に罹りやすくなる 。 ・骨髄内で産生される血小板 数の減少 	<ul style="list-style-type: none"> ・吐き気 ・聴覚消失 ・耳鳴り ・下痢 ・頭痛 ・衰弱 	<ul style="list-style-type: none"> ・食欲不振 ・腹痛 ・膨脹(ガス) ・浮動性めまい ・皮膚発疹 ・発作 ・口内の炎症 ・鼻水 ・睡眠困難 ・感染症 ・口渴 ・便秘 ・乾燥皮膚 ・月経障害 ・咽頭痛 ・嘔吐 ・血管拡張(低血圧を引き起 こす可能性のある血管の弛緩) ・感情の起伏 ・搔痒 ・全身の痛み ・疼痛

10

20

30

【0055】

フェーズIII臨床トライアルでは、DFMOとスリンダク又は対応するプラセボを併用して3ヶ月間治療した後、腺腫性ポリープの再発を評価した。一時的な聴覚消失は、DFMOによる治療について公知の毒性であり、したがってシリアル空気伝導オーディオグラムを分析するために、総合的アプローチが策定された。いくつかの周波数における繰り返し測定に起因する対象内相関関係を考慮しながら、一般化推定方程式法により、空気伝導純音閾値の変化について治療群間の平均値の差異を見積もった。対象290例に基づき、プラセボで治療され対象と比較して、スリンダク併用DFMOで治療された対象間で、ベースライン値、年齢、及び頻度について調整後、平均0.50dBの差異が認められた(95%信頼区間、-0.64~1.63dB; P=0.39)。500~3,000Hzの正常なスピーチ範囲内で、0.99dBの推定差異(-0.17~2.14dB; P=0.09)を検出した。用量強度はモデルに対して情報を追加しなかった。スリンダク併用DFMO群の151例中14例(9.3%)、及びプラセボ群の139例中4例(2.9%)で、試験した全範囲にわたり、2つ又はそれ超の連続した周波数において、ベースラインから少なくとも15dBの聴覚低下を経験した(P=0.02)。治療終了後少なくとも6ヶ月経過してフォローアップ空気伝導を実施し、治療群間で聴覚閾値に1.08dBの調整後平均差異(-0.81~2.96 dB; P=0.26)が明らかとなった。プラセボ群と比較して、臨床的に重要な聴覚消失を経験したスリンダク併用DFMO群の対象の割合に有意差は認められなかった。薬物への曝露に起因する聴器毒性の推定される帰属可能なリスクは、8.4%であった(95%信頼区間、-2.0%~18.8%; P=0.12)。プラセボで治療された患者と比較して、スリンダク併用DFMOで治療された患者につい

40

50

て、平均閾値に<2dBの差異が認められた。この試験結果は、McLarenら(2008年)により詳細に議論されており、これは参考により全体が本明細書に組み込まれる。

【0056】

II. エフロルニチン

用語「エフロルニチン」、「ジフルオロメチルオルニチン」、及び「DFMO」は同義である。これらの用語のいずれかが、それ自体及び文脈とは無関係に使用されるとき、任意の形態の2,5-ジアミノ-2-(ジフルオロメチル)ペンタン酸を意味し、その形態としては、非塩及び塩の形態(例えば、エフロルニチン・HCl)、非塩及び塩の形態の無水及び水和形態(例えば、エフロルニチン塩酸塩・一水和物)、非塩及び塩の形態の溶媒和化合物、そのエナンチオマー(R及びS体、d及びl体として識別される場合もある)、及びこれらエナンチオマーの混合物(例えば、ラセミ混合物)が挙げられる。エフロルニチンの特別な形態として、エフロルニチン塩酸塩・一水和物(すなわち、CAS ID:96020-91-6;MW:236.65)、エフロルニチン塩酸塩(すなわち、CAS ID:68278-23-9;MW:218.63)、及び遊離したエフロルニチン(すなわち、CAS ID:70052-12-9;MW:182.17)が挙げられる。必要な場合には、エフロルニチンの特別な形態が更に規定されている。いくつかの実施形態では、本開示のエフロルニチンは、エフロルニチン塩酸塩・一水和物(すなわち、CAS ID:96020-91-6)である。用語「エフロルニチン」及び「DFMO」は、本明細書では交換可能に用いられる。DFMOは、ジフルオロメチルオルニチンの略号である。エフロルニチン及びDFMOのその他の類義語として、-ジフルオロメチルオルニチン、2-(ジフルオロメチル)-DL-オルニチン、2-(ジフルオロメチル)-dl-オルニチン、2-(ジフルオロメチル)オルニチン、DL--ジフルオロメチルオルニチン、N-ジフルオロメチルオルニチン、-ジアミノ--(ジフルオロメチル)吉草酸、及び2,5-ジアミノ-2-(ジフルオロメチル)ペンタン酸が挙げられる。

10

20

20

【0057】

エフロルニチンは、ポリアミン生合成経路の律速酵素であるオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)の酵素活性化型の不可逆的インヒビターである。このポリアミン合成を阻害すると、その結果として、化合物は、多くの臓器系におけるがん形成を阻止すること、がん増殖を阻害すること、及び腫瘍サイズを低減することに有効となる。またエフロルニチンは、その他の抗腫瘍薬との相乗作用も有する。

【0058】

エフロルニチンは、マウスにおけるAPC依存性の腸内腫瘍発生を抑制することが明らかにされている(Erdmanら、1999年)。ヒトにエフロルニチンを毎日経口投与すると、ODC酵素活性が阻害され、またいくつかの上皮組織内のポリアミン含有量を低下させる(Loveら、1993年;Gernerら、1994年;Meyskensら、1994年;Meyskensら、1998年;Simoneauら、2001年;Simoneauら、2008年)。エフロルニチンは、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)のスリンダクと併用すると、ランダム化臨床トライアルのプラセボと比較して、大腸腺腫を有する個人における腺腫再発率が顕著に低下することが報告されている(Meyskensら、2008年)。

30

【0059】

エフロルニチンは、StrasbourgのCentre de Recherche Merrellにより最初に合成された。最新の米国食品医薬品局(FDA)の承認には、

- a)アフリカ睡眠症。高用量全身性IV剤形-非市販(サノフィ/WHO)
- b)多毛症(アンドロゲン誘発性の過剰発毛)局所用剤形

40

が含まれる。エフロルニチンの経口製剤は、まだFDAより承認されていないが、局所用及び注射用の形態は承認済みである。Vaniqa(登録商標)はクリームであり、15% w/wのエフロルニチン塩酸塩・一水和物を含有し、局所投与用のクリーム中の11.5% w/wの無水エフロルニチン(EU)、13.9% w/wの無水エフロルニチン塩酸塩(米国)にそれぞれ対応する。Omidyl(登録商標)は、注射又は輸液に適するエフロルニチン・HCl溶液である。エフロルニチンは、1ml当たり200mgのエフロルニチン塩酸塩・一水和物の強度(20g/100mL)で供給される。

【0060】

エフロルニチン及び良性前立腺肥大の治療におけるその使用が、米国特許第4,413,141

50

号、及び同第4,330,559号に記載されている。'141号の特許には、エフロルニチンが、*in vitro*及び*in vivo*の両方においてODCの強力なインヒビターとなることが記載されている。エフロルニチンを投与すると、細胞内のプロテシン濃度及びスペルミジン濃度の低下を引き起こすが、これらのポリアミンは、細胞内で通常は活発に産生されることが報告されている。更に、エフロルニチンは、標準腫瘍モデルにおいて試験したとき、新生細胞増殖を遅延させる能力を有することが明らかにされている。'559号特許には、良性前立腺肥大の治療を目的とするエフロルニチン及びエフロルニチン誘導体の使用について記載されている。良性前立腺肥大は、急速な細胞増殖により特徴付けられる多くの疾患状態と同様に、異常なポリアミン濃度の上昇を伴う。

【0061】

10

エフロルニチンは、有意な抗腫瘍効果を伴いつつ、おそらくは連続的に投与可能である。この薬物は、 $0.4\text{g}/\text{m}^2/\text{日}$ の低用量では、腫瘍内プロテシン合成に対する阻害効果を発揮しつつ、ヒトに対して比較的無毒性である。ラット腫瘍モデルでの試験は、エフロルニチン輸液は、末梢の血小板数を低下させることなく、腫瘍プロテシンレベルを90%低下させ得ることを実証する。

【0062】

20

エフロルニチンについて認められた副作用として、 $4\text{g}/\text{M}^2/\text{日}$ の高用量における聴覚に対する効果が挙げられるが、これは中止すると消散する。このような聴覚に対する効果は、 $0.4\text{g}/\text{M}^2/\text{日}$ の低用量では最長1年間投与しても認められない(Meyskensら、1994年)。更に、薬物を中止すると消散する、浮動性めまい/めまいのいくつかの症例が認められる。血小板減少症が、主としてエフロルニチンの高「治療」用量($>1.0\text{g}/\text{m}^2/\text{日}$)を用いた試験で、及び主に化学療法をこれまでに受けたことがあるがん患者又は骨髄に障害を有する患者において報告されている。エフロルニチン療法と関連した毒性は、限定された臨床トライアルにおいて、一般的にその他の種類の化学療法ほど重度ではないが、用量関連の血小板減少症を促進することが判明している。更に、ラットにおける試験は、エフロルニチンを12日間連続的に投与すると、対照と比較して血小板数が有意に低下することが明らかにされている。その他の調査でも類似した観察所見が得られ、その場合、血小板減少症が連続的な*i.v.* エフロルニチン療法の主要な毒性である。これらの所見は、エフロルニチンは、巨核細胞の骨髄前駆体のODC活性を有意に阻害し得ることを示唆する。エフロルニチンは、増殖性の修復プロセス、例えば上皮創傷治癒等を阻害し得る。

30

【0063】

フェーズIII臨床トライアルでは、DFMOとスリンダク又は対応するプラセボを併用して3ヶ月間治療した後、腺腫性ポリープの再発を評価した。一時的な聴覚消失は、DFMOによる治療について公知の毒性であり、したがってシリアル空気伝導オーディオグラムを分析するために、総合的アプローチが策定された。いくつかの周波数における繰り返し測定に起因する対象内相関関係を考慮しながら、一般化推定方程式法により、空気伝導純音閾値の変化について治療群間の平均値の差異を見積もった。対象290例に基づき、プラセボで治療され対象と比較して、スリンダク併用DFMOで治療された対象間で、ベースライン値、年齢、及び頻度について調整後、平均 0.50dB の差異が認められた(95%信頼区間、 $-0.64 \sim 1.63\text{dB}$; $P=0.39$)。プラセボで治療された患者と比較して、スリンダク併用DFMO治療された患者について、平均閾値に $<2\text{dB}$ の差異が認められる。この試験結果は、McLarenら、2008年でより詳細に議論されており、これは参照により全体が本明細書に組み込まれる。エフロルニチン及びスリンダクの用量固定式の組み合わせについて、製造方法及び組成物が本明細書に提示される。

40

【0064】

III. NSAID

NSAIDはステロイドではない抗炎症剤である。抗炎症作用に付加して、NSAIDは、鎮痛作用、解熱作用、及び血小板阻害作用を有する。NSAIDは、慢性的な関節炎の状態、並びに疼痛及び炎症と関連した特定の軟組織異常の治療で主に使用される。NSAIDは、アラキドン酸をプロスタグランジンの前駆体である環状エンドペルオキシドに変換するシクロオキ

50

シゲナーゼを阻害し、プロスタグランジンの合成をブロックすることにより作用する。プロスタグランジン合成の阻害が、その鎮痛作用、解熱作用、及び血小板阻害作用を説明する；その他の機構はその抗炎症効果に寄与すると考えられる。また、特定のNSAIDは、リポオキシゲナーゼ酵素若しくはホスホリパーゼCも阻害し得る、又はT細胞機能を調節し得る。(AMA Drug Evaluations Annual、1814～5、1994年)。

【0065】

アスピリン、イブプロフェン、ピロキシカム(Reddyら、1990年；Singhら、1994年)、インドメタシン(Narisawa、1981年)、及びスリンダク(Piazzaら、1997年；Raoら、1995年)を含む非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)は、AOMで治療されたラットモデルにおいて、結腸癌発生を有効に阻害する。また、NSAIDは、活性化したKi-rasを内包する腫瘍の発達も阻害する(Singh及びReddy、1995年)。NSAIDは、腫瘍細胞におけるアポトーシスの誘発により、癌発生を阻害すると考えられる(Bediら、1995年；Lupulescu、1996年；Piazzaら、1995年；Piazzaら、1997b年)。いくつかの試験は、アポトーシスの誘発を含むNSAIDの化学予防特性は、プロスタグランジン合成を阻害するその能力の一機能であることを示唆している(DuBoisら、1996年；Lupulescu、1996年；Vane及びBotting、1997年でレビューされている)。但し、試験は、NSAIDはプロスタグランジン依存性及び独立性の機構の両方を通じて作用し得ることを示唆している(Albertsら、1995年；Piazzaら、1997a年；Thompsonら、1995年；Hanif、1996年)。NSAIDのスリンダクの代謝物であるスルホン化スリンダクは、COX阻害活性を欠いているが、腫瘍細胞におけるアポトーシスをなおも誘発し(Piazzaら、1995年；Piazzaら、1997b年)、また癌発生のいくつかの齧歯類モデルにおいて、腫瘍の発達を阻害する(Thompsonら、1995年；Piazzaら、1995年、1997a年)。

10

20

20

【0066】

いくつかのNSAIDが、ヒト臨床トライアルで、その効果について調べられている。イブプロフェンのフェーズIIaトライアル(1ヶ月)が完了したが、300mg/日の用量でさえも、プロスタグランジンE₂(PGE₂)レベルの有意な低下が扁平粘膜において認められた。用量300mgのイブプロフェンは、非常に低く(治療用量は1200～3000 mg/日の範囲又はそれ超)、長期にわたっても毒性はほとんど認められない。但し、動物化学予防モデルでは、イブプロフェンはその他のNSAIDよりも有効性は低い。

【0067】

いくつかの実施形態では、本明細書に提示する方法は、例えば本明細書で議論される任意のNSAIDを含む、薬学的に許容される量のNSAIDを投与する工程を含む。

30

【0068】

A. アスピリン

アスピリンは、アセチルサリチル酸としても知られているサリチレート薬であり、軽微な痛み及び疼痛を緩和する鎮痛薬として、発熱を軽減する解熱剤として、及び抗炎症治療薬として多くの場合用いられる。アスピリンは、ドイツの会社バイエル社と共に化学者Felix Hoffmannにより、1897年に初めて単離された。サリチル酸はアスピリンの主要代謝物であり、ヒト及び動物代謝の不可欠な部分である。ヒトでは、その大部分は食事に起因するが、相当の部分は内因的に合成される。今日、アスピリンは、世界で最も幅広く用いられている薬物の一つであり、推定40,000トンのアスピリンが毎年消費されている。いくつかの国々では、アスピリンがバイエル社所有の登録商標であるが、一般的な用語は、アセチルサリチル酸(ASA)である。

40

【0069】

トロンボキサンは、正常な状況下では血小板分子に結合し、それと協働して血管の損傷壁全体にわたりパッチを形成するが、アスピリンは、トロンボキサンの生成阻害による抗血小板効果も有する。血小板パッチは大きくなり過ぎ、また血流を局所的に及び下流において遮断するおそれもあるので、血餅を発現するリスクが高い人々における心臓発作、脳卒中、及び血餅形成についても、その防止に役立つように、アスピリンが低用量で長期的に用いられる。低用量のアスピリンは、別的心臓発作又は心臓組織の壊死のリスクを低減するために、心臓発作直後に投与可能であることも立証されている。アスピリンは、特定

50

の種類のがん、特に結腸直腸がんの予防に有効であり得る。

【0070】

経口により摂取したアスピリンの望ましくない主要な副作用として、特により高用量において胃腸潰瘍、胃出血、及び耳鳴が挙げられる。小児及び未成年者では、アスピリンは、ライ症候群のリスクがあるので、もはやインフルエンザに似た症状又は水痘の症状又はその他のウイルス疾患を制御するのに適応されない。

【0071】

アスピリンは、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)と呼ばれる薬物群の一部分をなすが、作用機序においてその他のほとんどのNSAIDと異なる。アスピリンや、サリチレートと呼ばれるその群内のその他の薬剤は、その他のNSAIDと類似した効果(解熱、抗炎症、鎮痛)を有し、また同一の酵素シクロオキシゲナーゼを阻害するが、アスピリン(その他のサリチレートではなく)は、不可逆的に阻害し、またその他の薬剤とは異なり、酵素のCOX-2変異体よりもCOX-1変異体により多くの影響を及ぼす。

【0072】

B. スリンダク及びその主要な代謝物、スルホン化スリンダク及びスリンダク硫化物

スリンダクは、非ステロイド系の、抗炎症性インデン誘導体であり、下記の化学名称を有する;(Z)-5-フルオロ-2-メチル-1-((4-(メチルスルフィニル)フェニル)メチレン)-1H-インデン-3-酢酸(Physician's Desk References、1999年)。理論に縛られるものではないが、スルフィニル部分は、可逆的還元により硫化物代謝物に、また不可逆酸化によりスルホン代謝物(エクシスリンド)にin vivoで変換する。参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,258,845号を参照。Ki-rasの活性化も阻害するスリンダクは、COXを阻害する能力が異なる2つの異なる分子に代謝されるが、いずれの分子もアポトーシスの誘発による化学予防効果を発揮する。スルホン化スリンダクは、COX-阻害活性を欠くが、またプロスタグランジン合成と独立して、アポトーシスの誘発を促進する可能性が非常に高い。入手可能なエビデンスは、硫化物誘導体が、生物学的に活性な化合物のうちの少なくとも1つに該当することを示唆する。これに基づき、スリンダクはプロドラッグとみなされ得る。

【0073】

スリンダク(クリノリル(Clinoril)(登録商標))は、例えば150mg及び200mg錠剤として入手可能である。成人用の最も一般的な投薬量は、150～200mg、1日2回であり、最大日用量は400mgである。経口投与後、薬物の約90%が吸収される。絶食中の患者では約2時間、また食物と共に投与したときには3～4時間でピーク血漿レベルに達した。スリンダクの平均半減期は7.8時間である:硫化物代謝物の平均半減期は16.4時間である。米国特許第3,647,858号、及び同第3,654,349号には、スリンダクの調製物について記載されており、両号は全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0074】

スリンダクは、骨関節炎、リウマチ性関節炎、強直性脊椎炎、急性痛風、及び急性肩痛の兆候及び症状の即時及び長期緩和に適応される。スリンダク(1日当たり400mg)が示す鎮痛及び抗炎症効果は、アスピリン(1日当たり4g)、イブプロフェン(1日当たり1200mg)、インドメタシン(1日当たり125mg)、及びフェニルブタゾン(1日当たり400～600mg)により達成される効果に匹敵する。スリンダクの副作用として、約20%の患者で認められた軽度胃腸効果が挙げられ、腹痛及び恶心のクレーム頻度が最も高かった。CNSの副作用が最高10%の患者で認められ、眠気、頭痛、及び神経過敏が最も頻繁に報告された副作用であった。皮膚発疹及び搔痒が5%の患者で生ずる。スリンダクによる長期治療は、重篤な胃腸毒性、例えば出血、潰瘍形成、及び穿孔等を引き起こすおそれがある。

【0075】

がん、及び特に結腸直腸ポリープの化学予防を目的としてスリンダクを使用する可能性について、十分に試験されてきた。最近の2つの特許、米国特許第5,814,625号及び同第5,843,929号には、ヒトを対象としてスリンダクを化学予防的に使用する可能性について詳記されている。両特許は本明細書にその全体が組み込まれる。米国特許第5,814,625号で

10

20

30

40

50

主張されたスリンダクの用量は、1日当たり10mg～1500mgの範囲であり、1日当たり50mg～500mgの用量が好ましい。但し、より高用量では、化学予防において単一の薬剤としてスリンダクで使用した際の最大の問題として、その良く知られた毒性及び不耐性の中程度に高いリスクが挙げられる。副作用の発生率は60歳を超えた高齢者でより高いので、高齢者は特に影響を受けやすいと思われる。この年齢群は、結腸直腸がんを発症する可能性が極めて高く、したがって化学予防から利益を得る可能性が極めて高いことに留意されたい。スリンダクは、家族性腺腫性ポリポージス(FAP)患者において、腺腫の後退を実現することが明らかにされているが(Muscatら、1994年)、単発的な腺腫を対象とした少なくとも1つの試験では、そのような効果は認められなかった(Ladenheimら、1995年)。スリンダク及びそのスルホン代謝物であるエクシスリンドについて試験されており、またいくつかのがん型の予防及び治療を目的として、継続して臨床的に試験されている。

10

【0076】

DFMOとスリンダクとの併用療法は、マウス内の腺腫を抑えるのに有効であることが明らかにされた。参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,258,845号を参照。

【0077】

C. ピロキシカム

ピロキシカムは、リウマチ性関節炎及び骨関節炎の治療において十分に立証された非ステロイド系抗炎症薬であり、下記の化学名称を有する:4-ヒドロキシ-2-メチル-N-2-ピリジル-2H-1,2-ベンゾチアジン-3-カルボキサミド-1,1-ジオキサイド。その有用性も、筋骨格障害、月経困難、及び術後疼痛の治療において実証されている。ピロキシカムの半減期は長く、その1日1回の投与を可能にする。経直腸投与した場合も、該薬物が有効であることが明らかにされている。胃腸のクレームが最も頻繁に報告された副作用である。

20

【0078】

ピロキシカムは、最近のIIbトライアルで副作用が実証されたが、動物モデルにおいて、有効な化学予防薬剤であることが明らかにされている(Pollard及びLuckert、1989年;Reddyら、1987年)。NSAIDの副作用についての大規模なメタ分析も、ピロキシカムは他のNSAIDよりも多くの副作用を有することを示唆する(Lanzaら、1995年)。

【0079】

DFMOとピロキシカムとの併用は、AOM治療した結腸発癌性ラットモデルにおいて相乗的な化学予防効果を有することが明らかにされているが(Reddyら、1990年)、但し各薬剤を個別に投与したとき、DFMOは、Ki-ras突然変異及び腫瘍形成に対して、ピロキシカムよりも強い抑制効果を発揮した(Reddyら、1990年)。1つの試験では、DFMO又はピロキシカムをAOM治療したラットに投与すると、Ki-ras突然変異を内包する腫瘍の数が90%から36%、及び25%にそれぞれ低下した(Singhら、1994年)。また両薬剤は、既存腫瘍中の生化学的に活性なp21 rasの量も低下させる。

30

【0080】

D. セレコキシブ

セレコキシブは、骨関節炎、リウマチ性関節炎、急性疼痛、強直性脊椎炎の治療において十分に立証されており、またFAPを有する患者の結腸及び直腸ポリープの数を低減する非ステロイド系抗炎症薬であり、下記の化学名称を有する:4-[5-(4-メチルフェニル)-3-(トリフルオロメチル)ピラゾール-1-イル]ベンゼンスルホンアミド。セレコキシブは、ブランド名セレブレックス(Celebrex)、セレブラ(Celebra)、及びオンセナル(Onsenal)として、Pfizer社より市販されている。セレコキシブは、選択的COX-2インヒビターである。セレコキシブの副作用として、心疾患率及び血管疾患率の30%増加が挙げられる。更に、胃腸の副作用のリスクは80%を上回る。

40

【0081】

E. NSAIDの併用

様々なNSAIDの併用も様々な目的で用いられる。より低用量の2つ又はそれ超のNSAIDを用いることにより、個々のNSAIDをより高用量で使用した場合と関連した副作用又は毒性を低減することが可能である。例えば、いくつかの実施形態では、スリンダクは、セレコ

50

キシブと共に利用可能である。いくつかの実施形態では、NSAIDの一方又は両方は、選択的COX-2インヒビターである。やはり単独又は組み合わせて用いられるNSAIDの例として、イブプロフェン、ナプロキセン、フェノプロフェン、ケトプロフェン、フルルビプロフェン、オキサプロジン、インドメタシン、スリンダク、エトドラク、ジクロフェナク、ピロキシカム、メロキシカム、テノキシカム、ドロキシカム、ロルノキシカム、イソキシカム、メフェナム酸、メクロフェナム酸、フルフェナム酸、トルフェナム酸、セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ、パレコキシブ、ルミラコキシブ、又はエトリコキシブが挙げられるが、但しこれらに限定されない。

【0082】

IV. 患者の診断及び治療

いくつかの実施形態では、治療法は、有効性を改善するため、及び/又は本明細書に提示する組成物の投与を含む抗がん療法の毒性を最低限に抑えるために、診断法で補完され得る。そのような方法は、例えば米国特許第8,329,636号、及び同第9,121,852号、米国特許公開第20130217743号、及びPCT特許国際公開第2014070767号に記載されており、そのすべてが参照により本明細書に組み込まれる。例えば、本開示の組成物及び製剤は、ODC1遺伝子プロモーターの少なくとも一方の対立遺伝子について、そのポジション+316における遺伝子型がGである対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、患者のODC1遺伝子プロモーターの両方の対立遺伝子について、そのポジション+316における遺伝子型はGGであり得る。いくつかの実施形態では、患者のODC1遺伝子プロモーターの両方の対立遺伝子について、そのポジション+316における遺伝子型はGAであり得る。

【0083】

更に、腺腫の再発に関する全体モデルにおいて、統計的に有意な交互作用が、プラセボ患者における腺腫再発パターンがGG 50%、GA 35%、AA 29%に対して、エフロルニチン/スリンダク患者ではGG 11%、GA 14%、AA 57%のように、ODC1遺伝子型と治療について検出された。少なくとも1つのA対立遺伝子を担持する、アスピリン投与されたCRA患者では腺腫再発リスクが低下することを示す過去の報告とは対照的に、エフロルニチン及びスリンダクの腺腫阻害効果は、メジャーGホモ接合ODC1遺伝子型を有する患者でより大きかった(Martinezら、2003年;Barryら、2006年;Hubnerら、2008年)。これらの結果より、ODC1 A対立遺伝子キャリアーは、GG遺伝子型患者と比較して、エフロルニチン及びスリンダクへの長期曝露に対する応答が異なり、腺腫再発に関してA対立遺伝子キャリアーが経験する利益はより少なく、また特にAAホモ接合体では、聴器毒性を発症するリスクが高まるおそれがあることが示唆される。

【0084】

その他の態様では、本発明の用量固定式の併用物が、細胞又は組織のlet-7レベルが低い患者に投与される。その他の態様では、本組成物は、細胞又は組織のHMGA2レベルが高い患者に投与される。

【0085】

その他の態様では、本発明の組成物は、細胞又は組織のLIN28レベルが高い患者に投与される。

【0086】

V. 神経芽細胞腫

神経芽細胞腫(NB)は、副腎髓質に由来する自律神経系、及び胸部及び腹部内の自律神経節の腫瘍である。白血病及び脳腫瘍に次いで、NBは幼児期における最も頻度の高いがんであり、3番目に頻度の高い小児期の悪性腫瘍であり、また小児における固形腫瘍に起因する主な死亡原因である。米国内の罹病率は、小児7,000名につき約1例である(Aterら、1998年)。

【0087】

NBに対する療法は、特に、肝臓、骨、リンパ節及び骨髄への広範な転移を伴う疾患の進行期に非常に集中している。再発性/難治性及び高リスクのNB患者に対する最新の治療状態は流動的であり、多くの主導的研究機関が療法に対して異なるアプローチを採用してい

10

20

30

40

50

る。抗体療法、幹細胞移植、及びレチノイン酸による生物学的療法と共に、手術、放射線療法、化学療法、及び高用量化学療法、それに後続する骨髄移植、その後の分化誘導療法が、この患者群の治療を試みるなかで用いられる。より最近では、NB細胞が大量に発現するGD2糖脂質抗原に対するモノクロナル抗体を用いた免疫療法が加わった(Bossletら、1989年;Cheungら、1998年)。治療と関連する毒性が、特にこの小児母集団において重要な問題である。患者の一部は、これらの治療選択肢の一部から除外される(例えば、抗体療法では、微小残存病変以外の病変を有する患者は除外される)。最近のフェーズI試験では、再発性又は難治性のNBを有し、イリノテカン及びテモゾロミドで治療された患者55例からなる群内の小児はいずれも、3年以上生存しなかったことが判明した(小児腫瘍学グループ)。

10

【0088】

過去30年にわたり、重要な治療上の進歩がなされ、相対的5年生存率が約25%~55%増加した。但し、ほぼ50%の患者が、罹患した腫瘍により死亡すると推定され、また過去10年間にわたり、NB患者の5年生存率の改善は遅々として進んでいない(Harras、1996年)。NBは、診断時に2歳よりも年長の患者、進行期の疾患、及び/又はMYCN遺伝子増幅により特徴付けられる疾患において特に不良な予後を有する(Seegerら、1985年;Brodeur、2003年)。これらのNBのより侵襲性の形態は、化学療法アプローチに対する応答が不十分であり、したがって代替的な分子薬物標的の探索に注力する際には、MYCN増幅型のNB腫瘍の細胞制御についてより深く理解する必要性が高い。MYCN腫瘍性タンパク質の役割は、NBの病因において立証済みであるものの、MYCNが、この疾患の発症及びその不良な予後の両方に寄与する機構はなおも不明確である。MYCN腫瘍性タンパク質は、転写制御因子(Ben-Yosefら、1998年)として機能し、したがってNB悪性表現型に関与する重要な遺伝子の発現を制御することにより、腫瘍形成及び患者生存率に影響を及ぼす可能性がある。MYCNは、オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)、多剤耐性関連タンパク質1(MRP1)、及びMDM2をコードする遺伝子の発現を制御する(Slackら、2005年)。

20

【0089】

ODCは、ポリアミン生成における律速酵素である(Marton及びPegg、1995年)。ポリアミン、したがってODCは正常な細胞増殖にとって不可欠であるが、ODCの活性が高まると、*in vitro*での細胞形質転換を誘発する可能性があり(Auvinenら、1992年)、またODCレベルが高いと、それは脳及び前立腺の腫瘍を含む様々な腫瘍と関連する(Mohanら、1999年;Ernestusら、2001年)。2004年に、高リスクNBの治療を目的としてDFMOを調査する試験が開始した(Bachmann、2004年)。DFMOは、オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)の酵素活性化型インヒビターであり、またODCはポリアミン生合成の律速酵素である。DFMOによる前臨床試験では、ポリアミンの枯渇が、NBにおける有効な治療戦略であることを明らかにした(Wallieら、2005年)。DFMOは、ポリアミン制御型のp27Kip1/Rbシグナリング経路を変化させ、G1細胞周期停止を引き起こし、またNB移動/細胞の浸潤を阻止する(Wallieら、2005年;Koomoaら、2008年;Koomoaら、2013年)。ODC発現は、MYCN増幅と独立しているNBに対する好ましくないリスク因子である(Geertsら、2010年)。ODC遺伝子発現は、MYCNにより直接活性化され、また患者のサブセットでは、MYCNと同時増幅されるが(Hogartyら、2008年)、それは、MYCN遺伝子が増幅されると、ODCの高度の発現、したがって後続するポリアミンの高レベル化を引き起こし、悪性表現型及びNB腫瘍形成の維持に寄与することを示唆する(Auvinenら、1992年;Auvinenら、1995年;Auvinenら、2003年;Lutzら、1996年;Ben-Yosefら、1998年;Luら、2003年;Bachmannら、2012年)。

30

【0090】

新生物のマーカーとして、ポリアミンの尿中分泌が、40年以上前に提案された(Russell及びLevy、1971年)。技術、並びにこれらポリカチオン性分子の代謝及び輸送に対する限られた理解が、その開発を制限した。図1に示すように、ポリアミンの排出は、スペルミジン及びスペルミンのアセチル化を伴う高度に制御されたプロセスであり、スペルミジン及びスペルミンが、アルギニン輸送を促進する溶質輸送体トランスポーターに対するカウンターアイオンとして作用することを可能にするものと、今日認識されている(Xieら、1997

40

50

年;Uemuraら、2008年;Uemuraら、2010年)。組織ポリアミンのエクスポーターに対する基質は、一般構造 $R_1-NH_2^+-\left(CH_2\right)_{n>2}-NH_2^+-R_2$ を有する(Xieら、1997年)。したがって、ブトレシン、スペルミジン及びスペルミンのいずれでもなく、モノアセチルスペルミジン及びジアセチルスペルミンが、このエクスポーターに対する基質であるが、またポリアミン代謝が高まった条件下で、組織がホメオスタシス制御を試みた結果として、尿中に現れるものと期待され得る。スペルミジン、スペルミン、及びモノアセチルスペルミンは尿中に現れるが、細胞溶解、血清アミンオキシダーゼに起因する全身性の分解生成物(例えば、スペルミジン)、又は非哺乳類細菌叢の生成物のいずれかである可能性が高い。

【0091】

ポリアミンエクスポーターSLC3A2に対する基質であり、ブトレシン、N¹AcSpd及びN¹N¹²Ac₂Spmを含む、7つの尿中ポリアミン代謝物について、その意義を評価した。N¹AcSpdのみが、DFMO治療により、治療の最初の数週間に於いて統計的に有意な影響を受けた。この種は、最も広く認められる尿中ポリアミン代謝物の1つであり、またSLC3A2エクスポーターと物理的に結合しているSAT1遺伝子産物によりアセチル化され、これによって排出される際の標的となるという点において重要である(Uemuraら、2008年)。またSAT1は、ODCとも会合してブトレシン及びポリアミンを合成及び排出するための潜在的な代謝チャンネルを形成する。

【0092】

DFMO治療は、治療の最初の2週間に於いて、母集団全体として尿中N¹AcSpd含有量を低下させた。尿中ポリアミンレベルの低下は、rs2302616にODCマイナーリスク対立遺伝子を有する患者で最も有意であった。疾患の進行は、特にDASの尿中レベルの増加と関連したが、但し一部の患者ではブトレシン及びモノアセチルスペルミジンレベルが上昇した。ジアセチルスペルミンは、結腸がん及び乳がんを有する成人における腫瘍進行のマーカーとしてこれまで識別されてきた(Kawakitaら、2011年;Hiramatsuら、2005年)。本試験は患者21例からなる小規模試験であったが、ポリアミン、特にDASの尿中レベルは疾患状態によって変動すると思われ、また療法期間中の評価対象となり得る疾患状態のマーカーとなり得る。このような関連性は、DFMOによるNB患者を対象とした別のフェーズI及びフェーズIIトライアルにおいて現在調査中である。このような上昇は、DFMOの增量を必要とするODC酵素レベルの上昇を含む、抵抗性機構を反映し得る。留意すべき点として、本試験では、尿中ポリアミンの低下又はPFS応答の増加のいずれについても、明らかなDFMO用量依存性の応答が認められなかつたことが挙げられる。DFMO用量漸増についてより詳細に調査する後続試験が進行中である。

【0093】

VI. NB細胞分化におけるポリアミンの役割

細胞内ポリアミン、例えばPut、Spd、及びスペルミン(Spm)等のレベル変動が、細胞分化と関連して認められたが(Heby、1981年;Tabor及びTabor、1984年;Pegg、1986年)、またDFMOによるODCの阻害、及びポリアミンプールの低下は、様々ながん細胞を刺激して分化させる(Chenら、1983年;Melinoら、1988年;Melinoら、1991年)。NB細胞のDFMO治療は、異なる表現型を誘発することにより三角形のNB形態を変化させ得る;その1つは、引き延ばされた線維芽細胞様の細胞と類似し、典型的な神経炎プロセスを伴わない。比較として、レチノイン酸(RA)により治療すると、明確な神経突起の伸長が示すようにNB細胞の神経への分化を誘発する(Melinoら、1988年;Melinoら、1991年;Wainwrightら、2001年)。

【0094】

腫瘍増殖におけるODC及びポリアミンの重要性は十分に立証されているが(Casero及びMarion、2007年;Pegg及びFeith、2007年)、小児NBの治療におけるDFMOの有用性は最近まで検討されず(Bachmann、2004年;Walllickら、2005年)、本明細書に提示するトライアルは、NB患者を対象としてDFMOを臨床的に評価した最初のトライアルである。DFMOの経口投与は、いずれの適応についても規制承認を受けていない実験的療法である。高用量静脈内(IV)DFMOは、西アフリカ睡眠病(トリパノソーマ病)の第一選択療法として1990年に規制承認を受け、ニフルチモックス-エフロルニチン併用療法(NECT)とも呼ばれるニフルチモックス

10

20

30

40

50

との併用で、世界保健機構により使用されている、(Priottoら、2009年;Alিrolら、2013年)。局所的DFMOは、多毛症(過剰の顔面の毛髪)を対象とする市販療法の有効成分である(Blume-Peytavi及びHahn、2008年)。

【0095】

NB腫瘍形成におけるODCの重要性に関する更なるエビデンスが、ヒトNB腫瘍を用いた最近の試験から入手可能である。NB患者88例から得たODC mRNAの発現レベルについて分析を行い、ODC発現と全生存確率の間で有意な相関が見出された。ODCのレベルが高いと、生存確率が低いと予測されたが、その逆も成り立つ。最も驚くべきことに、ODCは、MYCN増幅を伴わない腫瘍においても予測的であり、したがってODCは、MYCN増幅と独立したNB腫瘍形成においても役割を果たしていることを示唆する(AACR 2009、Abstract #3208)。これらの所見は、別の2グループにより独立して確認された(Hogartyら、2008年;Rounbehlerら、2009年)。

10

【0096】

VII. フェーズII予防トライアルの結果

高リスク神経芽細胞腫(HRNB)は、小児腫瘍学における課題としてなおも存続し、小児がんの全死亡の15%を占める。ほとんどの患者は寛解に達することができるが、HRNBの自然経過は十分に立証されており、免疫療法完了後5年以内に約半数の患者が再発する。実施例7の試験では、標準療法終了時に完全寛解の状態にあったHRNB患者を対象に、再発を防止する維持療法として、HRNBのがん幹細胞経路を標的とするODCインヒビターであるジフルオロメチルオルニチン(DFMO)の有効性について評価した。この試験は、非盲検、単一薬剤、多施設試験であった。登録は2012年6月に開始し、2016年2月に終了した。対象は、50 0 ~ 1000mg/m² 1日2回の用量で、経口DFMOの4週間サイクルを27回受けた。無再発性の生存(EFS)及び全生存(OS)を、治療意図に基づき決定した。合計94例の対象が、DFMOの投与を受け、91例が治療の意図(ITT)母集団に関する適格性を有した。全ITT対象において、2年時点でのEFSは91% (± 4%)、及びOSは98% (± 2%)であった。ANBL0032試験にこれまでに参加した対象の部分群(n=74)では、2年EFSは95% (± 3%)、及びOSは98%であった。これは、抗体療法後に、保守的に見積もられた2年EFSとして76%(p<0.01)、及びOSとして89%(パラメトリックモデルに基づきp<0.01)を示したANBL0032試験と比較して有意な改善である。疾患を再発して死亡した対象1例は、親の過誤が原因で50%の用量しか投与されなかった。DFMOは良好な忍容性を示し、<10%の患者で報告されたグレード2~3の高トランスマニナーゼ血症が最も一般的な毒性であった。500 ~ 1000mg/m² BIDでのDFMO投与は、有効且つ安全な用量である。高リスク神経芽細胞腫に対する標準療法終了後に、DFMO治療を行うと、EFS及びOSの改善と関連し、HRNBを有する小児における高再発率を低下させた。

20

【0097】

高リスク神経芽細胞腫(HRNB)は、小児腫瘍学における課題としてなおも存続し、小児がんの全死亡の15%を占める。米国では、毎年650 ~ 700例の新たなNB症例が認められる。ほとんどの患者は寛解に達することができるが、HRNBの自然経過は十分に特徴づけられており、治療終了後2年で約30%が再発し、また5年で50%が再発することが明らかである(Simonら、2004年;Yuら、2010年;Cheungら、2012年;Bertholdら、2005年)。現在のところ、再発した小児のための治癒的治療は存在せず、またその5年生存率は<10%である。

30

【0098】

HRNBに対する現在の治療は、5 ~ 6サイクルの導入化学療法(一般的にシクロホスファミド、トポテカン、シスプラチニン、エトポシド、ドキソルビシン、及びビンクリスチンを含む)、原発腫瘍の外科切除、自己幹細胞移植(ASCT)と組み合わせた1 ~ 2サイクルの高用量化学療法とその後の放射線療法、及びキメラ抗GD2抗体(ch14.18)免疫療法を併用したイントレチノインによる維持療法から構成される。この集中療法にもかかわらず、免疫療法開始からの2年無再発性の生存率(EFS)は66 ± 5%であると、Yuら、2010年により報告されており、また遅発性の再発が継続することから、4年EFSは59 ± 5%であることがAliceら、2014年により最近報告された。したがって、治療後の再発予防は、HRNB患者の生存率を改善する重要な目標である。

40

50

【 0 0 9 9 】

ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)は、ポリアミン生合成の律速酵素であるオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)の酵素活性化型インヒビターである。ポリアミン含有量が高いこと、ODC発現が増加することは、NB並びに多くのその他の腫瘍において明らかにされており、がん細胞内のポリアミンレベルを抑制すれば、腫瘍細胞の増殖が低下する(Samalら、2013年;Hixsonら、1993年)。DFMOによりODCを阻害すれば、LIN28は減少し、Let7レベルは増加し、したがって重要ながん幹細胞(CSC)経路を逆転させるが、またニューロスフェア形成が減少することも明らかにされている(Lozierら、2015年)。

【 0 1 0 0 】

再発性/難治性のNBを有する小児を対象としたDFMOのフェーズI試験の結果が最近公表された(Saulnier Shollerら、2015年)。そのトライアルで使用された用量は、尿中ポリアミンを正常化させ、生物学的標的が有効に阻害されることを示唆する。全評価可能対象18例のメジアン無増悪性の生存(PFS)は、80.5日であった(95% CI:62~418日)。より重要なこととして、対象3例が、DFMO開始後2~4.5年間疾患が進行することなく、またDFMO療法終了後の1~3年間、更なる治療を受け取ることなく生存した。DFMOは、試験したすべての用量レベルで安全であり、用量制限性の毒性(DLT)又は薬物関連の重篤な有害事象(SAE)は認められなかった。

【 0 1 0 1 】

フェーズII試験が、標準アップフロント療法終了時に完全寛解状態にあったHRNB患者の再発を予防する際のDFMOの有効性を更に評価するために設計された。

【 0 1 0 2 】

NMTRC003は、化学療法、手術、ASCTと組み合わせた高用量化学療法、放射線、及びイソトレチノインを併用した抗GD2抗体を含む標準療法を終了した後に、完全寛解状態にあったHRNB罹患小児のための維持療法として、DFMOを評価した。結果から、500~1000mg/m² 1日2回のDFMOは、再発を防止し、また2年EFSが91%及びOSが98%と、この患者母集団のEFS及びOSを改善し得ることが示唆される。DFMO療法終了後、登録から最長3.5年のフォローアップにおいて遅発性の再発は認められなかった。

【 0 1 0 3 】

高リスク特性の発生率に関する対象の特徴、及び抗体療法前に一回又は二回移植を受けた対象の数は、COG ANBL0032に参加した対象についてこれまでに報告された対象と有意に異ならなかった。実際、当試験に参加した対象74例は、これまでにANBL0032に参加し、治療を受けた。このコホートは、ANBL0032の生存曲線に一致するものと予想されるが(Yuら、2010年)、ANBL0032では、患者が抗体投与を受けた期間中の治療について統計的補正を行った後、抗体療法終了時に無増悪であった患者の2年EFSは、保証的に見積もったとしても76%であり得るが、当試験で認められた2年EFSは95%であった(±3%)。更に、ANBL0032に参加した対象の無再発性の生存は、抗体投与後2年時点以降、継続して低下したが、本発明者らの結果は、登録から最長3.5年間安定な状態に留まり、DFMOによる治療により、薬物を中止した後でも再発から継続的に保護されることが示唆される。高用量療法/ASCTの前に、応答状態がCR又は非常に良好な部分寛解(VGPR:Very Good Partial Response)であるANBL0032に参加した対象では、部分寛解の患者と比較してそれより良好な転帰が認められたが、当試験に参加した対象では、移植前の疾患状態を問わず等しく、十分に認められた。同様に、免疫療法直前のキュリースコアが>0であるANBL0032に参加した対象(n=15/100)の3年EFSは28.9%±6.8%であった一方(Yanikら、2013年)、当試験に参加した対象52例中4例について、免疫療法前のキュリースコアが>0であると識別されたが、そのすべてが2年を上回り、寛解状態に留まっている。

【 0 1 0 4 】

DFMOは、分裂性のがん細胞の死を誘発する標準的な抗腫瘍薬剤として作用するとは思われない。前臨床研究では、ODC阻害は、LIN28/Let7経路に対する効果を通じて、CSCの表現型に不可逆的変化を誘発すると考えられ、したがってこの細胞集団が腫瘍の再発を支援する可能性を低下させることを明らかにした(Samalら、2013年;Lozierら、2015年)。HRNB C

10

20

30

40

50

SCの標的化は、DFMOが再発を阻止するように作用するときにそれが依拠する機構に該当する可能性があり、更に試験されるべきである。

【0105】

現行の試験は、ランダム化対照群が存在しないので限定的である；但し、このプロトコールに参加した対象の大多数が、ANBL0032に登録した後に治療を受けたという事実は、ANBL0032プロトコールのデータは、まさに有効な比較群を構成することを示唆する。更に、このプロトコールに参加するのにCRの疾患状態が要件とされ、バイアスのかかった結果が得られた可能性もある。但し、ANBL0032は残存病変を有する患者も参加させたが、公表された有効性の分析では、試験登録時に生検で証明された残存病変を有する対象は特に除外された。更に、高用量化学療法及びASCTの前に、疾患状態がVGPRとして評価された、ANBL0032に参加した対象は、疾患状態がCRであった対象とほぼ同一の転帰を有した(Yuら、2010年)。同時に、これらのデータは、CR(当試験で定義するような)に関する適格性要件により持ち込まれた可能性のあるバイアスは、いずれも最低限度であり、当試験とANBL0032経験との間で認められたEFS及びOSの差異の大きさを説明するには極めて不適切であることを示唆している。

10

【0106】

本試験で使用した用量と類似したDFMO用量は、尿中ポリアミンレベルを低下させる(フェーズI)、ポリアミンの大腸粘膜レベルを低下させる(Meyskensら、1993年)、及びホルボールエステルにより誘発された皮膚ODC活性を有意に阻害する(Baileyら、2010年)のに有効であることが明らかにされている。この用量のDFMOは、非常に安全な薬物治療であると思われる。DFMOは、WHOによりアフリカ睡眠病で約30年間用いられており、また米国では毛髪除去を目的としてスキンクリームの形態で承認されている。500mg/m²/日での経口DFMOの事前トライアルでは、DFMOは安全であることが明らかにされたが(Baileyら、2010年)、また本試験で投与された用量より5倍高い3.75g/m²/日の用量が投与された成人を対象とした過去のフェーズI試験では、臨床的に有意な腎臓、肝臓、聴覚、又は血液学的な毒性は示されなかった(Griffinら、1987年)。本試験は、HRNBを有する小児におけるこの用量のDFMOの安全性を、特に顕著又は不可逆的な聴器毒性に関して確認した。

20

【0107】

HRNBを有する小児の標準療法に由来する長期副作用として、心毒性、聴器毒性、甲状腺機能低下症、続発性悪性腫瘍、及び移植後合併症が挙げられる(Martinら、2014年;Simonら、2002年;Laverdiereら、2009年)。当試験は、500~1000mg/m² BIDでのDFMOは安全であり、またHRNBを有する小児において、標準アップフロント治療後の最初の2年内に高頻度で生ずる再発を有意に低下させ、EFS及びOSを延ばすことを実証している。

30

【0108】

VIII. がん幹細胞

明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、用語「がん幹細胞」及び「CSC」は、交換可能であり、また固形がん幹細胞を指す。CSCは哺乳動物性であり、また好ましい実施形態では、このCSCは、ヒト起源であるが、但しそれに限定するように意図されない。

【0109】

腫瘍が増殖及び転移する様式を説明する1つの仮説として、各腫瘍内には、無制限に自己再生する能力、及びより成熟した腫瘍細胞に発達する能力を有し、但し複製能力という点で比較的制限された、異なる小さな細胞のサブセットが存在するという、がん幹細胞仮説が挙げられる。このようながん幹細胞(CSC)は、化学療法薬、放射線又はその他の毒性条件に対してより抵抗性である場合があり、したがって臨床療法後も遷延し、また続発性腫瘍にその後増殖する、転移する、又は再発に関係すると仮定されている。例えば、Chaffer及びWeinberg(2015年)を参照。

40

【0110】

固形腫瘍は、幹細胞集団を含む器官で発生すると考えられている。このような組織内の腫瘍は、増殖能力及び新たな腫瘍の形成能力において顕著に異なるがん細胞の不均質な集団から構成され、腫瘍形成能力のこのような差異は、例えば乳がん細胞及び中枢神経系の

50

腫瘍について報告されている。大部分のがん細胞の分裂能力は限定的であるが、最近の文献では、がん幹細胞と呼ばれるがん細胞の集団は、広範に自己再生し、また新たな腫瘍を形成する排他的能力を有することが示唆される。益々増加するエビデンスより、正常な幹細胞の自己再生を制御する経路は、がん幹細胞では調節解除されている、又は変化しており、自己再生がん細胞の継続的増殖及び腫瘍形成を引き起こすことが示唆されている。

【0111】

がん幹細胞は、腫瘍の残りの90%程度(すなわち、腫瘍バルク)と比較して、それより腫瘍形成性であり、相対的に低速増殖的又は非活動的であり、また多くの場合、腫瘍バルクよりも相対的に化学療法抵抗性である特有の腫瘍部分母集団を含む(多くの場合、0.1%~10%程度)。従来式の療法及び治療計画は、その大部分が、増殖性細胞(すなわち、腫瘍バルクを含むがん細胞)を速やかに攻撃するように設計されてきたことを考慮すれば、多くの場合低速増殖性であるがん幹細胞は、従来式の療法及び治療計画に対して、急速増殖性の腫瘍バルクよりも相対的に抵抗性であり得る。がん幹細胞は、がん幹細胞を比較的化学療法抵抗性にさせるその他の特性、例えば多剤耐性及び抗アポトーシス経路等を呈し得る。上記内容は、進行期のがんを有するほとんどの患者において長期ベネフィットを保証する標準的な腫瘍学治療計画の不奏功に対する、すなわち、がん幹細胞をしかるべきその標的とし根絶することができないことの主な理由を構成する。いくつかの事例では、がん幹細胞は、腫瘍の創始細胞である(すなわち、がん幹細胞は、腫瘍バルクを構成するがん細胞の前駆体である)。

10

【0112】

特定の実施形態では、方法は、試験される対象から生体試料を取得する工程、サンプル中のがん幹細胞の有無を検出する工程を含み、がん幹細胞が存在する場合には、対象はがん幹細胞が富化した腫瘍を有する可能性が高い。1つの実施形態では、生体試料は、血液サンプル又は対象内の腫瘍から得た細胞サンプルである。

20

【0113】

がん幹細胞の有無を検出する工程は、がん幹細胞上で発現するバイオマーカーの有無、例えばCD38の不存在、或いはCD34、ALDH、NOTCH、CD133、CD44、CD24、EpCAM、THY1、CD200、SSEA-1、及び/又はEGFRの存在等を検出する工程を含み得る。バイオマーカーは、当技術分野において公知の任意の方法、例えばmRNAの定量的又は定性的な検出(例えば、qPCR、マイクロアレイ、*in situ*ハイブリダイゼーション、ノーザンプロットティング、ヌクレアーゼ保護等)、或いはタンパク質の定量的又は定性的な検出(例えば、マススペクトロメトリー、FACS、ELISA、ウェスタンプロットティング等)等を用いて検出可能である。

30

【0114】

IX. 遺伝子導入された神経芽細胞腫動物モデルにおけるDFMOの効果

両グループ(Hogartyら、2008年;Rounbehlerら、2009年)は、TH-MYCN NBマウスモデルを用いて、*in vivo*でのDFMOの効果を確認した。DFMOをシスプラチニン及びシクロホスファミドと併用すると、TH-MYCNホモ接合マウスの非腫瘍形成生存率が高まった(Hogartyら、2008年)。更なる試験では、DFMOをSAM486Aと併用すると、相乗的に作用して、TH-MYCNマウスで腫瘍負荷の有意な低下を引き起こした(AACR 2009年、Abstract #3203)。

40

【0115】

X. 多形性分析

ODC遺伝子内の一塩基多型(SNP)は、特定のがんのリスクと関連した(Martinezら、2003年;Visvanathanら、2004年;Brownら、2009年)。ODC遺伝子内のrs2302615におけるマイナーバリエーションが、過去に結腸直腸がんを有した患者の生存にとってリスク対立遺伝子であるが(Zellら、2009年)、NBを有する患者では保護性の対立遺伝子である(Norrisら、2014年)ことが判明した。rs2302615におけるSNPは、e-ボックス転写因子の周辺DNA要素との結合に影響を及ぼすが(Martinezら、2003年;Zellら、2009年;Norrisら、2014年)、e-ボックス転写因子は、上流のSNP(rs2302616)において作用する転写因子と相互作用する(Garcia-Huidobroら、2014年)。rs2302616におけるマイナーバリエーションは、ODC遺伝子内のG-C重鎖構造を破壊し、ODCプロモーターの活性を高め、そして結腸直腸がんのリスクを有

50

する患者に由来する直腸組織のプロテシン含有量増加と関連する(Garcia-Huidobroら、2014年a; Garcia-Huidobroら、2014年b)。この遺伝子型を有する、結腸直腸腺腫予防トライアルに参加した患者も、ポリアミン経路を標的とする薬剤の併用に対して最大の応答を示し(Garcia-Huidobroら、2014年b)、rs2302616におけるマイナーティビティ遺伝子は、「ポリアミン中毒」表現型を担持し得ることが示唆される。

【0116】

患者のODC1遺伝子型を、実施例セクションに記載する特別な方法を含む、下記に提示する方法を用いて決定することができる。この方法は、当業者により適用されるような分子生物学の原理及び技法を用いて、更に修正及び最適化可能であり得る。そのような原理及び技法は、例えば参照により本明細書に組み込まれるSmall(2002年)で教示されている。一塩基多型(SNP)の識別で採用される一般的な方法を下記に提示する。Kwok及びChen(2003年)並びにKwok(2001年)を参照するとこれらの方法いくつかについて概要が提示されており、これら参考資料の両方は参照により具体的に組み込まれる。

10

【0117】

ODC1に関するSNPは、このような方法又はその適する変法のいずれかを使用することによりキャラクタリゼーションが可能である。そのような方法には、部位の直接又は間接的な配列決定、部位の各対立遺伝子が制限部位を形成又は破壊するような制限酵素の使用、対立遺伝子固有のハイブリダイゼーションプローブの使用、多形の異なる対立遺伝子によりコードされるタンパク質に対して特異的な抗体の使用、又は任意のその他の生化学的解釈が含まれる。

20

【0118】

A. DNA配列決定

多形のキャラクタリゼーションに一般的に用いられる方法として、多形に隣接し、これを含む遺伝子座の直接的なDNA配列決定が挙げられる。そのような分析法は、「サンガーフェイ」としても知られている「ジデオキシ媒介型の連鎖終止反応法」(Sangerら、1975年)、又は「マクサム・ギルバート法」としても知られている「化学的分解法」(Maxamら、1977年)を用いて実現することができる。ゲノム配列特異的增幅技術と併用した配列決定法、例えばポリメラーゼ連鎖反応等が、所望の遺伝子の回収を促進するのに利用可能であり(Mullisら、1986年；欧州特許出願第50,424号；同第84,796号；同第258,017号；同第237,362号；同第201,184号；米国特許第4,683,202号；同第4,582,788号；及び同第4,683,194号)、上記すべてが参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0119】

B. エキソヌクレアーゼ耐性

多形部位に存在するヌクレオチドの同一性を決定するのに利用可能なその他の方法は、特殊なエキソヌクレオチド耐性ヌクレオチド誘導体を使用する(米国特許第4,656,127号)。多形部位に対して3'側直近に位置する対立遺伝子配列に対して相補的なプライマーは、調査対象のDNAとハイブリダイズする。DNA上の多形部位が、存在する特定のエキソヌクレオチド耐性ヌクレオチド誘導体に対して相補的なヌクレオチドを含有する場合には、当該誘導体は、ポリメラーゼによってハイブリダイズしたプライマーの末端に組み込まれる。そのような組み込みにより、プライマーはエキソヌクレアーゼの切断に対して抵抗性となり、これによりその検出が可能となる。エキソヌクレオチド耐性誘導体の同一性は公知であるので、DNAの多形部位に存在する特異的ヌクレオチドを決定することができる。

40

【0120】

C. マイクロシークエンシング法

DNA内の多形部位をアッセイ用として、いくつかのその他のプライマー誘導式ヌクレオチド組み込み手順が記載されている(Komherら、1989年；Sokolov、1990年；Syvanen 1990年；Kuppuswamyら、1991年；Prezantら、1992年；Ugozzoliら、1992年；Nyrenら、1993年)。これらの方法は、多形部位において塩基間を区別するための、ラベリングされたデオキシヌクレオチドの組み込みに立脚している。シグナルは、組み込まれたデオキシヌクレオチドの数に比例するので、同一のヌクレオチドのラン(run)において生ずる多形は、ランの長

50

さに比例したシグナルをもたらす(Syvanenら、1990年)。

【0121】

D. 溶液中の拡張

フランス特許第2,650,840号及びPCT出願国際公開第91/02087号は、多形部位のヌクレオチドの同一性を判定する、溶液に基づく方法について考察している。これらの方法によれば、多形部位に対して3'側直近にある対立遺伝子配列に対して相補的なプライマーが使用される。当該部位のヌクレオチドの同一性は、多形部位のヌクレオチドに対して相補的な場合にプライマーの末端に組み込まれる、ラベリングされたジデオキシヌクレオチド誘導体を用いて判定される。

【0122】

E. 遺伝的ビット分析又は固相拡張

PCT出願国際公開第92/15712号には、ラベリングされた転写終結コドンと多形部位の3'側の配列に対して相補的なプライマーとの混合物を使用する方法が記載されている。組み込まれるラベリングされた転写終結コドンは、評価対象となる標的分子の多形部位に存在するヌクレオチドに対して相補的であり、したがって識別される。ここでは、プライマー又は標的分子は、固相に固定化される。

【0123】

F. オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ法(OLA)

これは異なる試験法を使用する別の固相法である(Landegrenら、1988年)。標的DNAの一本鎖隣接配列とハイブリダイズする能力を有する2つのオリゴヌクレオチドが使用される。これらのオリゴヌクレオチドの一方はビオチン化されるが、他方は検出可能にラベリングされる。正確な相補的配列が標的分子内で見出される場合には、オリゴヌクレオチドは、末端が隣接し、ライゲーション基質を形成するようにハイブリダイズする。ライゲーションは、アビジンを用いることによりラベリングされたオリゴヌクレオチドの回収を可能にする。PCRと組み合わせた、この方法に基づくその他の核酸検出アッセイも記載されている(Nickersonら、1990年)。ここでは、標的DNAの指數関数的増幅を実現するためにPCRが用いられ、次にそれがOLAを用いて検出される。

【0124】

G. リガーゼ/ポリメラーゼ媒介型遺伝的ビット分析

米国特許第5,952,174号には、標的分子の隣接配列とハイブリダイズする能力を有する2つのプライマーとも関係する方法が記載されている。ハイブリダイズした生成物は、標的が固定化した固体支持体上に形成される。ここでは、プライマーがヌクレオチド個分のスペースにより互いに分離するように、ハイブリダイゼーションが生ずる。ポリメラーゼ、リガーゼ、及び少なくとも1つのデオキシヌクレオシドトリホスフェートを含有するヌクレオシドトリホスフェート混合物の存在下で、このハイブリダイズした生成物をインキュベーションすると、隣接するハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの任意の対がライゲーション可能となる。リガーゼを添加すると、シグナル、伸長及びライゲーションを生成するのに必要とされる2つのイベントが引き起こされる。これは、伸長又はライゲーションを単独で用いる方法よりも高い特異性、及び低「ノイズ」をもたらし、またポリメラーゼに基づくアッセイ法とは異なり、この方法を第2のハイブリダイゼーション及びシグナルを固相と連結させるライゲーション工程と組み合わせることにより、この方法はポリメラーゼ工程の特異性を増強する。

【0125】

H. 侵襲的な開裂反応

侵襲的な開裂反応は、特定の多形について細胞DNAを評価するのに利用可能である。INVADER(登録商標)と呼ばれる技術は、そのような反応を採用している(例えば、de Arrudaら、2002年; Stevensら、2003年、これらは参照により組み込まれる)。一般的に、3つの核酸分子:1)標的部位の上流に位置するオリゴヌクレオチド('上流オリゴ')、2)標的部位を含むプローブオリゴヌクレオチド('プローブ')、及び3)標的部位を有する一本鎖DNA('標的')が存在する。上流オリゴ及びプローブは重複しないが、連続的配列を含む。プロ

10

20

30

40

50

ープは、ドナー蛍光物質、例えばフルオレセイン等、及びアクセプター色素、例えばダブルシル等を含有する。上流オリゴの3'末端にあるヌクレオチドは、プローブ標的二本鎖の最初の塩基対と重複する(「侵入する」)。次に、プローブは構造特異的5'ヌクレアーゼにより開裂し、蛍光物質/消光物質の対の分離を引き起こし、検出可能な蛍光の量を増加させる。Luら、(2004年)を参照。場合によっては、アッセイは固体表面上又はアレイフォーマットで実施される。

【0126】

I. SNPを検出するその他の方法

多形を検出及び識別するいくつかのその他の特別な方法を下記に示すが、それらは、そのまま利用可能、又は本発明のODC1の多形を識別する工程と併用して、適する修正を加えながら利用することができる。いくつかのその他の方法は、参照により本明細書に組み込まれる、ncbi.nlm.nih.gov/SNPのワールドワイドウェブ上にあるNCBIのSNPウェブサイトに記載されている。

10

【0127】

特定の実施形態では、拡張されたハプロタイプが、母集団内の所与の遺伝子座のいずれかにおいて決定され得るが、これは、どのSNPが冗長であり、またどれが関連試験において不可欠か、正しく識別できるようにする。不可欠なSNPは、遺伝子又は連鎖不均衡領域のハプロタイプを捕捉する「ハプロタイプタグSNP(htSNP)」と呼ばれるマーカーである。代表的な方法については、それぞれが参照により本明細書に組み込まれるJohnsonら、(2001年)及びKe及びCardon(2003年)を参照されたい。

20

【0128】

VDA-アッセイ法は、TaKaRa LA Taq試薬、及びその他の標準反応条件を用いたロングPCR法による、ゲノム分節のPCR增幅を利用する。ロング增幅はサイズが約2,000～12,000bpのDNAを增幅することができる。生成物と変異検出アレイ(VDA:variant detector array)とのハイブリダイゼーションは、Affymetrix High Throughput Screening Centerにより実施可能であり、またコンピューター方式のソフトウェアを用いて分析可能である。

30

【0129】

チップアッセイ法と呼ばれる方法は、標準的又はロングPCRプロトコールによるゲノム分節のPCR增幅を使用する。ハイブリダイゼーション生成物は、参照により本明細書に組み込まれるHalushkaら(1999年)のVDAにより分析される。SNPは、ハイブリダイゼーションパターンのコンピューター分析に基づき「確実な(Certain)」又は「可能性がある(Likely)」として一般的に分類される。代替的検出法、例えばヌクレオチド配列決定法等と比較して、この方法によれば、「確実な」SNPは100%の割合で確認され、また「可能性がある」SNPは73%の割合で確認された。

【0130】

その他の方法は、PCR增幅とその後の関連する制限酵素による消化を単に含む。更に別 の方法は、既知のゲノム領域に由来する精製されたPCR産物の配列決定を含む。

【0131】

更に別 の方法では、個々のエクソン又は大型のエクソンの重複する断片がPCR増幅される。プライマーは、公表された配列又はデータベース配列から設計され、またゲノムDNAのPCR増幅は、既知の条件を用いて実施される。温度サイクリングが実施され、そして得られたPCR産物が、PCR一本鎖立体配座多型(PCR-SSCP)分析により、様々な条件下で、例えば、5%のグリセロールを含む又は含まない、15%の尿素を含む5%又は10%ポリアクリルアミドゲルの条件下で分析される。電気泳動が、終夜実施される。ヌクレオチド変化を識別するために、移動変化を示すPCR産物が、再増幅及び配列決定される。

40

【0132】

XI. 医薬製剤及び投与経路

本開示の治療用化合物は、様々な方法により、例えば経口又は注射(例えば皮下、静脈内、腹腔内等)により投与され得る。投与経路に応じて、活性な化合物は、酸の作用及び化合物を不活性化し得るその他の天然の条件から化合物を保護するために、材料でコーテ

50

イングされ得る。また該化合物は、疾患又は創傷部位への連続的な灌流/輸液により投与される場合もある。

【0133】

もっぱら経口により治療用化合物を投与するために、その不活性化を防止する材料で化合物をコーティングする、又は化合物を該材料と同時投与する必要があり得る。例えば、治療用化合物は、適する担体、例えばリポソーム又は賦形剤に含めて患者に投与され得る。薬学的に許容される賦形剤として、生理食塩水及び水性バッファー溶液が挙げられる。リポソームとして、水中油中水型CGFエマルジョン、並びに従来型のリポソームが挙げられる(Strejanら、1984年)。

【0134】

また、治療用化合物は、非経口的、腹腔内、髄腔内又は脳内にも投与され得る。分散物は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール及びその混合物内並びに油内で調製され得る。通常の保存及び使用条件下では、このような調製物は、微生物の増殖を防止するために防腐剤を含み得る。

【0135】

注射用途に適する医薬組成物として、無菌の水溶液(水溶性の場合)又は分散物、及び無菌の注射液又は分散物を即時調製するための、無菌の粉末が挙げられる。すべてのケースにおいて、組成物は、無菌でなければならず、また易注射可能性が認められる程度に流動的でなければならない。組成物は、製造及び保存条件下で安定でなければならず、また細菌及び菌類等の微生物の汚染作用から保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコール等)、適するそれらの混合物並びに植物油を含有する、溶媒又は分散媒体であり得る。適切な流動性が、例えば、レシチン等のコーティング物の使用により、分散物の場合には必要とされる粒径を維持することにより、及び界面活性剤の使用により、維持され得る。微生物の作用を阻止するには、様々な抗菌薬及び抗真菌薬、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサール等により達成され得る。多くの場合、組成物内に等張化剤、例えば、糖、塩化ナトリウム、又はマンニトール及びソルビトール等の多価アルコールを含むのが好ましい。注射式組成物の持続的吸収は、組成物に吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム又はゼラチンを含めることにより実現可能である。

【0136】

無菌注射液は、これまでに列挙した成分の1つ又は成分の組み合わせと共に、治療用化合物を必要とされる量で、適する溶媒内に組み込み、必要に応じてその後にフィルターによる滅菌処理を実施することにより調製され得る。一般的に、分散物は、治療用化合物を、基本的な分散媒体、及びこれまでに列挙した成分に由来する他の必要成分を含有する無菌の担体に組み込むことにより調製される。無菌注射液調製用の無菌粉末の場合は、好ましい調製法として真空乾燥及び凍結乾燥が挙げられ、この方法により、予め滅菌フィルター処理された該当する溶液から有効成分(すなわち、治療用化合物)と任意の更なる所望の成分からなる粉末が得られる。

【0137】

治療用化合物は、例えば不活性な賦形剤又は吸収可能な可食担体と共に経口投与され得る。治療用化合物及び他の成分は、ハード又はソフトシェルゼラチンカプセルに封入され、錠剤に圧縮され、又は対象の食事に直接導入される場合もある。経口による治療投与では、治療用化合物は、添加剤と共に組み込み可能、及び摂取可能な錠剤、バッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウェファー等の形態で使用可能である。組成物及び調製物中の治療用化合物の割合(%)は、もちろん変化し得る。そのような治療上有用な組成物中の治療用化合物の量として、適する用量が得られるような量が挙げられる。

【0138】

経口投与用の製剤は、小児用途に特に製剤化され得る。治療用化合物は、個別(すなわ

10

20

30

40

50

ち、単回使用)の単位用量で包装され得る粉末として調製され得る。粉末製剤は、例えば、直径約1μ～約2000μの範囲の粒径を有する顆粒形態であり得る。個別の単位用量は、サシェ剤、カプセル等の形態であり得る。個別の単位用量内の粉末化された治療用化合物は、1つ又は複数の添加剤、充填剤(例えば、スターチ、ラクトース、マンニトール、Pearlitol(商標) SD 200、セルロース誘導体、糖等)、バインダー(例えば、ヒドロキシプロピルセルロース(Klucel(商標)-LF)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース又はヒプロメロース(Methocel(商標))、ポリビニルピロリドン又はポビドン(PVP-K25、PVP-K29、PVP-K30、PVP-K90)、プラスドン S 630(コポビドン)、粉末化アカシア、ゼラチン、グーガム、カルボマー(例えば、カーボポール)、メチルセルロース、ポリメタクリレート、及びスターチ)、崩壊剤(例えば、カルメロースカルシウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、及び低置換度ヒドロキシプロピルセルロース)、香味料、又は甘味料と共に製剤化され得る。個別の単位用量中の粉末化された治療用化合物は、添加剤、充填剤、バインダー、崩壊剤、香味料又は甘味料を含めずに製剤化され得る。粉末化された製剤は、接着防止剤、例えばタルク、シリカ誘導体又は二酸化ケイ素等を含み得る。粉末化された治療用化合物は、粉末として投与され得る。粉末化された治療用化合物は、経口投与前に食物又は飲料物中に再溶解され得る。

10

【0139】

治療用化合物は、個別(すなわち、単回使用)単位用量又は多数回使用の用量フォーマットで包装され得る液状濃縮物として調製され得る。濃縮された液状製剤は、治療薬及び溶媒(例えば、有機性又は水性の溶媒)を含み得る。濃縮された液状製剤として、溶液、シロップ等が挙げられる。濃縮された液状製剤は、治療用化合物の味を遮蔽する成分を含み得る。経口投与用の液体組成物は、濃縮された液状製剤を水性媒体と混合することにより取得可能であり得る。濃縮された液体の多数回使用の用量フォーマットは、自宅投与法で提供され得る。

20

【0140】

治療用化合物は、小児投与用としてコーティングされた錠剤として調製され得る。錠剤は、切れ目が入れられる場合がある。切れ目が入れられた錠剤は、単一の単位用量又は複数の単位用量を含み得る。切れ目が入れられた複数の単位用量錠剤は、前記切れ目に沿って切斷することにより単一の単位用量に変換され得る。いくつかの態様では、錠剤は、液体投与用として水に容易に溶解する。

30

【0141】

治療用化合物は、チュアブルな形態で調製され得る。そのようなチュアブルな形態は、ソフト(例えば、ゼラチン状)又はハードであり得る。チュアブルな形態は、チュアブルなベース(例えば、キシリトール、マンニトール、及びソルビトール)、バインダー(例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、アルファ化でんぶん等)、崩壊剤(例えば、クロスポビドン、スターチグリコール酸ナトリウム、スターチ、例えばトウモロコシスターチ及び乾燥スターチ等、クロスカルメロースナトリウム及びセルロース製品、例えば微結晶セルロース、ミクロファインセルロース等、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース)、潤滑剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、コロイド状二酸化ケイ素等)、甘味料(例えば、糖等の天然の甘味料、及びサッカリンナトリウム又はアスパルテム等の人工甘味料)、着色剤、及び着香料(例えば、天然又は合成であり得る果実フレーバー)を含み得る。上記製剤のいずれも、室温で安定であり得る。上記製剤のいずれも、約4で安定であり得る。

40

【0142】

投与を容易にし、投薬量を均一化するために、投与単位形態で非経口組成物を製剤化するのが特に有利である。投与単位形態とは、本明細書で用いる場合、治療される対象にとって単位投薬量として適する物理的に独立した単位を意味し、各単位は、必要とされる医薬担体と関連して、所望の治療効果を生み出すように計算された事前決定量の治療用化合物を含有する。本発明の投与単位形態に関する仕様は、(a)治療用化合物の固有の特徴及び実現すべき特別な治療効果、並びに(b)選択された患者の状態を治療するためにそのよ

50

うな治療用化合物を配合する技術分野における固有の限界により規定され、またそれらに直接依存する。

【0143】

治療用化合物は、皮膚、眼、又は粘膜に局所的に投与され得る。或いは、肺への局所送達が望ましい場合には、治療用化合物は、吸入により乾燥粉末又はエアゾール製剤の状態で投与され得る。

【0144】

活性化合物は、患者の状態と関連した状態を治療するのに十分な治療上有効な用量で投与される。例えば、化合物の有効性は、ヒトの疾患治療において、その有効性について予測的であり得る動物モデル系、例えば実施例及び図面に示すモデル系等で評価され得る。

10

【0145】

対象に投与される本開示の化合物、又は本開示の化合物を含む組成物の実際の投薬量は、物理的及び生理学的因素、例えば年齢、性別、体重、状態の重症度、治療される疾患の種類、過去又は現在の治療介入、対象の突発性疾患等により、及び投与経路に基づき決定され得る。これらの因子は、当業者により決定され得る。投与に責任を有する医師は、組成物中の有効成分の濃度、及び個々の対象にとって適する用量を一般的に決定する。何らかの合併症が生じた場合には、投薬量は個々の医師により調整され得る。

【0146】

有効量は、一般的に、1日又は数日間、1日1回又は複数回の投与において、約0.001mg/kg～約1000mg/kg、約0.01mg/kg～約750mg/kg、約100mg/kg～約500mg/kg、約1.0mg/kg～約250mg/kg、約10.0mg/kg～約150mg/kgで(もちろん、投与様式及びこれまでに議論した因子に応じて)変化する。その他の適する用量範囲として、1日当たり1mg～10000mg、1日当たり100mg～10000mg、1日当たり500mg～10000mg、及び1日当たり500mg～1000mgが挙げられる。いくつかの特別な実施形態では、量は、1日当たり10,000mg未満、1日当たり750mg～9000mgの範囲である。

20

【0147】

有効量は、1mg/kg/日未満、500mg/kg/日未満、250mg/kg/日未満、100mg/kg/日未満、50mg/kg/日未満、25mg/kg/日未満、又は10mg/kg/日未満であり得る。或いは、1mg/kg/日～200mg/kg/日の範囲であり得る。例えば、糖尿病の患者の治療に関して、単位投薬量は、血液グルコースを未治療の対象と比較して少なくとも40%低下させる量であり得る。別の実施形態では、単位投薬量は、非糖尿病の対象の血液グルコースレベル±10%であるレベルまで、血液グルコースを低下させる量である。

30

【0148】

その他の非限定的な例では、用量は、1回の投与につき、約1μg/kg/体重、約5μg/kg/体重、約10μg/kg/体重、約50μg/kg/体重、約100μg/kg/体重、約200μg/kg/体重、約350μg/kg/体重、約500μg/kg/体重、約1mg/kg/体重、約5mg/kg/体重、約10mg/kg/体重、約50mg/kg/体重、約100mg/kg/体重、約200mg/kg/体重、約350mg/kg/体重、約500mg/kg/体重から約1000mg/kg/体重、又はそれ超、及びその範囲内で推定可能な任意の範囲を含む場合もある。本明細書に列記する数値から推定可能な範囲の非限定的な例では、約5mg/kg/体重～約100mg/kg/体重、約5μg/kg/体重～約500mg/kg/体重等の範囲が、上記数値に基づき投与され得る。

40

【0149】

特定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、例えば少なくとも約0.1%の本開示の化合物を含み得る。その他の実施形態では、本開示の化合物は、例えば単位重量の約2%～約75%、又は約25%～約60%、及びその範囲内で推定可能な任意の範囲を含み得る。

【0150】

薬剤の単回又は多数回投与が検討される。多数回投与を送達するための望ましい時間間隔は、ルーチン実験を超えない実験法を利用して当業者により決定され得る。例えば、対象は、約12時間の間隔で、1日2回用量投与され得る。いくつかの実施形態では、薬剤は1日1回投与される。

50

【0151】

薬剤は、ルーチンスケジュールに基づき投与され得る。本明細書で用いる場合、ルーチンスケジュールとは、事前に決定された指定期間を意味する。ルーチンスケジュールは、スケジュールが事前に決定されている限り、長さが同一又は異なる期間を含んでもよい。例えば、ルーチンスケジュールは、1日2回、毎日、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、1週毎、1ヶ月毎の、又はその間の任意の一連の日数又は週数における投与を含み得る。或いは、事前に決定されたルーチンスケジュールは、最初の週は1日2回、その後数ヶ月間、1日1回等の投与と関係し得る。その他の実施形態では、本発明は、薬剤は経口により摂取してもよく、その時期は食物摂取に依存する又はしないことを規定する。したがって、例えば、薬剤は、対象がいつ食事をしたか又はするかを問わず、毎朝及び/又は毎夕摂取され得る。

10

【0152】

XII. 併用療法

有効な併用療法は、単一の組成物若しくは両方の薬剤を含む薬理学的製剤を用いて、又は一方の組成物は本発明の化合物を含み、他方は第2の薬剤を含む、2つの異なる組成物若しくは製剤を用いて実現し得る。2つの異なる組成物又は製剤を含むいくつかの態様では、他方の薬剤は、例えばDFMOの投与前、それと同時、又はその後に投与され得る。療法は、数分～数ヶ月の範囲の間隔で他方の薬剤治療に先行又は追随し得る。いくつかの態様では、各薬剤が有利に組み合わされた効果をなおも発揮することができるように、それぞれの送達が実施される時期の間で、所定の期間が満了となならないことが保証される。そのような事例では、例えばDFMOと他方の治療薬を、相互に約12～24時間内に、及びより好ましくは、相互に約6～12時間以内に一般的に投与するものと考えられる。いくつかの態様では、治療に要する期間を有意に延長するのが望ましい場合もあるが、但し各投与間の期間は、数日間(2、3、4、5、6、又は7)～数週間(1、2、3、4、5、6、7、又は8)にわたる。

20

【0153】

様々な組み合わせが利用可能であり、例えば、「A」が第1の薬剤(例えば、DFMO)を表し、また「B」が第2の薬剤を表す場合、その非限定的な事例は以下のように記載される：

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
 B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

30

【0154】

ポリアミン経路を調節する薬剤が、本発明の治療と連携して利用可能であると考えられる。例えば、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、ポリアミントランスポーターインヒビター、eIF-5A拮抗薬、化学療法薬、放射線療法、及び免疫調節薬が利用可能である。

【0155】

A. NSAID

NSAIDは、ステロイドではない抗炎症剤である。抗炎症作用に付加して、NSAIDは、鎮痛作用、解熱作用、及び血小板阻害作用を有する。NSAIDは、慢性的な関節炎の状態、並びに疼痛及び炎症と関連した特定の軟組織異常の治療で主に使用される。NSAIDは、アラキドン酸をプロスタグランジンの前駆体である環状エンドペルオキシドに変換するシクロオキシゲナーゼを阻害し、プロスタグランジンの合成をブロックすることにより作用する。プロスタグランジン合成の阻害は、その鎮痛作用、解熱作用、及び血小板阻害作用を説明する；その他の機構はその抗炎症効果に寄与すると考えられる。また、特定のNSAIDは、リポオキシゲナーゼ酵素若しくはホスホリパーゼCも阻害し得る、又はT細胞機能を調節し得る。単独で又は組み合わせて利用可能であるNSAIDの例として、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、フェノプロフェン、ケトプロフェン、フルルビプロフェン、オキサプロジン、インドメタシン、スリンダク、エトドラク、ジクロフェナク、ピロキシカム、メロキシカム、テノキシカム、ドロキシカム、ロルノキシカム、イソキシカム、メフェナム酸、メクロフェナム酸、フルフェナム酸、トルフェナム酸、セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ、パレコキシブ、ルミラコキシブ、及びエトリコキシブが挙げられ

40

50

るが、但しこれらに限定されない。

【0156】

B. ポリアミントランスポーターインヒビター

ポリアミン輸送のインヒビターとして、4-ビス(3-アミノプロピル)-ピペラジン(BAP)、及び米国特許公開第2011/0256161号(例えば、AMXT1501);米国特許公開第2012/0172449号;PCT公開番号国際公開第1999/054283号;米国特許第6,083,496号;及び米国特許第5,456,908号で開示される化合物が挙げられるが、但しこれらに限定されない。

【0157】

C. eIF-5A拮抗薬

ハイブシン(NE-(4-アミノ-2(R)-ヒドロキシブチル)リジン)は、翻訳後修飾により合成されたタンパク質上に形成される特有のアミノ酸である。ハイブシンは、単一のタンパク質、真核細胞翻訳開始因子5A(eIF-5A)で生ずることが知られているに過ぎない。ハイブシンの形成は、eIF-5Aタンパク質上での単一のリシリアルアミノ酸残基の修飾に関する2つの異なる工程により生ずる。このプロセスは、生理活性を有するeIF-5Aの生合成に必要とされる。このプロセスのインヒビターとして、N1-グアニル-1,7-ジアミノヘプタン(GC7)、及びプロテアソームインヒビター(例えば、ボルテゾミブ、ジスルフィラム、エピガロカテキン-3-ガラート、サリノスボラミド、カルフィルゾミブ、ONX 0912、CEP-18770、MLN9708、及びエポキソミシン)が挙げられるが、但し、これらに限定されない。

【0158】

D. 化学療法薬

多種多様な化学療法薬が、本発明に基づき利用可能である。用語「化学療法」とは、がんを治療するために薬物を使用することを意味する。「化学療法薬」は、がんの治療で投与される化合物又は組成物を表すのに用いられる。このような薬剤又は薬物は、その細胞内での作動機序、例えば該薬剤又は薬物が細胞周期に影響を及ぼすかどうか、またどの段階で及ぼすかにより分類される。或いは、薬剤は、DNAを直接架橋する、DNAにインターラートする、又は核酸合成に影響を及ぼすことにより染色体異常及び有糸分裂異常を誘発するその能力に基づき特徴づけられ得る。

【0159】

化学療法薬の例として、アルキル化剤、例えばチオテパ及びシクロホスファミド等;スルホン酸アルキル、例えばブスルファン、インプロスルファン、及びピポスルファン等;アジリジン、例えばベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)等;アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、並びにトリメチロロメラミンを含むエチレンイミン及びメチラメラミン(methylalamine);アセトゲニン(特にプラタシン及びプラタシノン(bullatacinone));カンプトテシン(合成類似体トポテカンを含む);ブリオスタチン;カリスタチン(Callystatin);CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼルシン、及びビセレシン合成類似体を含む);クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8);ドラスタチン;デュオカルマイシン(合成類似体KW-2189及びCB1-TM1を含む);エリュテロビン;パンクラチスタチン;サルコジクチイン(sarcodictyin);スpongistatin);ナイトロジエンマスターード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミン酸化物の塩酸塩、メルファラン、ノブエンビキン、フェネステリン、プレドニマスチン、トロホスファミド、及びウラシルマスターード等;ニトロソウレア、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムスチン等;抗生物質、例えばエンジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシン II 及びカリケアマイシン II)等;ジネマイシン(dynemicin)Aを含むジネマイシン;ビスホスホネート、例えばクロドロネート等;エスペラミシン;並びにネオカルジノスタチンクロモフォア及び関連する色素タンパク質であるエンジイン抗生物質クロモフォア、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン(carabacin)、カルミノマイシン、カルジノ

10

20

30

40

50

フィリン、クロモマイシニス(chromomycinis)、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン(モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ(cyanomorpholino)-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシン、及びデオキシドキソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン(esorubicin)、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトイマイシン、例えばマイトイマイシンC等、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピュロマイシン、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodoxorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、及びゾルビシン;代謝抵抗物質、例えば、メトトレキサート及び5-フルオロウラシル(5-FU)等;葉酸類似体、例えばデノブテリン、ブテロブテリン、及びトリメトレキサート等;プリン類似体、例えばフルダラビン、6-メルカブトプリン、チアミプリン、及びチオグアニン等;ピリミジン類似体、例えばアンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、及びフロクスウリジン等;アンドロゲン、例えばカルステロン、ドロモスターロンプロピオネート、エピチオスタノール、メピチオスタン、及びテストラクトン等;抗副腎剤(anti-adrenals)、例えばミトタン及びトリロスタン等;葉酸補充剤(folic acid replenisher)、例えばフロリン酸(frolinic acid)等;アセグラトン;アルドホスファミドグリコシド;アミノレブリン酸;エニルウラシル;アムサクリン;ベストラブシル;ビスマントレン;エダトラキセート(edatraxate);デフォファミン(defofamine);デメコルチチ;ジアジクオン;エルフォルミチニン(elformithine);酢酸エリプチニウム;エポチロン;エトグルシド;硝酸ガリウム;ヒドロキシウレア;レンチナン;ロニダイニン(lonidainine);マイタンシノイド、例えばマイタンシン及びアンサミトシン等;ミトグアゾン;ミトキサントロン;モピダンモール(mopidanmol);ニトラエリン(nitraerine);ペントスタチン;フェナメット;ピラルビシン;ロソキサントロン;ポドフィリン酸;2-エチルヒドラジド;プロカルバジン;PSK多糖類複合体;ラゾキサン;リゾキシン;シゾフィラン;スピロゲルマニウム;テヌアゾン酸;トリアジコン;2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン;トリコテシン(特にT-2毒素、ベラクリン(verraccrin)A、ロリジンA及びアンギイジン);ウレタン;ビンデシン;ダカルバジン;マンノムスチン;ミトブロニトール;ミトラクトール;ピポブロマン;ガシトシン(gacytosome);アラビノシド('Ara-C');シクロホスファミド;タキソイド、例えばパクリタキセル及びドセタキセル、ゲムシタビン;6-チオグアニン;メルカブトプリン;白金配位錯体、例えばシスプラチニン、オキサリプラチニン、及びカルボプラチニン等;ビンプラスチニン;白金;エトボシド(VP-16);イホスファミド;ミトキサントロン;ビンクリスチニン;ビノレルビン;ノバントロン;テニポシド;エダトレキサート;ダウノマイシン;アミノブテリン;ゼローダ;イバンドロネート;イリノテカン(例えば、CPT-11);トポイソメラーゼインヒビター-RFS 2000;ジフルオロメチルオルニチニン(DMFO);レチノイド、例えばレチノイン酸等;カペシタビン;カルボプラチニン、プロカルバジン、プリコマイシン(plicomycin)、ゲムシタビエン(gemcitabien)、ナベルビン、ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼインヒビター、PI3Kインヒビター(例えば、ペリホシン、イデラリシブ、PX-866、IPI-145、BAY80-6946、BEZ235、RP6530、TGR1202、SF1126、INK1117、GDC-0941 BKM120、XL147(SAR245408としても知られている)、XL765(SAR245409としても知られている)、パロミド(palomid) 529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、CDC-907、AEZS-136)、オーロラキナーゼインヒビター(例えば、ZM447439、ヘスペラジン(Hesperadin)、VX-680、及び米国特許第8815872号及び国際公開第2012/135641号で開示されたもの)、トランスプラチナ(transplatin)、及び任意の上記物質の薬学的に許容される塩、酸、又は誘導体が挙げられる。

【0160】

E. 免疫調節薬

当業者は、本発明の方法と組み合わせて、又は連携して更なる免疫療法が利用可能であるものと理解する。がん治療の文脈において、免疫療法薬は、がん細胞を標的とし破壊する免疫エフェクター細胞及び分子の使用に一般的に立脚する。リツキシマブ(リツキサン(

10

20

30

40

50

Rituxan)(登録商標))は、そのような例である。免疫エフェクターは、例えば腫瘍細胞表面上のいくつかのマーカーに対して特異的な抗体であり得る。抗体単独では、治療エフェクターとして機能し得る、又は細胞殺傷に対して実際に影響を及ぼすその他の細胞を導入し得る。また抗体は、薬物又は毒素(化学療法薬、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素等)に結合させることができ、また単に標的薬剤として働く。或いは、エフェクターは、腫瘍細胞の標的と直接又は間接的に相互作用する表面分子(例えば、抗GD2キメラ抗原受容体)を担持するリンパ球であり得る。例えば米国特許公開第2014/0004132号を参照。様々なエフェクター細胞には、細胞傷害性T細胞及びNK細胞が含まれる。

【0161】

免疫療法の1つの態様では、腫瘍細胞は、標的となりやすい、すなわち大部分のその他の細胞上には存在しないいくつかのマーカーを担持しなければならない。多くの腫瘍マーカーが存在し、これらのいずれも、本発明の文脈における標的化に適する可能性がある。一般的な腫瘍マーカーとして、GD2、CD20、癌胎児抗原、チロシナーゼ(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、Sialyl Lewis抗原、MucA、MucB、PLAP、ラミニン受容体、erb B、及びp155が挙げられる。免疫療法の代替的態様として、抗がん効果を免疫刺激効果と組み合わせることが挙げられる。免疫刺激分子も、サイトカイン、例えばIL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、-IFN等、ケモカイン、例えばMIP-1、MCP-1、IL-8等、及び増殖因子、例えばFLT3リガンド等を含め存在する。

【0162】

現在研究中又は使用中の免疫療法の例として、免疫アジュバント、例えばウシ型結核菌(Mycobacterium bovis)、熱帯熱マラリア原虫(plasmodium falciparum)、ジニトロクロロベンゼン、及び芳香族化合物(米国特許第5,801,005号、及び同第5,739,169号;Hui及びHashimoto、1998年;Christodoulidesら、1998年);サイトカイン療法、例えばインターフェロン、IL-1、IL-2、GM-CSF、及びTNF(Bukowskiら、1998年;Davidsonら、1998年;He Ilstrandら、1998年);遺伝子療法、例えばTNF、IL-1、IL-2、及びp53(Qinら、1998年;米国特許第5,830,880号及び同第5,846,945号);及びモノクロナル抗体、例えば抗CD20、抗ガングリオシドGM2、抗GD2[例えば、Ch14.18](Yuら、2010年;米国特許出願公開第20130216528号及び同第20140170155号;PCT出願公開国際公開第2014144763号;米国特許第6,451,995号、同第8,507,657号及び同第8,278,065号)、及び抗p185(Hollander、2012年;Hanibuchiら、1998年;米国特許第5,824,311号)が挙げられる。1つ又は複数の抗がん療法が、本明細書に記載する抗体療法と共に採用され得ると考えられる。

【0163】

F. 放射線療法

DNA損傷を引き起こし、また広範に用いられるその他の因子として、腫瘍細胞に対する線、X線、及び/又は放射性同位体の標的送達として一般的に知られているものが挙げられる。DNA損傷因子のその他の形態として、例えばマイクロ波、陽子線照射(米国特許第5,760,395号及び同第4,870,287号)、及びUV照射等も考えられる。これらすべての因子が、DNA、DNA前駆体、DNAの複製及び修復、並びに染色体の形成及び維持に対して広範囲の障害をもたらす可能性は極めて高い。X線の線量範囲は、長期の場合(3~4週間)の日線量50~200レントゲンから、単回線量の2000~6000レントゲンの範囲である。放射性同位体の線量範囲は幅広く変化し、並びに同位体の半減期、放射される放射線の強度と種類、及び新生細胞による取り込みに依存する。

【0164】

G. 手術

がんを有する約60%のヒトが、予防、診断、又はステージング手術、根治手術、及び緩和手術を含むいくつかのタイプの手術を受ける。根治手術は、がん組織の全部又は一部が物理的に除去、摘出、及び/又は破壊される切除を含み、その他の療法、例えば本発明の治療法、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法、及び/又は代替療法等と連携して利用可能である。腫瘍切除は、腫瘍の少なくとも一部分の物理的除去を意味する。腫瘍切除に加えて、手術による治療には、レーザー手術、冷凍手術、電気手術

10

20

30

40

50

、及び顕微鏡下手術(モース術)が含まれる。

【0165】

がん性の細胞、組織、又は腫瘍の一部又は全部を摘出すると、身体内にキャビティが形成され得る。治療は、更なる抗がん療法による該部位への灌流、直接注入、又は局所適用により成就し得る。そのような治療は、例えば1、2、3、4、5、6、又は7日毎に、又は1、2、3、4、及び5週間毎に、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、若しくは12ヶ月毎に反復され得る。このような治療は、更に投薬量が異なる場合もある。

【0166】

H. その他の薬剤

その他の薬剤が、治療の治療効果を改善するために本発明の特定の態様と組み合わせて利用可能であると考えられる。更なるこのような薬剤として、細胞表面受容体及びGAPジャンクションの上方制御に影響を及ぼす薬剤、細胞増殖抑制剤及び分化剤、細胞接着のインヒビター、アポトーシス誘導物質に対する過剰増殖性細胞の感受性を高める薬剤、又はその他の生物学的薬剤が挙げられる。GAPジャンクションの数を増加させることにより細胞間シグナリングが増加すると、隣接した過剰増殖細胞集団に対する抗過剰増殖効果が高まる。その他の実施形態では、細胞増殖抑制剤又は分化剤は、治療の抗過剰増殖的有効性を改善するために、本発明の特定の態様と組み合わせて利用可能である。細胞接着のインヒビターは、本発明の有効性を改善するものと考えられる。細胞接着インヒビターの例として、局所接着キナーゼ(FAK)インヒビター及びロバスタチンが挙げられる。アポトーシスに対する過剰増殖細胞の感受性を高めるその他の薬剤、例えば抗体c225等は、治療の有効性を改善するために、本発明の特定の態様と組み合わせて利用可能であると更に考えられる。

10

20

30

40

50

【0167】

XIII. 定義

特許請求の範囲で使用する場合、単語「を含む(comprising)」と組み合わせて使用する際には、単語「a」又は「an」は、1つ又は2つ以上を意味し得る。

【0168】

特許請求の範囲で用語「or」を使用する場合、それは、代替的な一方のみを意味するように別途明確に示唆しない限り、又は代替的な一方が他方と相互に排他的でない限り、「及び/又は」意味するように用いられるが、但し、本開示が支持する定義は、代替的な一方のみと「及び/又は」とを意味する。本明細書で用いる場合、「別の(another)」は、少なくとも第2番目又はそれ以降を意味し得る。

【0169】

本出願全体を通じて、数値には、数値を決定するために採用されたデバイス、方法に関する固有の誤差変動、又は試験対象間に存在する変動が含まれることを示唆するのに、用語「約(about)」が用いられる。

【0170】

用語「を含む(comprise)」、「を有する(have)」、及び「を含む(include)」は、非制限的な連結動詞である。これらの動詞の1つ又は複数の任意の形態又は時制、例えば「を含む(comprises)」、「を含む(comprising)」、「を有する(has)」、「を有する(having)」、「を含む.includes)」、及び「を含む(including)」も非制限的である。例えば、1つ又は複数の工程「を含む(comprises)」、「を有する(has)」、又は「を含む.includes)」任意の方法は、そのような1つ又は複数の工程のみを有するように限定されず、列挙されないその他の工程も含む。

【0171】

本明細書で用いる場合、所定の成分に関して「実質的に有さない(essentially free)」とは、所定の成分が組成物に意図的に配合されない、及び/又は汚染物質としてのみ若しくは痕跡量で存在することを意味するために、本明細書では使用される。組成物の何らかの意図しない汚染に起因する所定の成分の総量は、したがって0.05%より十分低く、好ましくは0.01%未満である。所定の成分の量が、標準分析法により検出可能でない組成物が

最も好ましい。

【0172】

用語「有効(effective)」は、それが本明細書及び/又は特許請求の範囲で用いられる場合、所望の、期待される、又は意図するような結果を実現するのに適切であることを意味する。

【0173】

本明細書で用いる場合、用語「IC₅₀」は、最大応答の50%が得られる抑制量を意味する。

【0174】

本明細書で用いる場合、用語「患者」又は「対象」は、生きている哺乳類生物体、例えばヒト、サル、ウシ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット等、又はその遺伝子導入種を意味する。特定の実施形態では、患者又は対象は、靈長類である。ヒト対象の非限定的な例は、成人、若年、幼児、及び胎児である。

10

【0175】

「薬学的に許容される」とは、一般的に安全で、無毒性であり、そして生物学的にもまたそれ以外でも望ましくないとは言えない医薬組成物を調製するのに有用であることを意味し、そして獣医学用途並びにヒト医薬品用途において許容されることを含む。

【0176】

「予防(prevention)」又は「を予防する(preventing)」には、(1)疾患のリスクを有する及び/若しくは疾患に罹りやすいがまだ経験していない、又は疾患の病理学若しくは症候学のいずれか若しくは全部を呈すると考えられる対象又は患者の疾患の発現を阻害する工程、並びに/或いは(2)疾患のリスクを有する及び/若しくは疾患に罹りやすいがまだ経験していない、又は疾患の病理学若しくは症候学のいずれか若しくは全部を呈すると考えられる対象又は患者の疾患の病理学若しくは症候学の発現を遅延させる工程が含まれる。

20

【0177】

「有効量」、「治療上有効な量」、又は「薬学的に有効な量」とは、対象又は患者に疾患を治療する目的で投与したときに、該疾患に対してそのような治療を有効とするのに十分な量を意味する。

【0178】

「治療」又は「を治療する」には、(1)疾患の病理学若しくは症候学を経験する又は呈する対象又は患者の疾患を阻害する工程(例えば、病理学及び/若しくは症候学の更なる発現を阻止する工程)、(2)疾患の病理学若しくは症候学を経験する又は呈する対象又は患者の疾患を改善する(例えば、病理学及び/若しくは症候学を反転させる)、及び/或いは(3)疾患の病理学若しくは症候学を経験する又は呈する対象又は患者の疾患において、何らかの測定可能な低下を実現する工程が含まれる。

30

【0179】

本明細書において参照により組み込まれる参考資料のいずれかに記載される定義と何らかの矛盾が認められる場合、上記定義はそれに優先する。しかしながら、特定の用語が定義されることによって、未定義の任意の用語は不確かであるということが示唆されるとみなすべきでない。むしろ、用いられるすべての用語は、同業者にとって範囲の認識が可能であり、また本発明の実施が可能であるような観点から本発明を記載するものと考えられる。

40

【実施例】

【0180】

XIV. 実施例

下記の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すために記載される。当業者により認識されるべき事項として、以下に記載する実施例に開示する技法は、本発明の実践において十分に機能するように、本発明者により発見された技法を代表し、したがってその実践にとって好ましいモードを構成するとみなすことができる事が挙げられる。但し、当業者は、本開示に照らし、開示される特定の実施形態において、多くの変更を加えることが

50

でき、また変更しても、本発明の精神及び範囲から逸脱せずに同様の又は類似した結果をなおも取得することができるることを認識すべきである。

【0181】

患者及び方法

患者の適格性。患者は、2010年3月～2012年10月の神経芽細胞腫及び髓芽細胞腫トランスレーショナルリサーチコンソーシアム(NMTRC) 002試験に参加した。当試験は、Vermont 小児病院の対象7例、Helen DeVos 小児病院の対象8例、Arnold Palmer 小児病院の対象4例、Levine 小児病院の対象1例、及びオレンジ・カウンティ子供病院の対象1例を含む、非盲検、多施設、フェーズI用量漸増試験であった。当試験に対する適格性を有するには、対象は下記の基準を満たさなければならなかった:(a)診断時の年齢0～21歳;(b)初回診断又はNB再発のいずれかの時点において組織学的に確認されている;(c)疾患状態が難治性又は再発性NBとして確認されている;(d)測定可能な腫瘍(CT又はMRIにより>10mm)、MIBG陽性、及び尿中カテコールアミンレベルの異常又は骨髄生検/穿刺陽性に基づき疾患が測定可能;(e)疾患状態について既知の治癒的療法が存在しない;(f)妊娠する可能性のある(月経開始又は13歳)女性対象について尿妊娠試験陰性;及び(g)AST及びALT<10×正常値により定義されるように肝機能が適切である。除外基準は、平均余命<2ヶ月、Lanskyスコア<30%、又は別の被験薬若しくは抗がん剤の投与を同時に受けた対象。対象は、それまでの化学療法の効果(血液学的效果及び骨髄抑制効果)から十分に回復していなければならなかった。対象が管理されない感染症を有した場合には、感染が管理されるまで対象を除外した。試験の安全性モニタリング要件を順守できなかった対象も除外した。このトライアルは、欧米の治験審査委員会、並びに各登録地域の現地治験審査委員会より承認を受けた。患者又はその保護者からのインフォームドコンセント、及び同意を、試験登録前に適宜取得した。ClinicalTrials.gov識別番号:NCT01059071。

【0182】

患者の特徴。難治性又は再発性のNBを有する対象21例が、2010年3月～2012年10月の期間に当試験に参加した。対象の特徴をTable 2(表2)に示す。各対象は、その疾患について標準的な治療をこれまでに受け、そして再発した、又は療法に対して難治性であった。メジアン年齢は9歳で、1～17歳の範囲であった。

【0183】

10

20

【表2】

Table 2.NMTRC 002に登録した患者の特徴(ClinicalTrials.gov識別番号:NCT01059071)

登録	N
合計登録者数	21
投薬を受けた合計数	21
評価可能性	N (%)
有効性評価可能	18 (86)
安全性評価可能	21 (100)
年齢	歳
平均	8.75
メジアン	9
性別	N (%)
男性	14 (67)
女性	7 (33)
人種	N (%)
白人	14 (67)
ヒスパニック系	3 (14)
黒人又はアフリカ系アメリカ人	2 (9.5)
2つ以上の民族性又は不明	2 (9.5)

10

20

30

40

50

【0184】

治験デザイン及び治療。NMTRC 002治験デザインを図3に示す。このトライアルは、標準3+3フェーズI用量漸増デザインであった。安全性に配慮して、2サイクルのプロトコール終了前に、患者が非薬物関連の理由でトライアルを取りやめた場合には、患者の入れ替えを許可した。臨床応答を示した患者は、疾患進行が生ずるまで、又は医師及び親の双方が決定を下すまで治療継続を許可された。対象は、4つの漸増用量のうちの1つに参加した。評価可能な対象3例が500mg/m² BIDに、評価可能な対象3例が750mg/m² BID、評価可能な対象3例が1000mg/m² BIDに、及び評価可能な対象6例が1500 mg/m² BIDに参加した。対象21例が、少なくとも1つの用量で、単一薬剤としてDFMOの投与を受け、そして安全性について評価可能であった。その対象のうち18例が、サイクル1を完了し、有効性について評価可能であった。対象15例が、少なくともDFMOの最初の2サイクル(単独及びエトポシド併用)を完了し、また用量制限毒性について評価可能な母集団を含む。有効性について評価可能であった対象18例のうち、対象2例が1サイクルを完了し、対象7例が3サイクルを完了し、対象2例が5サイクルを完了し、対象1例が7サイクルを完了し(サイクル6~7、DFMO単独)、対象1例が10サイクルを完了し、対象1例が12サイクルを完了し(サイクル7~12、DFMO単独)、対象1例が15サイクルを完了し(サイクル6~15、DFMO単独)、対象2例が17サイクルを完了し(対象1例につき、サイクル6~17、DFMO単独)、対象1例が試験において43サイクルを完了した(サイクル7~43、DFMO単独)。

【0185】

薬物処方及び投与。対象は、経口により投与される単一薬剤のDFMOの投与を、最初の21日サイクルの第1日目~21日目に受けた。DFMOは、投与前にジュース又は水に溶解した粉末として供給された。開始用量は、500mg/m² PO BID(投与レベル1)であった。用量漸増は、標準的な3+3デザインで実施され、その場合、連続する3対象コホートにおいて、用量を約20%~25%ずつ増加させた。次のコホートの登録は、データ及び安全性モニタリング委員会のレビューに従い、それ以前のコホート全体が用量制限毒性(DLT)を一切認めずに治療のサイクル1(単一薬剤)及び2(併用)の両方を完了した後に行われた。単一薬剤のDFMOによる最初のサイクルの後に、サイクル1期間中に安全で忍容性有りとして立証された用量でBID DFMOの投与を継続して受けた対象は、50mg/m²/用量(最も近傍の50mgに四捨五入した)1

日1回で、サイクル2~5の最初の14日間、経口エトポシドの投与も受けた。DFMOの最終コホートは、確認コホートとして更なる3つの登録を受け入れ、したがって対象6例が1500mg/m² BIDの用量でDFMOの投与を受けた。

【0186】

患者の安全性及び治療応答評価。治療関連の毒性に関する週間モニタリングには、身体検査、バイタルサイン(体温、脈拍数、及び座位血圧)、CBC、AST/ALT、LDH、ビリルビン、電解質、BUN、クレアチニン、併用薬のレビュー及び記録、及び合併症のレビューを伴うAEのモニタリングが含まれた。更に、Lansky又はECOGスコア及び尿中カテコールアミンを、各21日サイクルの前に測定した。サイクル1、3、及び5終了時にオーディオグラムを実施した。骨髄転移を認めない対象は、化学療法開始前に、ANC>500/μL及び血小板>50,000/μLにより定義されるように、適切な骨髄機能を有する必要があった。臨床上及び検査上の有害事象を、有害事象(CTCAE)バージョン3.0に関するNCI一般用語基準に基づき等級化した。

10

【0187】

腫瘍及び臨床応答を、二次エンドポイントとしてモニタリングした。対象18例を、有効性について評価した。当試験では、小児用に修正された、NCIによる固体腫瘍における応答評価基準測定(27)(RECIST:Response Evaluation Criteria measurements in Solid Tumor)、並びにMIBG又はPET及び骨髄応答を用いた。腫瘍の評価/画像診断試験を、療法前>7日のベースライン、及び試験療法開始から<21日において取得した。これらを、最初のサイクルの終了時、及び別の各サイクルの後に再度反復した。

20

【0188】

薬物動態(PK)分析法及びサンプル収集。患者は、すべての薬物動態サンプリング及び分析について同意した。inVentiv Health Clinique社(Quebec、カナダ)との契約に基づき、医薬品安全性試験実施基準(GLP)を順守して、DFMO分析法を実施した。要するに、アナライトのDFMO及びその内部標準を、ヒト血清の一定分量0.025mLから抽出した。抽出したサンプルを、Atlantis Hiliic Silica、50×4.6mm、3μmカラムを備えた液体クロマトグラフ内に注入した。移動相Aは、Milli-Qタイプの水とアセトニトリル及び酢酸アンモニウムとの混合物であった。このアッセイの妥当性を確認された較正範囲は、50~100,000ng/mLであった。サイクル1(DFMO単独)及び2(DFMO+エトポシド)期間中、朝の経口DFMOを1用量服用する直前、並びに薬剤投与後0.5、1、3、及び6時間において、患者から血液を採取した。これらの血液サンプルから得た血清中のDFMOレベルを次に評価した。このトライアルは、外来患者を基準に実施され、また患者にとって過度の負荷となると判断されたので、投与後6時間を超えて血液収集は行われなかった。

30

【0189】

ODC遺伝子型。患者は、NMTRC 002で遺伝子解析を行うことに同意した。EpigenDx社(epigendx.com)との契約に基づき、パイロシークエンシング法により、血液サンプルからODC rs2302615及びrs2302616遺伝子型を決定した。

【0190】

尿中ポリアミンレベル。患者は、NMTRC 002で尿分析を行うことに同意した。スポット尿(当日の最初のボイド)をサイクル1(DFMO単独)の1、8、及び15日目に収集し、そしてポリアミンレベルの分析まで-80℃で凍結した。少なくとも1つの遊離した一级アミンを含むポリアミンを、これまでの記載に従い(Thompsonら、2010年)、逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて定量化した。尿中N¹,N¹²-ジアセチルスペルミン(N¹,N¹²-Ac₂Spm又はDAS)を、DAS試薬キット(Alfresa Pharma Co.社、大阪、日本)を用いて、製造業者の指示に基づき測定した。該アッセイ法は、DAS模倣体としてのウシ血清アルブミン-アセチルスペルミンコンジュゲートと、金コロイド抗体複合体との間の特異的結合と関係し、それはこれまでに記載されている(Kawakitaら、2011年)。

40

【0191】

統計的手法。薬物動態パラメーターC_{max}、t_{max}、及びAUC_{0~6}を、各投与レベルにおいて観察されたすべての値について平均値と標準偏差として提示し、そしてSAS(ver.9.2)を

50

用いて分析した。尿中ポリアミンレベルは、個々のサンプルの二重測定に由來した。ベースラインにおける尿中ポリアミン含有量、又はDFMO療法から1週間後のベースラインからの尿中ポリアミン含有量の変化、無増悪性の生存(PFS)と、ODC遺伝子型との間の関連性に関する有意性を、スチュードントのt検定(Excel(登録商標))を用いて評価した。尿中ポリアミンレベルの増加は疾患進行と関連した、という可能性を評価するのに、フィッシャーの直接確率検定を用いた。個々の尿中ポリアミンの含有量変化を評価するのに、反復測定分散分析のためのフリードマンの検定を用いた。

【0192】

(実施例1)

経口DFMO及びエトポシドの安全性

フェーズI臨床トライアルの第一の目的は、難治性又は再発性のNBを有する小児患者を対象として、ODCインヒビターである -ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)単独で、及び細胞毒性化学療法薬と併用して投与したときの安全性について試験することであった。この患者群において有効性がすでに報告されており(Kushnerら、2013年)、またいくつかの細胞モデルにおいてDFMOとの相乗効果が認められるので(Dorrら、1986年)、エトポシドを併用薬として選択した。第二の目的は、ODCと関連した活性、薬物動態、並びに遺伝的因子及び代謝的因子を調査することであった。

【0193】

用量制限性の毒性(DLT)又は薬物関連の重篤な有害事象(SAE)は、この試験では認められなかった。全サイクル期間中認められた試験に関連する(おそらくは、ほぼ、及び確実に関連する)毒性をTable 3(表3)にまとめる。DFMO単独と関連する毒性は、貧血症(N=3)、ANC減少(N=2)、血小板数減少(N=2)、ALT増加(N=1)、AST増加(N=1)、無食欲(N=1)、便秘(N=1)、下痢(N=1)、感染症(結膜炎)(N=1)、低アルブミン血症(N=1)、低リン酸血症(N=1)、GGT増加(N=1)、睡眠障害(N=1)、尿閉(N=1)、及び嘔吐(N=1)から構成された。対象6例が、1500mg/m² BIDの用量に参加したが、DLTは認められなかった。したがって、フェーズII評価において推奨されるDFMOの用量は、1500mg/m² BIDである。最大耐用量(MTD)は、本試験では立証されなかった。

【0194】

10

20

【表3A】

Table 3. 安全性試験データ:経口DFMO及びエトボシドの毒性

	サイクル1における毒性効果の最高グレード (N=21)					サイクル2～43における毒性効果の最高グレード (N=17)			
	グレード2	グレード3	グレード4	グレード5		グレード2	グレード3	グレード4	グレード5
生物学的毒性効果									
貧血症	2 (10%)	0	1 (5%)	0		4 (24%)	1 (6%)	0	0
好中球減少	1 (5%)	1 (5%)	0	0	3 (18%)	2 (12%)	2 (12%)	0	
血小板減少	1 (5%)	1 (5%)	0	0	0	0	1 (6%)	0	
白血球減少	0	0	0	0	0	0	1 (6%)	0	
非生物学的毒性効果									
ALT上昇	1 (5%)	0	0	0	1 (6%)	0	0	0	
無食欲	0	1 (5%)	0	0	0	0	0	0	
AST上昇	0	1 (5%)	0	0	1 (6%)	1 (6%)	0	0	
結膜炎	1 (5%)	0	0	0	0	0	0	0	
便秘	1 (5%)	0	0	0	1 (6%)	0	0	0	
下痢	1 (5%)	0	0	0	0	0	0	0	
GGT上昇	1 (5%)	0	0	0	0	0	0	0	
低アルブミン血症	1 (5%)	0	0	0	0	0	0	0	
低リン酸血症	1 (5%)	0	0	0	0	0	0	0	
副鼻腔炎	0	0	0	0	1 (6%)	0	0	0	
歯痛	0	0	0	0	1 (6%)	0	0	0	
吐き気	0	0	0	0	1 (6%)	0	0	0	
神経症	0	0	0	0	1 (6%)	0	0	0	
疼痛	0	0	0	0	1 (6%)	0	0	0	

【表3B】

発疹	0	0	0	0	1(6%)	0	0	0
睡眠障害	1(5%)	0	0	0	0	0	0	0
尿閉	1(5%)	0	0	0	0	0	0	0
嘔吐	1(5%)	0	0	0	0	0	0	0

割合(%)は、事象が認められた患者数を薬物投与群内の患者数で割り算して求めた。ALT=アラニンアミノトランスフェラーゼ;AST=アスペラギン酸アミノトランスフェラーゼ;GGT=γ-グルタミルトランスペプチダーゼ。

【0196】

(実施例2)

10

20

30

40

50

NBを有する小児におけるDFMOの薬物動態

DFMO血清測定を患者全21例について実施した。最初のサイクルの1日目及び8日目に実施された薬剤投与の前、並びに投与後0.5、1、3、及び6時間の時点で再度、サンプルを患者から収集した。サイクル2期間中に、より高用量群(750、1000、1500mg/m²)内の選択された患者からも、DFMO血清サンプルを収集した。図4は、750mg/m²の投与を受けた全患者の血清DFMO濃度(平均値とsd)を示す(平均値±標準偏差)。21日サイクルの全体にわたり、DFMO用量を1日2回経口投与した。後続サイクルは、前回サイクルの最終日の翌日に開始した。用量に対する最大DFMO濃度をTable 4(表4)に報告する。全体的な平均血清DFMOの濃度範囲は、500mg/m²の投与を受けた患者の9.54 μg/mL(52.24 μ)から、1500mg/m²の投与を受けた患者の30.71 μg/mL(168.10 μM)であった。平均t_{max}は、すべての投与群で2.50~3.75時間の間に生じた。平均AUC_{0~6時間}の範囲は、500mg/m²における39時間 - μg/mLから、1500mg/m²投与群における121時間 - μg/mLであった。測定された最高単一血清濃度は、最高投与群内の患者1例で認められたサイクル1期間中の78.53g/mLであった。この対象の血清レベルは、この投与群内のその他の対象と比較して、それ以外目立たなかった。図4及びTable 4(表4)からわかるように、おそらくはサンプリング時刻に対する投薬時刻、及び成人では2~4時間であるDFMOの排泄半減期(Carboneら、2000年)に対するサンプリングの全体的な時間に生じた差異と関連して、患者間でDFMO PKパラメーターに有意な変動が認められた。但し、平均C_{max}及びAUCは、投与された経口用量に比例して直線的に増加し、また平均t_{max}は投与群全体を通じて一貫した。

【0197】

この研究におけるPK所見より、小児を対象としてDFMOを投与すると、等価経口用量について濃度範囲が重複することから、血清DFMO濃度は成人試験で報告された該濃度と非常に類似することが示唆される(Pendyalaら、1993年;Carboneら、2000年)。NB患者に認められたT_{max}値も、成人で報告された数値に匹敵した(Carboneら、2000年)。臨床的ベネフィットが本試験の患者数例に認められたという所見は、成人がん予防試験のこれらの濃度において報告されたDFMOの有効性と共に、生物学的に有効なDFMO用量は50~150 μ の範囲内であることを示唆する。この範囲のDFMO用量は、NB細胞を殺傷しないことから(Samaiら、2013年)、DFMO作用の別の機構が示唆される。最近記載された1つの非細胞毒性機構として、DNA合成に関与する代謝物の抑制が挙げられる(Witherspoonら、2013年)。その他の非細胞毒性機構は、炎症(Babbarら、2007年)、及び/又は免疫応答(Soda、2011年)と関係し得る。

【0198】

【表4】

Table 4.用量レベル別DFMO薬物動態パラメーター(平均値±SD)

PO BID用量 (mg/m ²)	サイクル	C _{max} (μg/mL) 平均値±SD	t _{max} 時間	AUC _{0~6時間} (μg/mL)×時間
500	1	9.54±5.36	3.75±1.39	39.90±24.16
750	1	11.93±5.22	3.60±1.26	47.36±18.57
	2	14.23±7.92	2.60±0.89	62.84±39.47
1000	1	14.71±9.07	3.17±1.60	60.05±34.53
	2	14.33±6.18	3.00±0.00	50.18±32.57
1500	1	28.99±14.96	2.88±1.45	108.38±53.23
	2	30.71±8.18	2.50±0.90	120.69±31.22

【0199】

(実施例3)

ポリアミン代謝の遺伝的及び代謝的マーカー並びにDFMO効果の薬力学的(PD)指標に関する根拠

10

20

30

40

50

図1は、ポリアミン代謝経路を表し、ODCの発現に影響を及ぼすODC遺伝子型(rs2302615及びrs2302616)間の関連性、及びODC遺伝子型と尿中ポリアミンとの関連性に注目している。図は、ブトレシン、モノアセチルスペルミジン、及びジアセチルスペルミン(DAS)を含む、但しスペルミジン又はスペルミンを除くジアミン及びアセチルポリアミンエクスポーターについて基質の関係を示す(Xieら、1997年;Uemuraら、2008年;Uemuraら、2010年)。ポリアミンの排出はポリアミンホメオスタシス制御の1つの成分として公知であるので、これらの排出されたアミンのレベルは、組織におけるODC発現変化を反映するものと期待され得る(Gerner及びMeyskens、2004年)。

【0200】

各患者から最初の朝に得たボイドスポット尿を、ポリアミンについて、「方法」に記載するように評価した。Table 5(表5)は、ブトレシン、スペルミジン、スペルミン、及びスペルミジン及びスペルミンのアセチル誘導体を含む、ポリアミン経路内の7つの代謝物について、ベースラインにおける(サイクル1、第1日目)データ(平均値±SD)を示す。この表ではランク順に記載されており、ベースラインにおいてこれらの患者の尿中で、N⁸AcSpdが最も広く認められたアミンであり、その後にN¹AcSpd、ブトレシン、DAS、スペルミン、N¹-アセチルスペルミン(N¹AcSpm)、及びスペルミジンが続いた。各代謝物について標準偏差が大きいことから明らかなように、数値は代謝物毎に有意に異なった。

【0201】

【表5】

10

Table 5.ベースライン及びDFMO療法の最初の2週間における、患者の尿中ポリアミン代謝物

20

ポリアミン	C1D1平均値 (N=19)	標準偏差	C1D1からC1D8 における減少に関するP値 (N=19)*	C1D1からC1D15 における減少に関するP値 (N=16)*
N ⁸ AcSpd	4.72	3.18	NS**	BS
N ¹ AcSpd	3.96	3.18	0.018	0.005
ブトレシン	1.93	7.02	NS	NS
N ¹ N ¹² Ac ₂ Spm	0.80	0.62	NS	NS
スペルミン	0.55	1.71	NS	NS
N ¹ AcSpm	0.33	0.74	NS	NS
スペルミジン	0.26	0.25	NS	NS

30

C1D1=サイクル1の第1日目(すなわちベースライン);C1D8=第1日目にDFMOを開始した後のサイクル1の第8日目;C1D15=第1日目にDFMOを開始した後のサイクル1の第15日目;*フリー ドマンの二元配置分散分析により判定;**有意ではない。

【0202】

これらのベースライン値が治療により影響を受けるか確認するために、これら7つの代謝物すべてについて、治療の最初の2週間における変化を評価した。N¹AcSpd(N=15症例)のみが、経時的に有意な変化を示した(未調整の場合、P=0.004、及びBonferroni調整後ではP=0.036)。

40

【0203】

N¹AcSpdの変化について、3日の各間(ベースラインと第8日目、ベースラインと第15日目、及び第8日目と第15日目)で更に対比較により評価した。対比較により、第1日目と第8日のデータを有する患者N=19について第1日目～第8日目で有意な低下(P=0.018)が、及び第1日目と第15日目のデータを有する患者N=16について、第1日目～第15日目で有意な低下(P=0.005)が認められたことが明らかである。データを漏れなく有する患者N=16について、第8日目と第15日目の間で変化は認められなかった(P=1.000)。

50

【 0 2 0 4 】

治療の最初の2週間におけるN¹AcSpdの見かけの変化を確認するのに、標準反復測定分散分析を用いた。フリードマンの検定を用いた対比較分析の場合と同様に、このパラメトリックアプローチも完全な症例15例を用いた。対象内の結果は、有意な一次効果(P=0.003)とわずかな二次効果(P=0.075)を識別する。この分析により、N¹AcSpdの平均値は経時的に低下し、低下の大半は治療の最初の週において生ずることが示唆される。第8日目及び第15日目における屈曲又は底打ちは、二次効果を引き起こす。これはフリードマンの対比較と整合する。全体的なフリードマン検定の場合と同様に、単变量反復測定モデル(univariate repeated measures model)による全体的な変化は、経時的に有意な変化を示す(P=0.02)。

10

【 0 2 0 5 】

変化が遺伝因子又は療法と関連し得るか確認するために、これらの代謝物のパターンを、ODC遺伝子型及び治療期間と関係づけて評価した。Table 6(表6)は、個々の患者をPFSによるランク順で列挙し、またODC遺伝子型及び尿中ポリアミン含有量を含む。簡略化するために、組織ポリアミンエクスポーターに対する真の基質であるプロレシン、N¹AcSpd、N⁸AcSpd、及びDASの合計のみをTable 6(表6)に示す。Table 7(表7)は、ベースライン、及びDFMO療法を1週間実施した後の尿中ポリアミン変化、及びPFSとODC遺伝子型との関係に関する結果を提示する。rs2302616において、何らかのマイナーT対立遺伝子を有する患者では、GGを有する患者と比較して、PFSは4倍超であった(110日に対して498日、片側t検定によりP=0.048)。rs2302615におけるPFSの差異は統計的に有意ではなかった。ベースライン尿中ポリアミンに認められた変動は、ODC遺伝子型により少なくとも部分的に説明されると思われた。ポリアミンエクスポーターに対する尿中基質のレベルは、rs2302616において、GG遺伝子型を有する患者と比較して、マイナーT対立遺伝子を有する患者から得たサンプルにおいて約2倍高い(両側t検定によりP=0.085)。尿中ポリアミンは、rs2302615において、任意のAと比較して、GG遺伝子型の方がより高いが、この差異は有意ではなかった(P=0.381)。DFMO治療の効果は、ODC遺伝子型の関数としてより顕著であった。rs2302616においてマイナーT対立遺伝子を有する患者では、DFMO治療を1週間実施した後に、尿中ポリアミンレベルはベースライン値から約50%低下した一方、rs2302616においてGG遺伝子型を有する患者では、約25%増加した(P=0.040)。DFMOの効果も、rs2302615において任意のA対立遺伝子を有する患者と比較して、それよりもGG遺伝子型を有する患者において定量的に大きかったが、但し差異は統計的に有意ではなかった。

20

30

【 0 2 0 6 】

尿中ポリアミン、特にDASも疾患進行と関連した。尿サンプルを、ベースライン後、いくつか間隔を置いて収集した。簡略化するために、Table 6(表6)は、ベースライン値からDAS(又はその他の尿中ポリアミン代謝物)が増加するかについて示す。データは、PFSについて評価可能な患者18例中17例から入手可能であった。ベースラインサンプルは、この群の患者1例について入手できなかった。総尿中ポリアミン(プロレシン+N¹AcSpd+N⁸AcSpd+DAS)は、治療開始後100日未満で疾患進行を経験した患者のベースラインから、クレアチニン1g当たり平均して $6.56 \pm 16.29 \mu\text{mol}$ 増加した。尿中ポリアミンは、治療開始から100日より後に疾患進行が生じた患者では、クレアチニン1g当たり平均して $1.57 \pm 3.37 \mu\text{mol}$ 減少した。治療開始から100日以内に疾患進行が生じた患者10例のうち9例において、最長100日間無増悪性の患者では7例中1例においてのみ、尿中DASが増加した(P<0.01、フィッシャーの直接確率検定)。

40

【 0 2 0 7 】

【表6】

Table 6.DFMO用量、ODC遺伝子型、及び尿中ポリアミン別のランク順PFS

患者番号	PFS (日)	CTMMBG (CTMMBG)	最良応答 (CTMMBG)	状態又は試験中 止理由*	DFMO用量 (mg/m ²)	ODC SNP rs2302615/ rs2302616	UPA**サイクル 1第1日目	UPA**サイクル 1第38日目	サイクル1第1日 日からDASの 増加
1	1573	SD/PR	生存(PF)	500	GA/TG	NA***	15.70	NA	NA
2	1559	SD	生存(PF)	500	GG/TG	19.72	11.69	No	No
3	663	SD/PR	生存(PF)	1500	GG/TT	9.00	5.61	Yes	
4	418	SD	PD	750	GA/GG	2.25	7.80	No	
5	239	SD	PD	1000	GG/TG	40.12	8.71	No	
6	209	(CT陰性)/PR	PD	1500	GA/TG	12.23	3.98	No	
7	136	SD	2 nd 白血病	1500	GG/GG	4.58	6.99	No	No
8	103	SD	PD	750	GG/GG	5.04	NA***	No	No
9	94	SD	PD	500	GG/TG	10.18	4.20	Yes	
10	67	PD	PD	750	GG/GG	26.75	22.08	Yes	
11	64	PD	PD	1000	AA/GG	4.97	3.89	Yes	
12	62	SD	PD	1500	AA/GG	2.85	3.77	No	
13	62	SD	PD	1500	GA/TG	11.53	8.81	Yes	
14	62	SD	PD	1500	GA/TG	15.35	7.38	Yes	
15	59	PD	PD	1000	GA/GG	6.80	3.28	Yes	
16	57	SD	PD	750	GG/GG	2.16	1.94	Yes	
17	31	PD	PD	750	GA/GG	15.34	13.46	Yes	
18	21	PD	PD	1500	GG/TG	7.49	5.93	Yes	

*PF=無増悪性;PD=増悪性の疾患、2nd白血病=二次性白血病;**組織ポリアミンエクスポーターSLC3A2に対する基質は、ブトレジン、N1AcSpd、N8AcSpd、及びDASの合計を含む;***NA=サンブル入手不能。

【表7】

Table 7.ODC遺伝子型とポリアミンマークター及び治療応答との関連性

ODC SNP	rs2302615			rs2302616		
	遺伝子型	GG	任意のA	P値	GG	任意のT
PFS	326.7±501.6	282.1±499.6	0.426	110.8±119.1	498.0±635.4	0.048*
UPA C1D1	13.16±12.10	9.15±5.07	0.381	7.73±7.69	15.18±10.03	0.085**
UPA (C1D1-C8D1)/C1D1×100	23.26±35.59	0.66±92.00	0.531	-24.46±83.67	48.32±18.24	0.040**

*片側スチューデントt検定;**両側スチューデントt検定;D1C1=サイクル1の第1日目;D8C1=サイクル1の第8日目。

【0 2 0 9】
 (実施例4)
 応答

対象18例が、治療後の有効性について評価可能であった。 固形腫瘍における応答評価基準(RECIST)の基準、MIBG評価、及び骨髄疾患を考慮した全体的な応答では、患者1例がPRの最良応答(MIBG評価可能疾患のみ)を有し、対象12例がRECISTにより安定な疾患の最良応答を有し(これらの対象のうち2例がMIBGについてPRを認め、また対象1例が骨髄のCRを認めた)、及び5例が進行性疾患の最良応答を有したことが明らかとなった。 PETスキャンにより評価された対象3例では、2例が完全応答を、また1例が部分応答を認めたが、但し、PETスキャンはルーチン的に実施されなかったことに留意すべきである。これらの患者3例は、進行を認めずに本試験を継続する患者である。 PET応答は将来的な試験で検討される。 無増悪性の生存(PFS)のKaplan-Meyerプロットを図2に示す。 評価可能対象18例すべての平均無増悪生存は420日であった。 患者3例は、DFMO開始後2~4.5年の間、進行疾患を認めずに生存している。

10

【0210】

ODCリスク対立遺伝子を有する患者の一部は、エトポシド併用DFMO療法に反応しなかった。 単一の発がん遺伝子を標的とする療法の不奏功は、更なるシグナリング経路に影響を及ぼすその他の活性化突然変異の獲得から生ずる耐性機構に起因し得る(Weinstein及びJoe、2008年)。 Choiら(2014年)は、この概念を裏付けるエビデンスを最近報告した。 その結果から、NBのその他の遺伝的特性を標的とするDFMOの組み合わせ(Pughら、2013年; Samalら、2013年; Langeら、2014年)は、DFMO±エトポシドに適切に応答しない患者にとって有益となり得ることが示唆される。

20

【0211】

(実施例5)

高リスク神経芽細胞腫が寛解状態にある患者を対象としたDFMOのフェーズII予防トライアル

ODC/ポリアミンは、NBの再発を治療及び予防するための治療上の目標を提示する。 この試験では、再発を予防する戦略として、寛解状態にある高リスク神経芽細胞腫患者を対象としたDFMOの使用に重点が置かれる。 この試験は、ヘルシンキ宣言2004年版の原則、医薬品臨床試験の実施基準に関する日米欧医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議ガイダンス、及び臨床トライアルの実施及びヒト対象の保護に関するすべての現地規制当局の要求事項に基づき実施される。

30

【0212】

独立したデータ安全性モニタリング委員会(DSMB)が試験の実施を監督する。 この評議員会のメンバーは、有害事象報告を含むデータベースの要約入手し、対人会議又は遠隔会議により6ヶ月毎に会合を開く。 評議員会は、中止の可能性、及び/又は試験の早期報告に関する決定に責任を有する。

【0213】

臨床モニターは、モニタリング計画の規定に従い、治験実施施設に対して定期的に計画された出張を行って、トライアルの進行をレビューする。 モニタリング出張の実際の頻度は、登録率及び各施設の実績に依存する。 各来院時に、モニターは、スクリーニング及び登録記録台帳; プロトコール及び医薬品臨床試験の実施基準の原則への順守; 症例記録の作成; 原データの検証; 治験薬の数量管理と保管; 設備及びスタッフデータの品質; 規制文書; 並びに試験の完全性を含む、但しこれらに限定されないトライアルの様々な側面についてレビューする。 更に、施設は、Cancer Prevention Pharmaceuticals社(CPP)の代表者、及び/又はCRF、原資料、及びその他の試験ファイルへのアクセスにつき許可されなければならない政府査察担当者により監査され得る。 施設は、規制当局によりスケジュール化されたあらゆる査察を治験代表者に速やかに通知しなければならず、また査察報告書のコピーも治験代表者に送付しなければならない。 治験代表者は、この情報をCPPに速やかに送付する。

40

【0214】

スケジュール化されたモニタリング来院期間中、治験責任医師及び治験実施施設スタッフは、トライアルの進度について協議し、症例報告書の記載に対して必要な是正を行い、

50

データの明確化要求に対応し、そしてモニターからのその他のトライアルに関連するあらゆる問い合わせに対応するために、治験モニターと打ち合わせ可能でなければならない。

【0215】

患者の選択。すべての対象(又は患者の法定代理人)は、試験固有の評価のいずれかが実施され得る前に同意書を提供しなければならない。医療保険の携行性と責任に関する法律(HIPAA)を順守して保護された健康情報を使用及び/又は開示するために、患者(又は患者の法定代理人)からの許可もやはり取得される。

【0216】

下記のスクリーニング手順が、治験薬の初回投与前の14日以内に実施されなければならない(例外的なケースでは、更なる7日間が治験代表者から要求され得る)。試験は、悪性腫瘍に対するこれまでの治療を最後に実施した後に実施されなければならない:

1. 署名された同意書。すべての対象(又は患者の法定代理人)は、試験固有の評価のいずれかが実施され得る前に、同意書を提供しなければならない。生物学的相関分析に自発的に参加するための署名された同意書も取得される;
2. 寛解状態の確認を目的とするCT又はMRI;
3. 寛解状態の確認を目的とするMIBGスキャン。非MIBG集積性(non MIBG avid)の対象についてPETスキャンを検討する;
4. オーディオグラム;
5. 骨髄穿刺及び生検;
6. 更なる任意選択的な骨髄-生物学的相関用の骨髄サンプルについて更に同意する対象の場合

10

20

30

40

50

【0217】

下記のスクリーニング手順は、治験薬の最初の投与前、遅くとも5日間のうちに実施しなければならない:

1. 悪性腫瘍の組織学エビデンス、及びがんに対する事前の治療に関する文書化を含む内科及び外科履歴の完成。その他の関連するすべての医学的状態、及び過去に行われたすべての医学的処置の入念な履歴を含める;
2. 人口統計学;
3. すべての異常を記載する、ベースライン皮膚科学的及び神経学的検査を含む身体検査(身長及び体重を含む);
4. BSAの計算(体重及び身長から);
5. 体温、脈拍数、及び血圧を含むバイタルサイン;
6. ECOG全身状態/Lansky Play状態;
7. 鑑別を伴うCBC;
8. 血清電解質、血中尿素窒素(BUN)、クレアチニン、ビリルビン、LDH、ALT、AST、及びフェリチン;
9. C-反応性タンパク質(CRP)及び赤血球沈降速度(ESR);
10. バニリルマンデル酸(VMA)、及びホモバニリン酸(HVA)用の尿;
11. 子供を妊娠する可能性のある女性対象(月経開始又は 13歳)に対する尿妊娠試験;
12. ステロイドの使用及び用量に関する文書化を含む併用薬/療法;
13. 組み入れ除外要件の確認;
14. 生物学的相関用の尿。

【0218】

必要とされるすべてのスクリーニング手順、及びすべての組み入れ除外基準の認証が完了した後、対象はトライアルに参加し、固有の対象番号が割り振られる。

【0219】

本試験の組み入れ基準は以下の通り:

1. 年齢:診断時0~21歳。
2. 診断:初回診断時、又は高リスク神経芽細胞腫の前回再発時の組織学的検証。
3. 疾患状態:寛解状態にある神経芽細胞腫

4. 細胞毒性療法及び生物学的療法の終了から30日間を超える、及び前回の治療から120日未満。

5. 尿妊娠試験陰性が、子供を妊娠する可能性のある女性対象(月経開始又は 13歳)に必要とされる。

6. 思春期後の治験対象は、男性及び女性のいずれも、治療期間中及び治療中止後6ヶ月間、より有効な出生抑制方法の1つを使用することに合意する必要がある。このような方法として、全禁欲(性交禁止)、経口避妊薬('ピル')、子宮内避妊具(IUD)、レボノルゲストロール(levonorgestrel)インプラント(Norplant)、又はメドロキシプロゲステロンアセテート注射(Depo-provera shot)が挙げられる。これらのうちの1つが利用できない場合には、コンドーム併用避妊フォームが推奨される。10

7. ANC >500 / μL、及び血小板数>50,000個 / μL。

8. 臓器機能要件: 対象は、下記の定義に従い、適切な肝臓機能を有さなければならぬ:

a. AST及びALT<10 × 正常値上限

b. 血清ビリルビンは、2.0mg/dLでなければならない。

c. Table 8(表8)に示す年齢/性別に基づく血清クレアチニン。

9. インフォームドコンセント: すべての対象及び/又は法律上の保護者は、同意書に署名しなければならない。該当する場合、承諾書が施設ガイドラインに基づき取得される。

【0220】

【表8】

20

Table 8.年齢/性別に基づく血清クレアチニンレベル

年齢	最高血清クレアチニン(mg/dL)	
	男性	女性
1ヶ月～<6ヶ月	0.4	0.4
6ヶ月～<1歳	0.5	0.5
1～<2歳	0.6	0.6
2～<6歳	0.8	0.8
6～<10歳	1	1
10～<13歳	1.2	1.2
13～<16歳	1.5	1.4
≥16歳	1.7	1.4

20

30

【0221】

本試験の除外基準は以下の通り:

1. Lanskyスコア<60%

2. BSA(m²)が<0.25

3. 被験薬: 別の被験薬の投与を現在受けている対象は、参加から除外される。

4. 抗がん剤: その他の抗がん剤の投与を現在受けている対象は適格性を有さない。対象は、前回の化学療法の影響から十分に回復していかなければならない(血液学的効果及び骨髄抑制効果)。40

5. 感染症: 制御されていない感染を有する対象は、治験責任医師の意見として感染症が十分に制御されていると判断されるまで、適格性を有さない。

6. 治験責任医師の意見として、本試験の安全性モニタリング要件を順守することができない可能性がある対象、又はその順守状態が最適とは言えない可能性がある対象は除外されるべきである。

7. エフロルニチンに対する過敏症の履歴。

【0222】

すべての併発性の医学的状態は、医療の許容されるコミュニティー標準に基づき、治験責任医師の裁量により治療される。すべての併用薬及び治療は文書化される。下記の薬物

40

50

治療は、トライアル期間中、許可されない：あらゆる細胞毒性化学療法；その他のあらゆる治験治療；免疫療法、ホルモン療法、標的療法、抗血管新生療法、又はモノクロナール抗体療法を含む、但しこれらに限定されないその他のあらゆる全身性の抗悪性腫瘍療法；及び緩和目的で投与される場合を除く、全身投与される放射性同位体を含むあらゆる放射線療法。エリスロポエチン、血液製剤、鎮吐薬、ステロイド、及び輸液は、確立された基準に基づき、治験責任医師の裁量により投与され得る。

【0223】

対象は、下記の理由により治験治療を取り止めることができる：

- ・進行性腫瘍疾患
- ・対象又は保護者が治験薬の継続に対する同意を取り下げる
- ・対象が、更なる参加を排除する、又は併用治療の禁止を必要とする併発性の疾患を発症する
- ・治験責任医師が、対象にとって最良の利益となるように対象をやめさせる
- ・対象が追跡不能(2週間にわたり、3回の異なるケースにおいて、対象と面会不能として定義される)
- ・管理上の理由(例えば、対象がホスピスケアに移動する)
- ・治験責任医師の意見として、更なるトライアル参加を排除する、又は取り止めに関するプロトコールの要求事項を満たす有害事象(例えば、過去に生じた用量制限性の毒性のエピソードにより、プロトコール治療において減量したにもかかわらず、用量制限性の毒性が発現した)
- ・死亡

10

20

30

【0224】

対象は、下記の理由から試験を取り止めることができる：

- ・対象又は保護者が、トライアルの継続に対する同意を取り下げる
- ・対象が追跡不能(2週間にわたり、3回の異なるケースにおいて、対象と面会不能として定義される)
- ・対象が、すべてのフォローアップ時点を含む、プロトコールに定義されたすべての療法を完了する。
- ・死亡

【0225】

DFMO治療。当試験では、対象は、1サイクル28日の各日、500～1000mg/m² BIDの用量(Table 9(表9)の投与チャートに従う)で、経口DFMO(化学的には、2-(ジフルオロメチル)-DL-オルニチン・一塩酸塩・一水和物と命名されるエフロルニチン塩酸塩)の27サイクルの治療を受ける。本試験で使用される剤形は、エフロルニチンHCl・一水和物、250mgを含有する黄色の、フィルムコーティングされた凸面型錠剤として提供される。経口錠剤形態は、米国内では、臨床トライアルの現場以外では入手不能であり、また本トライアルで使用される製剤は、スリンダクと併用したフェーズIII結腸腺腫臨床トライアルで使用された製剤と類似している(Meyskensら、2008年)。

【0226】

治療は、別の理由から入院が必要とされない限り、外来患者として実施される。対象は、試験期間中、低ポリアミン食を維持するように助言を受ける。配布資料が、この試験に参加している間、避けるべき食物と共に対象に提供される。

40

【0227】

【表9】

Table 9.DFMO投与法

BSA(m ²)	投与毎に配布される錠剤	1日当たりの合計錠剤数	実際のmg/m ²
>1.5	経口4錠、1日2回	8	1回の投与につき625以下
0.75~1.5	経口3錠、1日2回	6	1回の投与につき500~1000
0.5~<0.75	経口2錠、1日2回	4	1回の投与につき675~1000
0.25~<0.5	経口1錠、1日2回	2	1回の投与につき500~1000
<0.25	トライアルに適格性を有さない		

10

20

30

40

50

【0228】

用量変更。すべてのサイクルにおいて毒性及び用量変更をモニタリングする。ベースラインでは正常であった場合、治験薬の用量調節は、NCI共通毒性基準(CTC)、第4.0版に従い等級化される毒性に基づく。NCI基準に記載されていない事象には、グレードが指定される。臨床的有害事象と治療との関連性を判断する基準は、有害事象と治療の関連性を決定するのに利用される。

【0229】

DFMOに起因する何らかの毒性、又は何らかの耐えがたい毒性を経験する患者では、毒性がグレード2以下に復帰するまで、そのDFMO用量が維持される。毒性が消散したら、対象は、投与法の表(Table 9(表9))において1工程ダウンした用量にDFMOを減量して投与される。1回の投与につき1錠のみを1日2回、現在服用している対象は、1日1錠(QD)まで用量減量される。対象は、ここで定義された後続毒性に対して、1日1錠(QD)の投与法に達するまでできるだけ多くの回数で、用量減量する。その時点で、患者が別の用量減量毒性を経験する場合には、プロトコール治療を取り止める必要がある。用量減量毒性の例として、治験薬中止後、7日間以上持続するグレード4の好中球減少症又は血小板減少症；治験薬中止後、7日間以上持続するトランスアミナーゼの>10×上昇；脱毛症、恶心、嘔吐、及び下痢を除く、治療に適切に反応しない任意のその他のグレード3非血液毒性が挙げられる。上記毒性が14日までに消散しない場合には、DFMOを中止すべきであり、そして対象は、試験を中止すべきである。血小板が100,000/μL未満で、このトライアルに参加する患者(前回の治療後に骨髄の回復が不良な患者)では、血小板がベースライン値の50%を下回る場合、治験薬を維持すべきである。

【0230】

応答の評価。この試験に参加した対象について応答を評価するために、様々な時点においてスキャンが取得される。この患者母集団におけるDFMOの潜在的ベネフィットを評価するために、設定された基準に基づき応答が評価される。

【0231】

治療フェーズ-サイクル1。第1のサイクルの期間は28日間である。下記の手順を、サイクル1の第1日目に完了しなければならない(別途明示しない限り、DFMO投与前、長くても5日のうちに実施され得る)：

- 過去のすべての異常、何らかの新たな異常、及び詳細な神経学的検査に関する最新情報の文書化を含む、身体検査(体重を含む)。
- 体温、脈拍数、血圧(座位)を含むバイタルサイン(サイクル1の第1日目に実施される)；
- 併用薬のレビュー及び記録；(サイクル1の第1日目に実施される)

4. すべてのAEのモニタリング及び文書化、並びに合併症のレビュー(サイクル1の第1日目に実施される)
5. 生物学的相関用の尿(スクリーニングサンプルに付加してサイクル1の第1日目に実施される)
6. 任意選択的:生物学的相関用の血液(更なる同意を必要とする)
7. 投薬日記の配布

【0232】

下記の評価は、サイクル1の第15日目に実施される(±3日のウィンドウ):

1. 身体検査
2. 体温、脈拍数、及び血圧(座位)を含むバイタルサイン 10
3. 鑑別を伴うCBC;
4. 血清電解質、BUN、クレアチニン、ビリルビン、ALT、AST; 及びLDH
5. 併用薬のレビュー及び記録;
6. すべてのAEのモニタリング及び文書化、並びに合併症のレビュー
7. 生物学的相関用の尿
8. 任意選択的:生物学的相関用の血液(更なる同意を必要とする)

【0233】

治療フェーズ-サイクル2~27。サイクルの期間は、いずれも28日間である。下記の手順は、サイクル2~27の第1日目に完了しなければならない(治療開始前、長くとも5日のうちに実施され得る): 20

1. 過去のすべての異常、何らかの新たな異常、及び詳細な神経学的検査の最新情報に関する文書化を含む、身体検査(体重を含む)、
2. 体温、脈拍数、血圧(座位)を含むバイタルサイン;
3. 併用薬のレビュー及び記録;
4. すべてのAEのモニタリング及び文書化、並びに合併症のレビュー
5. BSA計算(体重及び身長から);
6. ECOG全身状態/Lansky Play状態;
7. 鑑別を伴うCBC;
8. 血清電解質、血中尿素窒素(BUN)、クレアチニン、ビリルビン、LDH、ALT、及びAST;
9. C-反応性タンパク質(CRP)及び赤血球沈降速度(ESR)
10. バニリルマンデル酸(VMA)及びホモバニリン酸(HVA)用の尿 30
11. 生物学的相関用の尿
12. 任意選択的:生物学的相関用の血液(更なる同意を必要とする)
13. 前回サイクルの投薬日記の収集、及び新たな投薬日記の配布
14. 子供を妊娠する可能性のある女性対象(月経開始又は 13歳)に対する尿妊娠試験。

【0234】

サイクル3、6、9、12、15、18、21、24、27の最後、そしてフォローアップに関する施設の標準療法に基づく:

1. MIBGスキャン(MIBG集積性の対象のみ)。非MIBG集積性の対象についてPETスキャンを検討する。 40
2. CT/MRI(ベースラインと同一の放射線法を使用)
3. 骨髄生検及び穿刺は、治療担当医師が進行を懸念する場合に実施される。
4. 任意選択的:生物学的相関用の血液(更なる同意を必要とする)。これは、次のサイクルまで、又はその第1日目に実施され得る。

【0235】

サイクル6、12、及び27の終了時に、オーディオグラムが実施される。オーディオグラムは、聴覚消失が疑われる場合、そのいずれについても時期を問わず実施されるべきである。

【0236】

臨床的に適応される場合には、更なる画像診断又は評価が実施され得る。画像診断の種

50

類、評価の種類、及び時期を、画像診断及び/又は評価の理由と共に記録すべきである。試験期間中は継続的に、次に対象の治療中止から3ヶ月毎に2年間、次に1年毎に最長5年間、又は対象が死亡するまで、若しくは対象が追跡不能となるまで、生存がモニタリングされる。全28日の治療サイクルを27回受けた対象は、プロトコールを完了したとみなされる。

【0237】

治療外/30日フォローアップ来院評価が以下の通り実施される:

1. 過去のすべての異常、あらゆる新たな異常、及び詳細な神経学的検査の最新情報に関する文書化を含む身体検査(体重を含む); 10
2. ECOG全身状態/Lansky Play状態;
3. 体温、脈拍数、血圧(座位)を含むバイタルサイン;
4. 鑑別を伴うCBC;
5. 血清電解質、BUN、クレアチニン、ビリルビン、LDH、ALT、AST;
6. C-反応性タンパク質(CRP)及び赤血球沈降速度(ESR)
7. バニリルマンデル酸(VMA)及びホモバニリン酸(HVA)用の尿
8. 子供を妊娠する可能性のある女性対象(月経開始又は 13歳)に対する尿妊娠試験;
9. 併用薬のレビュー及び記録;
10. AEのモニタリング及び合併症のレビュー
11. 前回サイクルの投薬日記の収集
12. MRI/CT;MIBGスキャン;これまでの3サイクルでまだ得られていない場合。 20
非MIBG集積性の対象についてPETスキャンを検討する;
13. 骨髄生検及び穿刺(進行が懸念される場合のみ);
14. オーディオグラム(臨床的に適応される場合)。

【0238】

有害事象。有害事象は、疑われる原因を問わず、DFMOの最終投与後の30日間、及び現在の有害事象のすべてが消散してベースライン又は グレード2(有害事象共通用語基準[Common Terminology Criteria for adverse events][CTCAE]第4.0版に基づく)となるまで収集される。フォローアップ来院時に治験薬関連毒性が疑われる対象はいずれも、現在の有害事象のすべてが消散してベースライン又は グレード2となるまで追跡しなければならない。この場合、更なる臨床評価及び臨床検査を必要とし得る。DFMOの中止以降、新たな抗がん治療を開始した対象は、新たな治療開始日において、更なるAE収集のいずれからも除外される。 30

【0239】

有害事象は、医薬製品を投与された患者又は臨床試験対象におけるあらゆる好ましくない医療上のことであり、必ずしもその治療と因果関係を有する必要はない。したがって、有害事象は、あらゆる好ましくない及び意図しない兆候(例えば、異常なラボ所見を含む)、症状、又は医薬品の使用と一時的に関連した疾患であり得、医薬品と関連すると考えられるかどうかは関係ない。プロトコールに規定するフォローアップ期間外で生ずる好ましくない医学的事象は、治験薬と関連しない限り、有害事象とみなされない。治験薬の有効性が評価されている医学的状態の増悪は、有害事象とみなされない。 40

【0240】

予期せぬ有害事象は、事象の性質又は重症度が、該当する製品情報、例えば研究員によるパンフレットと整合しない事象である。重篤な有害事象は、任意の用量において

- ・死を引き起こす
- ・生命を脅かす(患者が事象発生時に死亡するリスクを有する事象;事象がより重度であったならば死を引き起こしたであろうと仮定される事象を意味しない)
- ・患者の入院又は既存の入院の延長を必要とする
- ・永続的又は顕著な障害/機能不全を引き起こす
- ・先天異常又は出産時欠損に該当する

あらゆる好ましくない医療上のことである。

50

【0241】

直ちに生命を脅かすものではない、又は死亡若しくは入院を引き起こすものではないと考えられるが、患者を危うくし得る、又はこれまでに列挙したその他の転帰の1つを防止するために介入を必要とし得るその他の重要な医学的事象。そのような事象の例として、アレルギー性の気管支痙攣に対する救急処置室での集中治療；入院に至らない血液疾患若しくは痙攣；又は薬物依存若しくは薬物乱用の発現が挙げられる。

【0242】

用語「重度の(severe)」は、事象の強度(重症度)を記載するのに多くの場合用いられる；事象そのものは、比較的重要でない医学的意義を有する場合もある(例えば、重度の頭痛等)。この用語は、患者の生命又は機能性に脅威を惹起する事象と通常関連した患者/事象の転帰又は行動基準に基づく「重篤な(serious)」と同一ではない。

10

【0243】

生物学的試験。このような試験では、尿中のポリアミン及び炎症マーカーのレベルを評価する(最初の朝のボイド尿サンプルが、サイクル1の第1日目及び第15日目及びサイクル2～27の第1日目に収集される)。対象は、血液中のポリアミン及び炎症マーカーのレベルを評価する更なる生物学的相關試験に自発的に参加することができる(全血サンプルが登録時に収集される；サイクル1の第1日目及び第15日目；サイクル2～27の第1日目；及びサイクル3、6、9、12、15、18、21、24、及び27の終了時に)。この自発的な試験では、血液中のマイクロRNAレベル及び白血球内のODC活性が評価される。またこの試験では、骨髄内の微小残存病変も評価される。この生物学試験は、治療に対する応答及び/又は将来的治療の指針として役立つバイオマーカーに関する分子決定因子を識別するために分析される。

20

【0244】

脱炭酸したS-アデノシルメチオニン(dcSAM)。アデニン及びその誘導体は、2-クロロアセトアルデヒドと反応して高度に蛍光性の三環性誘導体を形成することが公知である。この反応は、尿及び血漿サンプル中のdc-SAMを測定するための高感度で特異的な方法をもたらす。反応混合物を、40℃で、終夜インキュベーションする。この混合物の一定分量を、クロマトグラフィー分離用のAltex Ultrosphereカラムに注入する。その他の記載(Haegeleら、1987年)に従い、Perkin-Elmer LS-4分光蛍光光度計を用いて検出を行う。

【0245】

ポリアミン。高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)及びその他の方法が、過去の試験(Harras、1996; Haegeleら、1987年)に従って、プロレシン、スペルミジン、スペルミン、モノアセチルスペルミジン、及びモノアセチルスペルミン及びジアセチルスペルミンを検出するのに用いられる。サンプルを0.2Nの過塩素酸に調整し、そして直接分析する。アセチル基を除去するために酸加水分解法が採用され、したがってジアセチル化アミンを測定する。検出レベルは、1～10pmolである。大腸組織におけるこの測定と関連した誤差要因はこれまでに報告されている(Hixsonら、1994年)。また尿中ポリアミンを標準化するために、尿中クレアチニンレベルも、市販キット(Oxford Biochemical Research社)を用いて測定する。該方法では、ピクリン酸は、アルカリ性のpHでクレアチニン及びその他の尿中nmと反応する。クレアチニン反応は、酸性化したとき、急速に低下する。光学濃度の差異は、クレアチニン濃度の直接的な指標である。

30

【0246】

ODC SNP分析。ODC G316A—塩基多型(SNP)は、前立腺及び結腸直腸粘膜の生体組織中のポリアミン含有量と関連した。最低レベルのポリアミンが、A対立遺伝子についてホモ接合性の個人に由来する結腸直腸粘膜組織に見出され、最高レベルはGG-遺伝子型のキャリアにおいて認められる。ODC G316A対立遺伝子の遺伝子型と結腸直腸のヒスタミン含有量の間に関連性は認められず、アミンはその合成においてODCに依存しない。DFMO治療が、各ODC遺伝子型を有する患者におけるポリアミンレベルに及ぼす効果を調べる。DFMO療法と関連した聴器毒性は、ODC 316AA遺伝子型を有する人々の小分画に限定される。これらの臨床トライアル結果は、トランスレーショナル臨床試験により裏付けられるが、同臨床試験は、分子疫学調査に基づき、またヒトを対象とする独立した3グループにより繰り

40

50

返され、DFMOが標的とするタンパク質であるODCの発現に影響を及ぼす多形性は、異時性的結腸腺腫及び散発性乳がんと高度に関連することを明らかにした。更に、独立した2つのグループが、これと同一の多形性は、前立腺がんの進行及び結腸がん生存率と関連したことを報告した。どの患者が利益を得、またどの患者がDFMO治療の副作用を被るか予測するアルゴリズムを開発するために、全治験参加者のODC G263T及びG316Aの型を、確立した方法を用いて、有核血液細胞から得られるDNAを分析することにより決定する。DFMO効果の予測マーカーとして、血清中のマイクロRNAレベル(Giladら、2008年)も評価する。

【0247】

バイオマーカー分析。対象のバイオマーカーを、抗体アレイ分析法を用いて血漿において評価する。抗体アレイを、腫瘍組織(関連する生物学的試験から得られる)の遺伝子発現、プロテオミック及びグリコミック試験に由来するバイオマーカー候補を標的とするために生成する。このアレイは、予後が不良な患者を予後が良好な患者と区別するタンパク質又はタンパク質のパネルを識別するために、様々なタンパク質レベルを定量化するのに用いられる。固有の炭化水素レベルも、そのような測定と予後の関連性を判断するために、各タンパク質について特徴づけられる。

【0248】

循環性腫瘍細胞分析。循環性腫瘍細胞(CTC)が、数種類の転移性がんの検出及び予後予測における新規ツールとして登場している。現時点では、CTCマーカーは、上皮がんに限定されており、また間葉及び上皮-間葉変換(EMT) CTCを検出するのに利用可能な特異的マーカーは存在しない。間葉CTC検出用の細胞表面マーカーを利用して、いくつかのCTCが列挙され、また腫瘍、転移、及び再発の早期検出に役立つように単離されるだろうが、該CTCは特異的標的療法の開発に寄与するであろう。したがって収集されたサンプルは、患者の治療転帰をモニタリングするのに利用される。

【0249】

骨髄。CD81(PE色素)、NCAM抗原CD56(APC色素)、CD9(perCP-Cy5.5色素)、及び幹細胞抗原と考えられるCD34(PE-CY7色素)、また白血球抗原CD45不存在(APC-Hy色素)からなる6色分析法(six-color analysis)を用いた骨髄サンプルの免疫表現型検査が、骨髄中に存在する微小残存病変を評価するために実施される。

【0250】

統計分析。下記のデータセットがこの試験で使用される：

- ・ 参加した、適格性を有するすべての対象(ITT)母集団:署名済みの同意書を有するすべての適格性を有する対象。
- ・ 治療を受け、適格性を有するすべての対象(安全性について評価可能)母集団:治験薬を少なくとも1回投与されたすべての対象。
- ・ 最初の評価可能な時点まで治療を受け、評価を完了した(一般的に3サイクル)(治療の有効性として)、適格性を有するすべての対象母集団、但し対象が早期の時点において疾患進行の試験エンドポイントに達した場合を除く。

【0251】

有効性分析は、治療評価可能母集団について実施される。安全性の分析は、安全性及び有効性評価可能母集団について実施される。すべてのベースライン患者特性を要約する。安全性データは、DFMOの投与を少なくとも1回受けた対象すべてについて記載される。安全性データには、血液学、血清化学、バイタルサイン、及び有害事象に関する数値が含まれる。有害事象、重篤な有害事象、用量制限毒性、及び治療の遅延を経験する対象の割合を要約する。試験への登録は、中間解析の時点でも休止しない。

【0252】

無再発性の生存(EFS)は、治験薬の投与初日から、再発、進行性の疾患、続発性のがん、死亡が最初に発生したときまで、又はこれらの事象が生じなかった場合には、対象と最後に面会したときまでの期間として定義される。進行は、CT/MRIで認められた>10mmの何らかの新たな病変、MIBGで認められた何らかの新たな病変、又は骨髄中に存在する新たな疾患の出現として定義される。全生存(OS)は、治験薬の初回投与日から死亡までとして定

10

20

30

40

50

義され、又は試験期間中に死亡しなかった場合には、対象と最後に面会したときに除外される。全生存は、試験期間中は継続的に、次に対象の治療中止から3ヶ月毎に最長2年間、次に1年毎に最長合計5年間モニタリングされる。

【0253】

標本サイズと分析-階層1。2年EFS率70%を、フェーズIベースラインにおける率として選択した。ベースラインにおける2年時EFS率70%は、Yuら、(2010年)による公表データに基づく。DFMOは、2年EFS率を80%まで増加させるが、それは2年時EFS率の期間が約10%増加することに該当すると仮定される。方向性5%一母集団二項検定を仮定すれば、患者n=127の標本サイズが、80%の検出力を実現し、EFSのこの2年における差異を検出するのに必要とされる(70%と80%)。

10

【0254】

バイオマーカー保有率の比較では、階層1コホートは、最長2年のフォローアップにおいて再発率30%、したがって非再発率70%を経験すると仮定する。また、バイオマーカーが上昇したときの対応する保有率は、それぞれ再発群で60%、及び非再発群で30%であると仮定する。この仮定した保有率の差異は、フィッシャーの直接確率検定、及び非方向性の第一種の過誤レベルとして5%を用い、全体的な標本サイズが患者N=127(再発38例及び非再発89例)のとき、85%の検出力で検出可能である。

【0255】

各患者について、治療中に連続的に取得されたバイオマーカーデータは、下記のアプリオリ試験基準に基づき、上昇した又はしないとして分類され、また患者の進行状態に対して盲検化される。バイオマーカーの上昇は、2つの連続した尿中レベルにおいてジアセチルスペルミンレベル $>500\text{nmol/gm}$ クリアチニンとして定義される。トライアル治療の2年間において、進行を認める患者(n=38と推定される)と進行を認めない患者(n=89と推定)のバイオマーカー保有率は、2つのEFS保有率の同等性を判断するフィッシャーの直接確率検定を用いて比較されるが、同検定は両側第一種の過誤レベル5%を用いて実施される。得られた保有率に関するオッズ比の95%正確信頼区間と共に、保有率の絶対的差異に関する95%正確信頼区間が、正式な仮説検定を補うために得られる。OSもバイオマーカー保有率の有用性を比較するための二次転帰であるので、時間事象分析も、アプリオリバイオマーカー定義を最初に利用し、カプラン・マイヤーアプローチを用いて実施される。この最初の時間事象分析は、次にオリジナルのアプリオリ定義の探査分析と対比するのに利用可能な他のカットポイント定義の探査分析が可能となるように、定量的バイオマーカー評価を用いるCox比例ハザードモデリングエフォートにより補足される。再発性及び非再発性の患者について識別される潜在的な交絡性の臨床的指標が、バイオマーカー効果も含むCox比例ハザードモデルを用いて限定期に組み込まれる。この交絡因子の調査は、標本サイズが小さいと予想されることから限定期である必要がある。この階層から得られたデータは、この患者母集団を対象とするフェーズII試験について統計デザインを策定する際の指針となる。

20

【0256】

標本サイズと分析-階層2。第1及び第2の再発時間について、Santanaら(2008年)により提示された、全患者のメジアンEFS時間の表に基づき、時間事象について指数モデルを仮定すれば、メジアン第1の再発時間8.7ヶ月は、2年時EFS 14.8%と同等であり、また後続する第2の再発までのメジアン時間3.8ヶ月は、2年時EFS率1.3%と同等である。再発患者母集団の2/3が再発1回のみ、及び他の1/3の患者が再発2回以上と仮定すれば、これら2つのEFS率(14.8%及び1.3%)の加重平均は、10.3%に等しい。簡略化するために、2年間の実績EFS率10%を仮定した。EFSの増加を調べる場合、DFMOによる治療が、全体的な2年時推定EFSを、この患者母集団における上記実績データの2年推定値10%から30%まで延長させができるか試験するために、階層2において対象n=33の標本サイズを必要とする。標本サイズは、検出力が80%及び両側第一種の過誤レベルが5%の割合である一標本二項検定に基づく。

30

【0257】

40

50

患者n=33のうち少なくとも2年EFS率を有する患者7例又はそれ超について観察すると、2年EFS率30%の対立仮説ではなく、10% EFSの帰無仮説が棄却される。2年推定EFSに関する正確二項95%信頼区間は、これまでの正規2段階仮説検定(formal two-stage hypothesis test)を補う。実際のEFS時間事象データは、再発までの時間に由来するので、時間事象データ分析のカプラン・マイヤー分析を実施し、そして再発までのメジアン時間及びこの数値の95%信頼度を得て、このEFS点推定を補足する。階層2の患者のこの群は、これまでに単回及び複数回の再発履歴を有する患者から構成されるので、これまでの再発履歴からEFS及び時間事象データを調べる。特に、これまでの再発履歴が再発までの時間に及ぼす影響が、カプラン・マイヤー分析法及びCox比例ハザードモデルを用いて探索される。DFMO療法に対する応答、及びその後の再発も、Coxモデルを用い、これまでの再発履歴と組み合わせて探索される。

10

【0258】

(実施例6)

神経芽細胞腫の治療を受けている小児を対象とする、免疫療法期間中のエフロルニチンによる疼痛の軽減

ラットモデルにおいて、DFMOが抗GD2誘発性の異痛症を軽減することができるか確認するため(Startら、1997年;Sorkinら、2002年;Sorkinら、2010年)、並びにマウス同遺伝子型神経芽細胞腫モデルにおけるDFMO+抗GD2の抗腫瘍効果を確認するため(Weissら、1997年)に、前臨床試験を実施する。これらの前臨床試験は、飲料水中0.15~1%の濃度のDFMO用量を、齧歯類を対象として調査するが、これは、ヒトでは0.5~3.5gm/m² PO BIDの用量に対応する。

20

【0259】

単一薬剤としてのDFMOが、免疫療法を受けている高リスク神経芽細胞腫(HR-NB)を有する小児において、治療効果のマーカーを低下させることなく(及び好ましくは増強しつつ)、疼痛の指標を軽減することができるか確認することを一次目的として、臨床試験を実施する。試験は、実薬DFMO又はプラセボDFMOと併用した抗GD2抗体により治療を受けている神経芽細胞腫を有する小児及び若年成人患者に対する二重盲検、ランダム化試験である。DFMOは、最も近傍の250mgに四捨五入され、決定された所定のmg/m²用量で、DFMO錠剤として毎日投与される経口薬剤である。有効性及び疼痛/毒性エンドポイントを、4週間サイクルの免疫療法のX回(X=1又は5)終了時に評価する。有効性エンドポイント:第1サイクルの第15日目に、患者の 80%で、CD16/CD56陽性NK細胞の500%増加、及び/又は絶対的な最低増加量 細胞100個/μl、及び測定可能なch14.18/CHOレベルが少なくとも1μg/ml。疼痛-毒性エンドポイント:第1サイクル期間中、最初の5日間が経過した後に、i.v. モルヒネを用いないch14.18/CHO輸液スケジュールの患者が 80%(Kushnerら、2011年)。患者毎に時間に対する疼痛強度曲線を生成するために、患者は、治療期間全体にわたり、1~10の数値スコアを用いて疼痛について評価を受ける(Silvestriら、2008年)。

30

【0260】

試験は、免疫療法による維持療法期間中に実施される、高リスク神経芽細胞腫を有する患者を対象とする、経口DFMO単独及びプラセボのフェーズIIIトライアルである。抗体による維持療法終了時にDFMO/プラセボ投与群にランダム化した後、一次エンドポイントを盲検化方式で評価する(5回の4週サイクル)。治療期間は、免疫療法の各サイクルにおけるDFMOの毎日投与である。疼痛問題は、第1サイクル期間中、特に問題であり、トライアルは、単回-4週サイクルの最初のみとして設計され得る。

40

【0261】

臨床試験の二次目的には、この治療が、無再発性の生存(EFS)又は全生存(OS)を延長し得るかどうか確認する工程、高リスク神経芽細胞腫を有する小児及び若年成人患者において、標準維持療法に付加したときに、単一薬剤としてのDFMOの安全性及び忍容性を確認する工程、並びにDFMO標的遺伝子ODC1(生殖細胞系列一塩基多型[SNP] rs2302615及びrs2302616)における遺伝的変動、及び疾患予後又は治療応答と関連した尿中及び/又は血清代謝物(ブトレシン、N¹,N¹²-ジアセチルスペルミン、N¹及びN⁸モノアセチルスペルミジン、脱

50

炭酸したS-アデノシルメチオニン、チミジン)のレベルを含む生物学的相関を評価する工程が含まれる。二次エンドポイントには、OS、安全性、生殖細胞系列ODC遺伝子型、及び尿中ポリアミン代謝物が含まれる。

【0262】

(実施例7)

寛解状態にある高リスク神経芽細胞腫を有する患者を対象としたDFMOのフェーズII予防トライアルの結果:DFMOは、高リスク神経芽細胞腫において再発を防止し、全生存を増加させる

治験デザイン。この試験は、標準療法終了時に完全寛解状態にあった高リスク神経芽細胞腫を有する患者に対する非盲検、単一薬剤、多施設臨床トライアルであった。患者は、2012年6月に開始し、2016年2月に終了した、神経芽細胞腫及び髓芽細胞腫トランスレーショナルリサーチコンソーシアム(NMTRC) 003/003Bトライアルに参加した。このトライアルは、欧米の治験審査委員会、並びに各参加施設の現地治験審査委員会により承認を受けた。試験に参加する前に、対象の親又は保護者から同意書を取得し、該当する場合には、文書による承諾(assent)を対象から得た。ClinicalTrials.gov識別子番号:NCT01586260/NCT02395666。

【0263】

対象は、診断時に、組織学的に確認された神経芽細胞腫病期国際分類システム(INSS)の高リスク神経芽細胞腫を有することが要件とされた。対象は、5~7サイクルの導入化学療法を含む標準高リスク神経芽細胞腫(HRNB)療法、原発腫瘍の外科切除(実現可能な場合には)、適応される場合には、高用量化学療法/自己幹細胞支持療法(autologous stem cell support)、及び照射療法による強化療法、並びに最多6サイクルのイソトレチノインを用いた抗GD2抗体療法を完了していなければならない。その他の適格性基準には、診断時の年齢が21歳未満;アップフロント治療終了時に完全寛解している疾患状態;前回治療終了からDFMO開始まで120日未満;及び適切な血液学パラメーター及び臓器機能が含まれた。完全寛解とみなされるには、対象は、CT又はMRIにより(及び腫瘍が当初MIBG集積性であった対象ではメタヨードベンジルグアニジン(MIBG)により)遷延性の神経芽細胞腫に関するX線写真のエビデンスを有してはならず、骨髄穿刺液/生検組織が組織学的に陰性であり、並びにバニリルマンデル酸及びホモバニリン酸のクレアチニンに対する比として評価される尿中カテコールアミンが正常でなければならなかった。残存腫瘍、又はCT若しくはMRIで目視可能な骨の変化を有する対象であっても、病变がMIBG及びPETスキャンの両方により陰性であった場合には、なおもCRにあるとみなされ得る。

【0264】

対象は、経口DFMOについて、500~1000mg/m² 1日2回の用量で、4週サイクル27回の投与を受けた。投薬日記をサイクル毎に完了することが要件とされた。DFMOは250mg錠剤として提供された。一次エンドポイントは、無再発性の生存(EFS)であった;二次目的には、全生存(OS)及び安全性が含まれた。EFSは、治験薬の初回投与日から再発又は死亡の初回発生までの期間として定義され、またOSは、治験薬の初回投与日から死亡までとして定義され、無再発の対象は、最後に面会した際に除外された。安全性の分析を、治験薬の投与を少なくとも1回受けたすべての対象について実施し、これには、全有害事象の頻度、等級、予測可能性、及び帰属、並びに投与中断、用量減量、及び治療中止が含まれた。

【0265】

統計分析:生存データに基づく推定及び仮説検定。無再発性の生存及び全生存を、カプラン及びマイヤーの方法(Meier、1958年)を用いて推定する一方、標準誤差をGreenwoodの公式を用いて推定した。NMTRC003母集団はANBL0032母集団と重複しており、NMTRC 003に参加した大部分の患者(74/94)はANBL0032にも参加し、治療も受けたので、公表されたANBL0032の結果はDFMO治療効果の正式な評価を提供するものと示唆される。Yuら、(2010年)の研究は、不奏功の時間、並びに1年間隔でのリスクを有する患者数を提供し、打ち切り時間(censor time)は、これらのデータに基づきサンプリングされ、また小区分一定ハザードモデル(Piecewise Constant Hazard Model)が採用された。但し、ANBL0032に参加し

10

20

30

40

50

たNMTRC003患者は、ANBL0032母集団のサブセット、すなわちNMTRC003治療開始時に無再発性の患者(ANBL0032治療開始後6~10ヶ月)に該当する(Yuら、2010年)。したがって、直接比較するには、条件付き確率の定義を用いて公表されたANBL0032のEFSを調整する必要があった。但し、公表されたANBL0032の全生存と比較するには、公表されたわずかな生存分布では入手できない二変数生存分布の理解を必要とする。ノンパラメトリック推定上、及び二変数実測値のパラメトリックモデル上の正規上界の両方を用いて、NMTRC003の全生存を、ANBL0032の全生存と比較した。

【0266】

NMTRC003及びANBL0032の間の無再発性の生存及び全生存の比較。Yuら、(2010年)は、NMTRC003母集団と重複するANBL0032母集団について、無再発性の生存 S_E 、及び全生存 S_D を報告した。共通する母集団内で直接比較する場合、NMTRC003参加基準(それぞれ S'_E 及び S'_D)を条件としたANBL0032の無再発性の生存分布及び全生存分布を用いた。第1に、条件付き確率の定義に基づく S'_E の推定値を記載する。NMTRC003に参加するには、ANBL0032治療の開始からNMTRC003治療の開始までの無再発性の生存を必要とし、全生存を比較するには、二変数(事象の時間、死亡の時間)生存分布について若干の理解を必要とする。第2に、 S'_D 上のモデル独立型の上界を策定した。一方、これは、モデル独立型の比較を可能にする。一方、結果は、短時間では不必要に保守的である。第3として、 S'_D の推定値を提供するANBL0032結果の二変数モデルを策定した。

10

【0267】

Yuら、(2010年)が記載するANBL0032母集団のサンプルは「ANBL0032/NEJM」と呼ばれ、これには、初回がん事象の時間及び死亡の時間を含む二変数確率変数の実測値が含まれる。薬物刺激を受けていない生存分布(S_E 、 S_D)は、ANBL0032/NEJM母集団を反映する一方、薬物刺激を受けたランダム生存分布(S'_E 、 S'_D)は共通母集団を反映する。 t 、 t' 、 t_0 、及び τ はANBL0032治療開始からの時間、NMTRC003治療開始からの時間、NMTRC003治療の開始を取り込んだANBL0032治療開始からの時間($t=t'+t_0$)、及び時間に関する積算変数を表す。 $Pr[X]$ はXの確率である。 $Pr[X|Y]$ は、Yを条件とするXの条件付き確率である。

20

【0268】

D に関する限界生存関数(marginal survival function)は、

【0269】

【数1】

30

$$S_D(t) = Pr[D > t] = \int_0^{\infty} Pr[E = \tau] Pr[D > t | E = \tau] d\tau$$

【0270】

である。

【0271】

事象は連続的であり、したがって $Pr[D > t | E > t] = 1$ に限定される(がんによる死亡は、初回がん事象より先行し得ない)。したがって、

【0272】

【数2】

40

$$S_D(t) = \int_0^t Pr[E = \tau] Pr[D > t | E = \tau] d\tau + Pr[E > t]$$

【0273】

リスクを有する対象の数、並びに進行及び死亡の時間を、Yuら、(2010年; それぞれ図2A及び2B)から得た。打ち切り時間を、これらのアットリスクカウント及び不奏功時間から見積もられた小区分一定ハザードモデルに基づきサンプリングした。

【0274】

50

S'_E の推定値:

$t = t_0$ のとき、条件付き確率の定義から、

【0 2 7 5】

【数 3】

$$S'_E(t, t_0) = \Pr[E > t | E > t_0] = \frac{\Pr[E > t]}{\Pr[E > t_0]} = \frac{S_E(t)}{S_E(t_0)}$$

【0 2 7 6】

S'_D の推定値の上界:

条件付き全生存関数 $S'_D(t') = \Pr[D > t' + t_0 | E > t_0]$ に着目する。

10

t_0 は、Dサンプル空間を分割するので、全確率の公式から、

$$\Pr[D > t] = \Pr[E > t_0] \Pr[D > t | E > t_0] + \Pr[E > t_0] \Pr[D > t | E > t_0]$$

であり、

【0 2 7 7】

【数 4】

$$\Pr[D > t | E > t_0] = \frac{\Pr[D > t] - \Pr[E \leq t_0] \Pr[D > t | E \leq t_0]}{\Pr[E > t_0]} < \frac{\Pr[D > t]}{\Pr[E > t_0]} = \frac{S_D(t)}{S_E(t_0)}$$

【0 2 7 8】

が得られる。

20

要約すると、

【0 2 7 9】

【数 5】

$$S'_D(t') < \frac{S_D(t)}{S_E(t_0)}$$

【0 2 8 0】

である。

上界には、 t_0 までに再発を経験し、 t_0 の時点では生存していた全患者は、原則的に t までに死亡し得る確率(すなわち、 $\Pr[E > t_0] \Pr[D > t | E > t_0] = 0$)が盛り込まれている。上界は信頼限界ではないこと、及び統計的不確実性に関するこことに留意すること。Yulara は、 $S'_D(t')$ の推定値について報告したのであるならば、それは $S_D(t)/S_E(t_0)$ を下回るはずであるということが言えるにすぎない。また、この推定値は、 t_0 に接近した時刻において極めて保守的であることも留意すること。

30

【0 2 8 1】

(E、D) の分布に関するモデル:

2タイプの対象、再発を有さない患者(全患者中の割合 F)とハザードで指數関数的に分布する再発を有する患者の混合を用いて EFS をモデル化し、

$$\Pr[E > t] = F + (1-F)e^{-\alpha t}$$

又は、同じく

【0 2 8 2】

【数 6】

$$\Pr[E = t] = \frac{-d\Pr[E > t]}{dt} = \alpha(1-F)e^{-\alpha t}$$

【0 2 8 3】

OSを、死亡ハザードが λ_1 と λ_2 と異なる2タイプの患者に基づく混合としてモデル化した

40

$$\Pr[D > t | E = t] = e^{-\lambda_1(t-\tau_1)} + (1-F)e^{-\lambda_2(t-\tau_2)}$$

これらを、式1に代入して積分すると、

50

【 0 2 8 4 】

【数 7】

$$Pr[D > t] = \alpha(1-F)[\frac{\rho(e^{-\beta_1 t} - e^{-\alpha t})}{\alpha - \beta_1} + \frac{(1-\rho)(e^{-\beta_2 t} - e^{-\alpha t})}{\alpha - \beta_2}] + F + (1-F)e^{-\alpha t}$$

【 0 2 8 5 】

が得られる。

不定形は、ロピタルの公式を用いて決定され、例えば $\lim_{t \rightarrow 0} \frac{e^{-\alpha t} - 1}{t} = -\alpha$ のとき

$$Pr[D > t] = F + (1-F)(1 + \alpha t)e^{-\alpha t}$$

帰無仮説に基づくNMTRC003全生存、 $S'_D(t) = Pr[D > t | E > t_0]$ は、したがって、

【 0 2 8 6 】

【数 8】

$$S'_D(t') = \frac{\rho\alpha(1-F_{t_0})}{\alpha - \beta_1}(e^{-\beta_1 t'} - e^{-\alpha t'}) + \frac{(1-\rho)\alpha(1-F_{t_0})}{\alpha - \beta_2}(e^{-\beta_2 t'} - e^{-\alpha t'}) + F_{t_0} + (1-F_{t_0})e^{-\alpha t'}$$

【 0 2 8 7 】

であり、但し

【 0 2 8 8 】

【数 9】

$$F_{t_0} = \frac{F}{F + (1-F)e^{-\alpha t_0}}$$

【 0 2 8 9 】

である。

【 0 2 9 0 】

患者の特徴。同意を、全米の臨床施設20箇所で治療を受けるHRNBの患者103例から取得し、94例が治療に対する適格性を有した。これらのうち、全94例が薬物の投与を受け、安全性の分析について適格性を有し、また91例がITT分析について適格性を有した。米国小児がんグループ(Children's Oncology Group)(COG)、メモリアル・スローン・ケタリングがんセンター(Memorial Sloan Kettering Cancer Center)(MSKCC)、及び欧洲小児腫瘍学国際学会神経芽細胞腫グループ(International Society of Pediatric Oncology Europe Neuroblastoma)(SIOPEN)からの患者を含む、ITT母集団内の対象は、様々な標準的なアップフロント治療計画を受けていたが、合計74例の対象がCOG ANBL0032にこれまでに参加し、治療を完了した。

【 0 2 9 1 】

250mgの錠剤サイズに起因する投与上の制約により、実際の処方用量が500～1000mg/m²/用量の間で変化し、平均用量が789mg/m²である投与表を用いた。1例を除き全患者が、全処方用量の少なくとも80%の投与を受けた。

【 0 2 9 2 】

MYCN増幅、倍数性、組織学、及び導入療法に対する応答を含む本発明者らの患者母集団の高リスク特性は、ANBL0032試験母集団(Yuら、2010年)で報告された特性と一致した。すべての対象が、標準療法をいくつか組み合わせて治療を受けたが、対象の15%(14/91)は、初期治療に対して十分な応答を示さず、寛解を実現するのに更なる療法を必要とした。

【 0 2 9 3 】

10

20

30

40

【表10】

Table 10.患者の特徴

特徴	階層1	
平均年齢	4.5	
性別	男性 女性	51 43
人種	白人 黒人又はアフリカ系米国人 アメリカインディアン/アラスカ原住民 ヒスパニック系 アジア系 2つ以上 不明	67 6 2 10 0 3 6
MYCN		増幅有り=45 増幅無し=45 不明=4
組織学		予後不良:43 予後良好=5 不明=46
二倍性		>1=15 =1=14 不明=65
導入後の初期治療に対する応答		CR 24 VGPR 13 PR 18 SD 2 PD 0 不明=37
ASCTの数		0=3 1=79 2=7 不明=5
ANBL0032への参加		74/94=79%
診断からDMFOまでのメジアン時間		1.3年

10

20

30

40

50

【0294】

応答。DFMOの投与を受けたすべての対象において、2年EFSは91%($\pm 4\%$)、及びOSは98%($\pm 2\%$)であった(図6)。27サイクルすべての治療を瑕疵なく完了した対象のいずれも再発することではなく、フォローアップ期間は最長3.5年であった。再発し、その後疾患が原因で死亡した対象1例は、親の過誤により投与量の50%しか投与されなかった。

【0295】

比較として、小児腫瘍学グループANBL0032に由来する公表された生存データを分析した。6ヶ月の抗体+レチノイン酸療法期間中に、ANBL0032で治療を受けた対象の約12%に進行が認められたので、この導入期間中の再発について補正するために、生存曲線を分析した。可能な限り最初期のDFMO治療開始日(ANBL0032治療終了後の第1日目)に始まり、対象がDFMOを開始することができた最終日に至る(レチノイン酸を最終投与した後120日)までの、推定2年EFSは71~76%であった。このベースラインを比較として用いて、これまでにCOG A

NBL0032に参加し、その後DFMOの投与を受けた対象(n=74)では、2年EFSが95%(±3%)に有意に改善した。これまでにANBL0032に参加した患者のOSは、98%(±2%)であり、このOSも、上界及び/又はパラメトリックモデルに基づいたANBL0032データと比較して改善した(図6C)。

【0296】

ANBL0032に参加し、免疫療法開始前のキュリースコアが0を上回った対象の3年EFSは28.9%±6.8%であり、キュリースコアが0であった対象の3年EFSの71%よりも有意に悪化した(Yanikら、2013年)。ANBL0032で治療を受け、その後にDFMOが続いた本発明者らの対象の評価は、キュリースコアが0を上回る対象(キュリースコアが既知の対象52例中n=4)は、寛解状態に留まることを示唆する。

10

【0297】

今日までに再発したITT母集団の対象6例の更なる分析では、4例がこれまでにANBL0032に参加した;他の2例はCOGプロトコールに基づく治療を受けなかった。ANBL0032に従い治療を受けた対象1例は、次にこの試験に参加する前に、単一薬剤のイソトレチノインにより更に6ヶ月間治療を受けた。対象1例が、MSKCCプロトコールに基づき3F8抗体を1ヶ月毎に8回投与され、DFMO開始前、更に120日間遅延した。したがって、これらの両対象では、再発しなかった患者と比較してDFMOの開始が4~6ヶ月遅延した。別の対象はDFMO投与量の50%の投与を受けた。対象1例は、SIOPプロトコールに従ってDFMO事前療法を受けた。したがって、これらの患者6例のうち2例のみが、ANBL0032試験患者と直接比較可能なDFMO事前治療を有し、また5サイクルの抗体及び1サイクルのイソトレチノインを完了した後、120日以内に治療を開始し、処方用量のDFMOの投与を受けた。

20

【0298】

有害事象。DFMOは、良好な忍容性を示した;母集団の67%で、関連する有害事象が2年間にわたり一切報告されなかった。グレード2~3の高トランスアミナーゼ血症が最も一般的な毒性であったが、ほとんどはDFMOを保持しなくても消散した(Table 11(表11))。試験に参加した患者の76パーセントが、前回治療に起因する既存の聴覚消失を有した。それらの患者のうち、聴覚消失の増加が患者4例に認められた。すべての症例が、薬物治療を保持した後、ベースラインに復帰した。2つの症例は14日以内に消散し、そして薬物は初期の用量で再開されたが、他の対象2例では、14日を超えた後に回復が生じ、両者は低用量レベルで再開した。すべての患者は、DFMOを継続可能であったが、また有害事象を問わず試験を完了することができた。

30

【0299】

試験では、嘔吐及び下痢を引き起こしたウイルス感染を有し、終夜G管供給に耐えることができなかつた小児において、低血糖症に関するSAE 1件のみが報告された。翌朝、該小児は無反応となり、低血糖であることが判明した;グルコースの投与により症状は速やかに回復し、そして該小児は全快した。プロトコールに従ってDFMOの用量を減量し、そしてこの対象は、再発又はその他の有害事象を認めることなく試験を継続した。

【0300】

【表11】

Table 11.DFMOに起因する(おそらくは、ほぼ、又は確実に)階層1有害事象

	n=94	グレード2	グレード3	グレード4	グレード5
血液学的毒性効果					
貧血症	4 (4%)	0	0	0	
好中球数減少	4 (4%)	3 (3%)	0	0	
血小板数減少	2 (2%)	0	0	0	
白血球数減少	2 (2%)	0	0	0	
非血液学的毒性効果					
興奮	1 (1%)	0	0	0	
脱毛症	1 (1%)	0	0	0	
ALT上昇	3 (3%)	5 (5%)	0	0	
AST上昇	3 (3%)	4 (4%)	0	0	
無食欲	1 (1%)	0	0	0	
下痢	5 (5%)	0	0	0	
発熱	2 (2%)	0	0	0	
聴覚消失	2 (2%)	4 (4%)	0	0	
低血糖症	0	0	1 (1%)	0	
低カリウム血症	0	2 (2%)	0	0	
感染症、その他	2 (2%)	0	0	0	
感染、中耳炎	2 (2%)	0	0	0	
INR上昇	1 (1%)	0	0	0	
疼痛	2 (2%)	0	0	0	
後鼻漏	1 (1%)	0	0	0	
発疹	1 (1%)	0	0	0	
体重増加	1 (1%)	0	0	0	

割合(%)は、事象が認められた患者数を薬物投与群内の患者数で割り算して求めた。

ALT=アラニンアミノトランスフェラーゼ

AST=アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ

【0301】

本明細書で開示及び特許請求する方法はいずれも、本開示に照らし、過度の実験を行わずとも創出及び実行可能である。本開示は、いくつかの実施形態に重点が置かれる場合があり、又は好ましい実施形態に関して記載されている場合もあるが、本発明の精神、範囲及び概念から逸脱することなく該方法に対して変更及び改変を加えることができることは、当業者にとって明白である。当業者にとって明白なすべての変更及び改変は、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の精神、適用範囲及び概念に含まれるとみなされる。

【0302】

XV. 参考文献

以下の参考文献は、本明細書に規定されるものを補足する例示的な手順上の又は他の詳細を提供する範囲において、参照により本明細書に具体的に組み込まれている。

(参考文献)

10

20

30

40

U.S. Patent 4,330,559

U.S. Patent 4,413,141

U.S. Patent 4,582,788

U.S. Patent 4,683,194

U.S. Patent 4,683,202

U.S. Patent 4,656,127

U.S. Patent 5,952,174

U.S. Patent 6,258,845

U.S. Patent 6,451,995

U.S. Patent 8,278,065

U.S. Patent 8,507,657

10

U.S. Patent Appln. Publn. 20130216528

U.S. Patent Appln. Publn. 20140170155

20

European Patent Application 50,424

European Patent Application 84,796

European Patent Application 258,017

European Patent Application 237,362

European Patent Application 201,184

French Patent 2,650,840

PCT Application WO91/02087

30

PCT Application WO92/15712

PCT Application WO2014/144763

AACR 2009, Abstract #3203

AACR 2009, Abstract #3208

Alice et al., Update of Outcome for High-Risk Neuroblastoma Treated on a Randomized Trial of chimeric Anti-GD2 Antibody (ch14.18) +GM-CSF / IL2 Immunotherapy in 1st Response: A Children's Oncology Group Study. Advances in Neuroblastoma Research Association 2014.

Alirol et al., Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage gambiense human African trypanosomiasis: Medecins Sans Frontieres experience in the Democratic Republic of the Congo, *Clin. Infect. Dis.*, 56:195-203, 2013.

10

Ater et al., Neuroblastoma screening in the United States: results of the Texas Outreach Program for neuroblastoma screening. *Cancer*, 82:1593-1602, 1998.

Auvinen et al., Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation, *Nature*, 360:355-358, 1992.

Auvinen et al., Ornithine decarboxylase- and ras-induced cell transformations: reversal by protein tyrosine kinase inhibitors and role of pp130CAS, *Mol. Cell Biol.*, 15:6513-6525, 1995.

20

Auvinen et al., Transcriptional regulation of the ornithine decarboxylase gene by c-Myc/Max/Mad network and retinoblastoma protein interacting with c-Myc, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 35:496-521, 2003.

Babbar et al., Inflammation and polyamine catabolism: the good, the bad and the ugly, *Biochem. Soc. Trans.*, 35:300-304, 2007.

Bachmann, The role of polyamines in human cancer: prospects for drug combination therapies, *Hawaii Med. J.*, 63:371-374, 2004.

30

Bachmann et al., "Neuroblastoma: Ornithine decarboxylase and polyamines are novel targets for therapeutic intervention," In: Pediatric Cancer, Neuroblastoma: Diagnosis, Therapy, and Prognosis, Hayat, editor, Springer, pp. 91-103, 2012.

Bailey et al., A randomized, double-blind, placebocontrolled phase 3 skin cancer prevention study of {alpha}-difluoromethylornithine in subjects with previous history of skin cancer, *Cancer Prev. Res. (Phila.)*, 3:35-47, 2010.

Bello-Fernandez et al., The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:7804-7808, 1993.

Ben-Yosef et al., Involvement of Myc targets in c-myc and N-myc induced human tumors, *Oncogene*, 17:165-171, 1998.

40

Berthold, et al., Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 6(9):649-658, 2005.

- Blume-Peytavi and Hahn, Medical treatment of hirsutism, *Dermatol. Ther.*, 21:329-339, 2008.
- Bosslet et al., Monoclonal antibodies against epitopes on ganglioside GD2 and its lactones. Markers for gliomas and neuroblastomas. *Cancer Immunol. Immunother.*, 29:171-178, 1989.
- Boyle et al., Polyamine contents in rectal and buccal mucosae in humans treated with oral difluoromethylornithine, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 1:131-135, 1992. 10
- Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.*, 72:248-254, 1976.
- Brant et al., Risk factors related to age-associated hearing loss in the speech frequencies, *J. Am. Acad. Audiol.*, 7:152-160, 1996.
- Brodeur, Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*, 3:203-216, 2003.
- Brown et al., Genetic polymorphism in ornithine decarboxylase and risk of breast cancer, *Fam. Cancer*, 8:307-311, 2009. 20
- Carbone et al., Bioavailability study of oral liquid and tablet forms of alpha-difluoromethylornithine, *Clinical Cancer Research*, 6:3850-3854, 2000.
- Carbone et al., Phase I chemoprevention study of difluoromethylornithine in subjects with organ transplants, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10:657-661, 2001.
- Casero and Marton, Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 6:373-390, 2007.
- Chaffer and Weinberg, How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer Discovery*, 5:22-24, 2015. 30
- Chapman, Antitumor effects of vitamin A and inhibitors of ornithine decarboxylase in cultured neuroblastoma and glioma cells, *Life Sci.*, 26:1359-1661, 1980.
- Chen et al., Effects of inhibitors of ornithine decarboxylase on the differentiation of mouse neuroblastoma cells, *Cancer Res.*, 43:2812-2818, 1983.
- Cheung et al., Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 5(9):1430-1440, 1987. 40
- Cheung et al., 3F8 monoclonal antibody treatment of patients with stage 4 neuroblastoma: a phase II study. *Int. J. Oncol.*, 12:1299-1306, 1998.

- Cheung, et al., Murine anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 13-cis-retinoic acid in high-risk patients with stage 4 neuroblastoma in first remission. *J Clin Oncol*, 30(26):3264-3270, 2012.
- Choi et al., Addiction to multiple oncogenes can be exploited to prevent the emergence of therapeutic resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111:E3316-3324, 2014.
- Chopra and Wallace, Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species, *Biochem. Pharmacol.*, 55:1119-1123, 1998. 10
- Croghan et al., Dose-related alpha-difluoromethylornithine ototoxicity, *Am. J. Clin. Oncol.*, 14:331-315, 1991.
- Cruickshanks et al., The 5-year incidence and progression of hearing loss: the epidemiology of hearing loss study, *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 129:1041-1046, 2003.
- de Arruda et al., *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2:487-496, 2002.
- Dorr et al., Modulation of etoposide cytotoxicity and DNA strand scission in L1210 and 8226 cells by polyamines, *Cancer Res.*, 46:3891-3895, 1986. 20
- Doyle et al., Effects of DFMO chemoprevention on audiology thresholds and otoacoustic emissions, *Arch. Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 127:553-558, 2001.
- Erdman et al., *Carcinogenesis*, 20:1709-1713, 1999.
- Ernestus et al., Polyamine metabolism in brain tumours: diagnostic relevance of quantitative biochemistry, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 71:88-92, 2001.
- Eskens et al., Phase I and pharmacological study of weekly administration of the polyamine synthesis inhibitor SAM 486A (CGP 48 664) in patients with solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer Early Clinical Studies Group, *Clin. Cancer Res.*, 6:1736-1743, 2000. 30
- Evageliou and Hogarty, Disrupting polyamine homeostasis as a therapeutic strategy for neuroblastoma, *Clin. Cancer Res.*, 15:5956-5961, 2009.
- Fabian et al., A phase II breast cancer chemoprevention trial of oral alpha-difluoromethylornithine: breast tissue, imaging, and serum and urine biomarkers, *Clin. Cancer Res.*, 8:3105-3117, 2002.
- Fuller et al., Polyamine biosynthesis and accumulation during the G1 to S phase transition, *J. Cell Physiol.*, 93:81-88, 1977. 40
- Gamble et al., Polyamine pathway inhibition as a novel therapeutic approach to treating neuroblastoma, *Front. Oncol.*, 2:162, 2012.

Garcia-Huidobro et al., Functional consequence of genetic variability in a G-quadruplex structure in the ornithine decarboxylase (*odc1*) gene. *Nucleic Acids Research*, submitted, 2014a.

Garcia-Huidobro et al., Intron 1 polymorphisms cooperate to modulate *odc1* transcriptional activity and risk of colorectal adenomas. *Cancer Research*, submitted, 2014b.

Garcia-Huidobro, Molecular and Functional Consequences of Genetic Variability in the Ornithine Decarboxylase Gene in Colorectal Cancer, University of Arizona Dissertation, 2013. 10

Geerts et al., The polyamine metabolism genes ornithine decarboxylase and antizyme 2 predict aggressive behavior in neuroblastomas with and without MYCN amplification, *Int. J. Cancer*, 126:2012-2024, 2010.

Gerner et al., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 3:325-330, 1994.

Gerner and Meyskens, Polyamines and cancer: old molecules, new understanding, *Nature Reviews Cancer*, 4:781-792, 2004.

Gilad et al., Serum microRNAs are promising novel biomarkers, *PLoS ONE*, 3:e3148, 2008. 20

Gilbert et al., An ion-exchange chromatography procedure for the isolation and concentration of basic amino acids and polyamines from complex biological samples prior to high-performance liquid chromatography, *Anal Biochem.*, 199:86-92, 1991.

Griffin, et al., Phase I trial and pharmacokinetic study of intravenous and oral alpha-difluoromethylornithine. *Invest New Drugs*, 5(2):177-86, 1987.

Haegele et al., Decarboxylated-S-adenosylmethionine excretion: a biochemical marker of ornithine decarboxylase inhibition by alpha-difluoromethylornithine, *Cancer Res.*, 47:890-895, 1987. 30

Halushka et al., *Nat. Genet.*, 22:239-247, 1999.

Harras, Cancer Rates and Risks, National Cancer Institute, NIH Publication, pp.96-691, 1996.

Heby, Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation, *Differentiation*, 19:1-20, 1981.

Heby and Persson, Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells, *Trends Biochem. Sci.*, 15:153-158, 1990.

Hiramatsu et al., N(1),N(12)-Diacetylspermine as a sensitive and specific novel marker for early- and late-stage colorectal and breast cancers, *Clinical Cancer Research*, 11:2986-2990, 2005. 40

Hixson, et al., Ornithine decarboxylase and polyamines in colorectal neoplasia and mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2(4):369-374, 1993.

Hixson et al., Sources of variability in estimating ornithine decarboxylase activity and polyamine contents in human colorectal mucosa, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 3:317-323, 1994.

Hogarty et al., ODC1 is a critical determinant of MYCN oncogenesis and a therapeutic target in neuroblastoma, *Cancer Res.*, 68:9735-9745, 2008.

Inoue et al., Simultaneous determination of free and N-acetylated polyamines in urine by semimicro high-performance liquid chromatography using 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride as a fluorescent labeling reagent, *Anal Biochem.*, 339:191-197, 2005.

10

Johnson et al., *Nat. Genet.*, 29:233-237, 2001.

Kaczmarek et al., Cell-cycle-dependent expression of human ornithine decarboxylase, *J. Cell Physiol.*, 132:545-551, 1987.

Kahana and Nathans, Isolation of cloned cDNA encoding mammalian ornithine decarboxylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3645-3649, 1984.

Kawakita et al., Determination of N(1),N(1)(2)-diacetylspermine in urine: a novel tumor marker, *Methods Mol. Biol.*, 720:367-378, 2011.

20

Ke and Cardon, *Bioinformatics*, 19:287-288, 2003.

Komher et al., *Nucl. Acids Res.*, 17:7779-7784, 1989.

Koomoa et al., Ornithine Decarboxylase Inhibition by {alpha}-Difluoromethylornithine Activates Opposing Signaling Pathways via Phosphorylation of Both Akt/Protein Kinase B and p27Kip1 in Neuroblastoma, *Cancer Res.*, 68:9825-9831, 2008.

Koomoa et al., DFMO/eflornithine inhibits migration and invasion downstream of MYCN and involves p27Kip1 activity in neuroblastoma, *Int. J. Oncol.*, 42:1219-1228, 2013.

30

Koomoa et al., Inhibition of S-adenosylmethionine decarboxylase by the competitive inhibitor SAM486A connects polyamine metabolism with p53-Mdm2-Akt/PKB regulation and apoptotic cell death in neuroblastoma, *Molecular Cancer Therapeutics*, 8:2067-2075, 2009.

Kuppuswamy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1143-1147, 1991.

Kushner et al., Ifosfamide, carboplatin, and etoposide for neuroblastoma: a high-dose salvage regimen and review of the literature, *Cancer*, 119:665-671, 2013.

Kushner et al., Oral Etoposide for Refractory and Relapsed Neuroblastoma, *JCO*, 17:3221-3225, 1999.

40

- Kushner et al., Successful multifold dose escalation of anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 in patients with neuroblastoma: a phase I study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(9):1168-1174, 2011.
- Kwok and Chen, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 5:43-60, 2003.
- Kwok et al., *Genomics*, 23:138-144, 1994.
- Kwok, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2:235-258, 2001.
- Landegren et al., *Science*, 241:1077-1080, 1988. 10
- Lange et al., Novel interaction of ornithine decarboxylase with sepiapterin reductase regulates neuroblastoma cell proliferation, *J. Mol. Biol.*, 426:332-346, 2014.
- Laverdiere, et al., Long-term outcomes in survivors of neuroblastoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst*, 101(16):1131-1140, 2009.
- Levin et al., Phase III randomized study of postradiotherapy chemotherapy with combination alpha-difluoromethylornithine-PCV versus PCV for anaplastic gliomas, *Clin. Cancer Res.*, 9:981-990, 2003. 20
- Levin et al., Phase III randomized study of postradiotherapy chemotherapy with alpha-difluoromethylornithine-procarbazine, N-(2-chloroethyl)-N'-cyclohexyl-N-nitrosurea, vincristine (DFMO-PCV) versus PCV for glioblastoma multiforme, *Clin. Cancer Res.*, 6:3878-3884, 2000.
- Love et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 85:732-737, 1993.
- Love et al., A randomized, placebo-controlled trial of low-dose alpha-difluoromethylornithine in individuals at risk for colorectal cancer, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 7:989-992, 1998.
- Lozier, et al., Targeting ornithine decarboxylase reverses the LIN28/Let-7 axis and inhibits glycolytic metabolism in neuroblastoma. *Oncotarget*, 6(1):196-206, 2015. 30
- Lu et al., The MYCN oncoprotein as a drug development target, *Cancer Lett.*, 197:125-130, 2003.
- Lu et al., *Eukaryot. Cell*, 3:1544-1556, 2004.
- Lutz et al., Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells, *Oncogene*, 13:803-812, 1996. 40
- Mamont et al., Anti-proliferative properties of DL-alpha-difluoromethyl ornithine in cultured cells. A consequence of the irreversible inhibition of ornithine decarboxylase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81:58-66, 1978.

- Maris, Recent advances in neuroblastoma, *N. Engl. J. Med.*, 362:2202-2211, 2010.
- Martin, et al., Secondary malignant neoplasms after high-dose chemotherapy and autologous stem cell rescue for high-risk neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 61(8):1350-1356, 2014.
- Martinez et al., Pronounced reduction in adenoma recurrence associated with aspirin use and a polymorphism in the ornithine decarboxylase gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:7859-7864, 2003.
- Marton and Morris, Molecular and cellular functions of polyamines. In: Inhibition of Polyamine Metabolism: Biological Significance and Basis for New Therapies, McCann et al., editors, New York: Academic Press, pp. 79-105, 1987.
- Marton and Pegg, Polyamines as targets for therapeutic intervention, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35:55-91, 1995.
- Maxam, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:560, 1977.
- McCann and Pegg, Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy, *Pharmacol. Ther.*, 54:195-215, 1992.
- McLaren et al., *Cancer Prev. Res.*, 1:514-521, 2008.
- Meier, E.L.K.a.P., Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282):457-481, 1958.
- Melino et al., Correlation between transglutaminase activity and polyamine levels in human neuroblastoma cells. Effect of retinoic acid and alpha-difluoromethylornithine, *Exp. Cell Res.*, 179:429-445, 1988.
- Melino et al., Retinoic acid and alpha-difluoromethylornithine induce different expression of neural-specific cell adhesion molecules in differentiating neuroblastoma cells, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 366:283-291, 1991.
- Metcalf et al., Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C. 4.1.1.17) by substrate and product analogs, *J. Am. Chem. Soc.*, 100:2551-2553, 1978.
- Meyskens et al., Dose de-escalation chemoprevention trial of 2 difluoromethylornithine in patients with colon polyps, *J. Natl. Cancer Inst.*, 86:1122-1130, 1994.
- Meyskens et al., A Randomized Double-Blind Placebo Controlled Phase IIb Trial of Difluoromethylornithine for Colon Cancer Prevention, *Journal of the National Cancer Institute*, 90:1212-1218, 1998.
- Meyskens and Gerner, Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent, *Clin. Cancer Res.*, 5:945-951, 1999.

10

20

30

40

Meyskens et al., Difluoromethylornithine plus sulindac for the prevention of sporadic colorectal adenomas: a randomized placebo-controlled, double-blind trial, *Cancer Prev. Res. (Phila.)*, 1:32-38, 2008.

Modak and Cheung, Neuroblastoma: Therapeutic strategies for a clinical enigma, *Cancer Treat. Rev.*, 36:307-317, 2010.

Mohan et al., Overexpression of ornithine decarboxylase in prostate cancer and prostatic fluid in humans, *Clin. Cancer Res.*, 5:143-147, 1999.

10

Mullis et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263-273, 1986.

Nickerson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:8923-8927, 1990.

Norris et al., The ornithine decarboxylase G317A polymorphism is prognostic of outcome in primary neuroblastoma and differentially affects promoter binding by the MYCN oncogene, *Advances in Neuroblastoma Research*, Abstract OR059:140, 2014.

Nyren et al., *Anal. Biochem.*, 208:171-175, 1993.

Paridaens et al., A phase I study of a new polyamine biosynthesis inhibitor, SAM486A, in cancer patients with solid tumours, *Br. J. Cancer*, 83:594-601, 2000.

20

Park et al., Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma, *Pediatr. Blood Cancer*, 60:985-993, 2013.

Pasic et al., Alpha-difluoromethylornithine ototoxicity. Chemoprevention clinical trial results, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 123:1281-1286, 1997.

Pauk et al., Positive effects of tactile versus kinesthetic or vestibular stimulation on neuroendocrine and ODC activity in maternally-deprived rat pups. *Life Sciences*, 39(22):2081-2087, 1986.

Pegg and Feith, Polyamines and neoplastic growth, *Biochem. Soc. Trans.*, 35:295-299, 2007.

30

Pegg, Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes, *Biochem. J.*, 234:249-262, 1986.

Pegg, Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy, *Cancer Res.*, 48:759-774, 1988.

Pena et al., Regulation of human ornithine decarboxylase expression by the c-Myc.Max protein complex, *J. Biol. Chem.*, 268:27277-27285, 1993.

Pendeville et al., The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Molecular and Cellular Biology*, 21(19):6549-6558, 2001.

40

Pendyala et al., Urinary and erythrocyte polyamines during the evaluation of oral alpha-difluoromethylornithine in a phase I chemoprevention clinical trial, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2:235-241, 1993.

Pless et al., Clinical efficacy, tolerability, and safety of SAM486A, a novel polyamine biosynthesis inhibitor, in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma: results from a phase II multicenter study, *Clin. Cancer Res.*, 10:1299-1305, 2004.

Porter et al., Polyamine inhibitors and analogs as potential anticancer agents. In: Falk symposium on polyamines in the gastrointestinal tract. Dowling et al., editors. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 301-22, 1992.

Poulin et al., Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alpha-difluoromethylornithine. Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites, *J. Biol. Chem.*, 267:150-158, 1992.

Prezant et al., *Hum. Mutat.*, 1:159-164, 1992.

Priotto et al., Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African Trypanosoma brucei gambiense trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial, *Lancet*, 374:56-64, 2009.

Pugh et al., The genetic landscape of highrisk neuroblastoma, *Nat. Genet.*, 45:279-284, 2013.

Rounbehler et al., Targeting ornithine decarboxylase impairs development of MYCN-amplified neuroblastoma, *Cancer Res.*, 69:547-553, 2009.

Russell and Levy, Polyamine accumulation and biosynthesis in a mouse L1210 leukemia, *Cancer Res.*, 31:248-251, 1971.

Samal et al., AMXT-15, a novel polyamine transport inhibitor, synergizes with DFMO in inhibiting cell proliferation by targeting both ornithine decarboxylase and polyamine transport, *Int. J. Cancer*, 133:1323-1333, 2013.

Sanger et al., *J. Molec. Biol.*, 94:441, 1975.

Santana et al., Disease control intervals in high-risk neuroblastoma, *Cancer*, 112:2796-2801, 2008.

Saulnier Sholler et al., A Phase I Trial of DFMO Targeting Polyamine Addiction in Patients with Relapsed/Refractory Neuroblastoma. *PLoS One*, 10:e0127246, 2015.

Schanberg et al., PKC alpha mediates maternal touch regulation of growth-related gene expression in infant rats. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 28(6):1026-1030, 2003.

Schiavetti et al., Ten-day schedule oral etoposide therapy in advanced childhood malignancies, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 22:119-24, 2000.

Seeger et al., Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas, *N. Engl. J. Med.*, 313:1111-1116, 1985.

10

20

30

40

Seiler et al., Polyamine metabolism as target for cancer chemoprevention (review), *Int. J. Oncol.*, 13:993-1006, 1998.

Sholler et al., A Phase 1 Trial of DFMO as a Single Agent and in Combination with Etoposide in Patients with Refractory or Recurrent Neuroblastoma, *Proc. AACR Annual Meeting*, Abstract LB-179, 2013.

Silva et al., Role of peripheral polyamines in the development of inflammatory pain. *Biochemical Pharmacology*, 82(3):269-277, 2011.

10

Silvestri et al., Oxycodone controlled-release as first-choice therapy for moderate-to-severe cancer pain in Italian patients: results of an open-label, multicentre, observational study. *Clinical Drug Investigation*, 28(7):399-407, 2008.

Simon, et al., The incidence of hearing impairment after successful treatment of neuroblastoma. *Klin Padiatr*, 214(4):149-152, 2002.

Simon, et al., Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 22(17):3549-3557, 2004.

20

Simoneau et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 93:57-59, 2001.

Simoneau et al., The effect of difluoromethylornithine on decreasing prostate size and polyamines in men: results of a year-long phase IIb randomized placebo-controlled chemoprevention trial, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 17:292-299, 2008.

Siu et al., A phase I and pharmacokinetic study of SAM486A, a novel polyamine biosynthesis inhibitor, administered on a daily-times-five every-three-week schedule in patients with Advanced solid malignancies, *Clin. Cancer Res.*, 8:2157-2166, 2002.

30

Slack et al., The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:731-736, 2005.

Slart et al., An animal model of pain produced by systemic administration of an immunotherapeutic anti-ganglioside antibody. *Pain*, 69(1-2):119-125, 1997.

Small et al., *N. Engl. J. Med.*, 347:1135-1142, 2002.

Soda, The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 30:95, 2011.

Sokolov, *Nucl. Acids Res.*, 18:3671, 1990.

40

Sorkin et al., Antibody directed against GD(2) produces mechanical allodynia, but not thermal hyperalgesia when administered systemically or intrathecally despite its dependence on capsaicin sensitive afferents. *Brain Research*, 930(1-2):67-74, 2002.

- Sorkin et al., Anti-GD(2) with an FC point mutation reduces complement fixation and decreases antibody-induced allodynia. *Pain*, 149(1):135-142, 2010.
- Stevens et al., *Biotechniques*, 34:198-203, 2003.
- Strejan et al., *Cell Immunol.*, 84:171-184, 1984.
- Syvanen et al., *Genomics*, 8:684-692, 1990.
- Tabor and Tabor, Polyamines, *Annu. Rev. Biochem.*, 53:749-790, 1984.
- Takahashi et al., alpha-difluoromethylornithine induces apoptosis as well as anti-angiogenesis in the inhibition of tumor growth and metastasis in a human gastric cancer model, *Int. J. Cancer*, 85:243-247, 2000. 10
- Therasse et al., New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada, *J. Natl. Cancer Inst.*, 92:205-216, 2000.
- Thompson et al., Levels of rectal mucosal polyamines and prostaglandin E2 predict ability of DFMO and sulindac to prevent colorectal adenoma, *Gastroenterology*, 139:797-805, 805 e791, 2010. 20
- Uemura et al., Identification and characterization of a diamine exporter in colon epithelial cells, *J. Biol. Chem.*, 283:26428-26435, 2008.
- Uemura et al., Polyamine transport is mediated by both endocytic and solute carrier transport mechanisms in the gastrointestinal tract, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 299:G517-522, 2010.
- Ugozzoli et al., *GATA*, 9:107-112, 1992.
- van Zuylen et al., Phase I and pharmacokinetic study of the polyamine synthesis inhibitor SAM486A in combination with 5-fluorouracil/leucovorin in metastatic colorectal cancer, *Clin. Cancer Res.*, 10:1949-1955, 2004. 30
- Visvanathan et al., Association among an ornithine decarboxylase polymorphism, androgen receptor gene (CAG) repeat length and prostate cancer risk, *J. Urol.*, 171:652-655, 2004.
- Wagner et al., c-Myc induces the expression and activity of ornithine decarboxylase, *Cell Growth Differ.*, 4:879-883, 1993.
- Wainwright et al., Distinct mechanisms of cell cycle arrest control the decision between differentiation and senescence in human neuroblastoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98:9396-9400, 2001. 40

Wallace et al., Intravenous lidocaine: effects on controlling pain after anti-GD2 antibody therapy in children with neuroblastoma--a report of a series. *Anesthesia and Analgesia*, 85(4):794-796, 1997.

Wallace et al., A perspective of polyamine metabolism, *Biochem. J.*, 376:1-14, 2003.

Wallick et al., Key role for p27Kip1, retinoblastoma protein Rb, and MYCN in polyamine inhibitor-induced G1 cell cycle arrest in MYCN-amplified human neuroblastoma cells, *Oncogene*, 24:5606-5618, 2005.

10

Wang et al., Neonatal deprivation of maternal touch may suppress ornithine decarboxylase via downregulation of the proto-oncogenes c-myc and max. *The Journal of Neuroscience*, 16(2):836-842, 1996.

Wang et al., Cloning and characterization of a human polyamine oxidase that is inducible by polyamine analogue exposure, *Cancer Res.*, 61:5370-5373, 2001.

Weinstein and Joe, Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy, *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 3:448-457, 2006.

20

Weinstein and Joe, Oncogene addiction, *Cancer Res.*, 68:3077-3080, discussion 3080, 2008.

Weiss et al., Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *The EMBO Journal*, 16(11):2985-2995, 1997.

Witherspoon et al., Unbiased metabolite profiling indicates that a diminished thymidine pool is the underlying mechanism of colon cancer chemoprevention by alpha-difluoromethylornithine, *Cancer Discov.*, 3:1072-1081, 2013.

Xie et al., Characterization of a diamine exporter in Chinese hamster ovary cells and identification of specific polyamine substrates, *J. Biol. Chem.*, 272:20484-20489, 1997.

30

Yanik, et al., Semiquantitative mIBG scoring as a prognostic indicator in patients with stage 4 neuroblastoma: a report from the Children's oncology group. *J Nucl Med*, 54(4):541-548, 2013.

Yu et al., Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma, *N. Engl. J. Med.*, 363:1324-1334, 2010.

Zell et al., Associations of a polymorphism in the ornithine decarboxylase gene with colorectal cancer survival, *Clin. Cancer Res.*, 15:6208-6216, 2009.

40

Zell et al., Ornithine decarboxylase-1 polymorphism, chemoprevention with eflornithine and sulindac, and outcomes among colorectal adenoma patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(19):1513-1516, 2010.

【図 1】

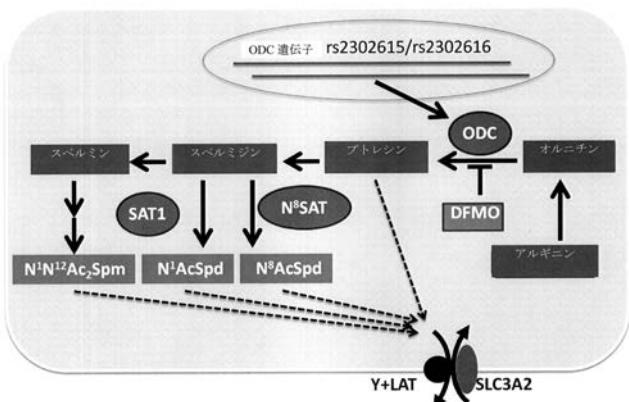


FIG. 1

【図 2】

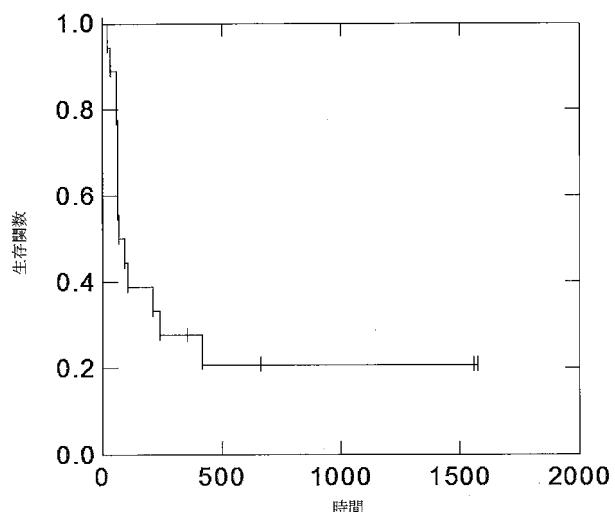


FIG. 2

【図 3】

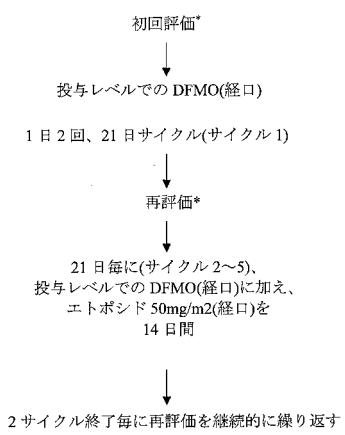


FIG. 3

【図 4】

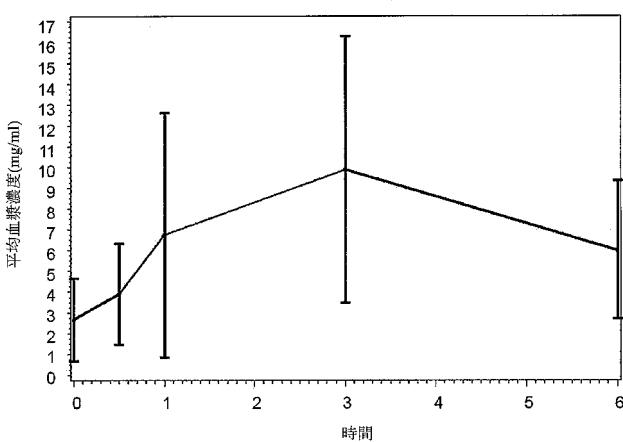


FIG. 4

【図5】

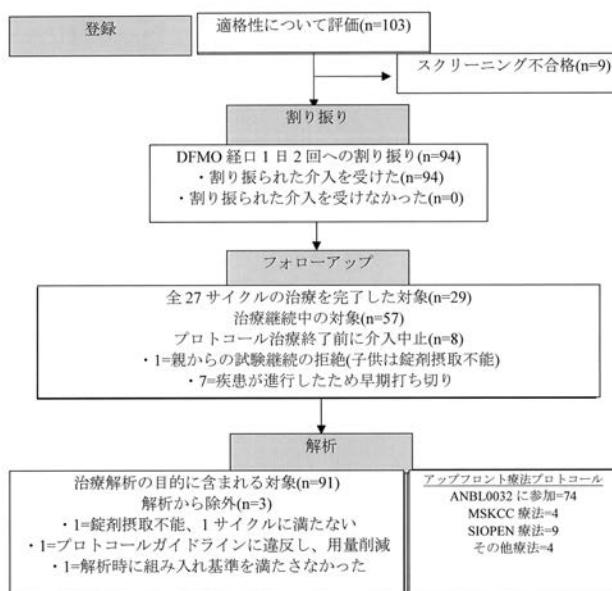


FIG. 5

【図6A】

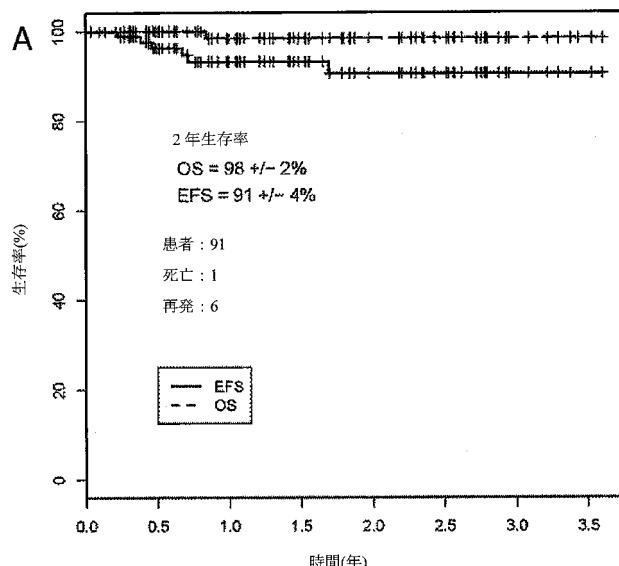


FIG. 6A

【図6B】

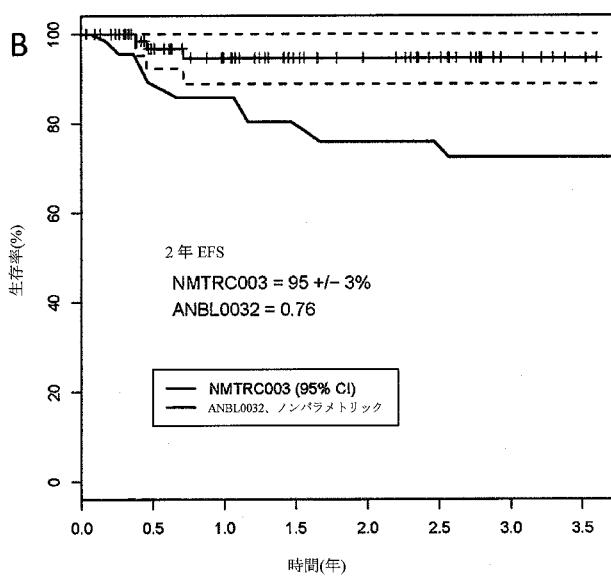


FIG. 6B

【図6C】

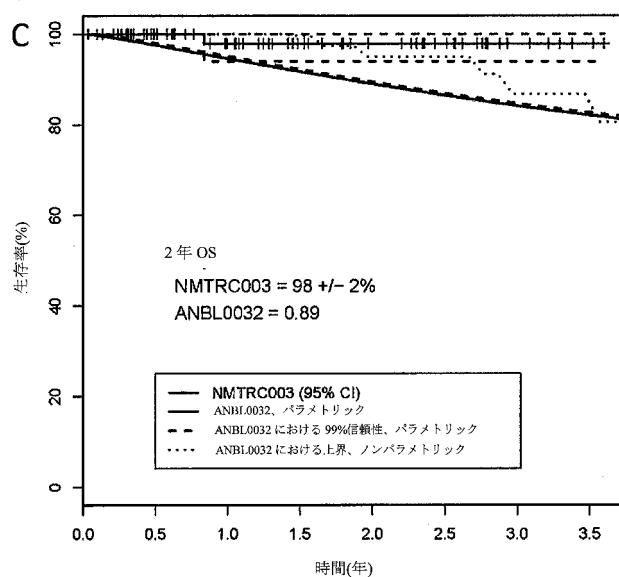


FIG. 6C

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US16/17751
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 31/192; C12Q 1/68 (2016.01) CPC - A61K 31/192, 31/415; C12Q 1/68, 1/6886 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 31/192; C12Q 1/00, 1/68 (2016.01) CPC: A61K 31/192, 31/415; C12Q 1/68, 1/6886; G01N 33/57419		
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) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); EBSCO Discovery; PubMed; Google Scholar; Google Patents; KEYWORDS: neuroblastoma administer DFMO ODC1 allele		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2013/0164751 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) June 27, 2013; abstract; paragraphs [0008], [0015], [0036], [0039], [0046], [0047], [0103]; claims 15, 27	1-4, 11-12, 131/1, 132/131/1, 133/132/131/1, 134/133/132/131/1, 135/132/131/1, 137/135/132/131/1, 138/131/1, 139/131/1, 140/131/1, 141/2, 142/2, 143/131/1, 144/143/131/1, 149/3 5-10, 13-80, 131/15, 131/36, 131/56, 132/131/15, 132/131/36, 132/131/56, 133/132/131/15, 133/132/131/36, 133/132/131/56, 134/133/132/131/15, 134/133/132/131/36, 134/133/132/131/56, 135/132/131/15, 136/132/131/1, 135/132/131/36, 135/132/131/56, 136/132/131/15, ...cont. next page...
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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		
Date of the actual completion of the international search 14 June 2016 (14.06.2016)		Date of mailing of the international search report 14 JUL 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/17751

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2013/0164751 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) June 27, 2013; abstract; paragraphs [0008], [0015], [0036], [0039], [0046], [0047], [0103]; claims 15, 27 ...cont. from prev. page... 136/132/131/36, 136/132/131/56, 137/135/132/131/15, 137/135/132/131/36, 137/135/132/131/56, 138/131/15, 138/131/36, 138/131/56, 139/131/15, 139/131/36, 139/131/56, 140/131/15, 140/131/36, 140/131/56, 141/26, 141/46, 141/71, 142/26, 142/46, 142/71, 143/131/15, 143/131/36, 143/131/56, 144/143/131/15, 144/143/131/36, 144/143/131/56, 149/27, 149/47, 149/72	
Y	US 2011/0256161 A1 (BURNS, M et al.) October 20, 2011; paragraph [0012]	5, 29, 49, 74
Y	US 2013/0157972 A1 (CHENG, J et al.) June 20, 2013; abstract; paragraphs [0172], [0180]	6-8, 30-32, 50-52, 75-77
Y	US 2012/0259013 A1 (MOTWANI, S et al.) October 11, 2012; abstract; paragraphs [0008], [0018], [0027]	9-10, 33-34, 53-54, 78-79
Y	US 2010/0197718 A1 (PISANO, C et al.) August 05, 2010; abstract; paragraph [0028]	13-14, 136/132/131/1, 136/132/131/15, 136/132/131/36, 136/132/131/56
Y	US 2002/0081611 A1 (O'BRIEN, T et al.) June 27, 2002; abstract; paragraphs [0014], [0027]; claim 1	15-80, 131/15, 131/36, 131/56, 132/131/15, 132/131/36, 132/131/56, 133/132/131/15, 133/132/131/36, 133/132/131/56, 134/133/132/131/15, 134/133/132/131/36, 134/133/132/131/56, 135/132/131/15, 136/132/131/1, 136/132/131/36, 135/132/131/56, 136/132/131/56, 137/135/132/131/15, 137/135/132/131/36, 137/135/132/131/56, 138/131/15, 138/131/36, 138/131/56, 139/131/15, 139/131/36, 139/131/56, 140/131/15, 140/131/36, 140/131/56, 141/26, 141/46, 141/71, 142/26, 142/46, 142/71, 143/131/15, 143/131/36, 143/131/56, 144/143/131/15, 144/143/131/36, 144/143/131/56, 149/27, 149/47, 149/72
Y	WO 2014140072 A1 (CELLACT PHARMA GMBH) September 18, 2014; abstract; page 10, paragraph 1	57, 61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/17751

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 145-148 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-***-Please See Supplemental Page-***-

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-80, 131 (in-part), 132 (in-part), 133 (in-part), 134 (in-part), 135 (in-part), 136 (in-part), 137 (in-part), 138 (in-part), 139 (in-part), 140 (in-part), 141 (in-part), 142 (in-part), 143 (in-part), 144 (in-part), and 149 (in-part)

- Remark on Protest**
- | | |
|--------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. |
| <input type="checkbox"/> | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. |
| <input type="checkbox"/> | No protest accompanied the payment of additional search fees. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/US16/17751

***-Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking---

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, Claims 1-80, 131 (in-part), 132 (in-part), 133 (in-part), 134 (in-part), 135 (in-part), 136 (in-part), 137 (in-part), 138 (in-part), 139 (in-part), 140 (in-part), 141 (in-part), 142 (in-part), 143 (in-part), 144 (in-part), and 149 (in-part) are directed toward a method for the preventative or curative treatment of neuroblastoma in a patient comprising: a) obtaining results from a test that determines the patient's genotype at position +263 of at least one ODCJ allele; and b) if the results indicate that the patient's genotype at position +263 of at least one allele of the ODCJ gene is T, administering to the patient an effective amount of a pharmaceutical therapy comprising a-difluoromethylomithine (DFMO).

Group II, Claims 81-107, 131 (in-part), 132 (in-part), 133 (in-part), 134 (in-part), 135 (in-part), 136 (in-part), 137 (in-part), 138 (in-part), 139 (in-part), 140 (in-part), 141 (in-part), 142 (in-part), 143 (in-part), 144 (in-part), and 149 (in-part) are directed toward a method for preventing the development or recurrence of a carcinoma in a patient at risk thereof comprising: a) obtaining results from a test that determines the presence of cancer stem cells in a sample from the patient; and b) administering to the patient an effective amount of a-difluoromethylomithine (DFMO) if the results indicate that the patient's sample comprises cancer stem cells.

Group III, Claims 108-130, 131 (in-part), 132 (in-part), 133 (in-part), 134 (in-part), 135 (in-part), 136 (in-part), 137 (in-part), 138 (in-part), 139 (in-part), 140 (in-part), 141 (in-part), 142 (in-part), 143 (in-part), 144 (in-part), and 149 (in-part) are directed toward a method for the preventative or curative treatment of neuroblastoma in a patient comprising administering to the patient effective amounts of a pharmaceutical therapy comprising an anti-GD2 therapy and a first agent that inhibits ornithine decarboxylase (ODC) within the patient.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include the patient's genotype at position +263 of at least one ODCJ allele, not present in either of Groups II or III; the special technical features of Group II include carcinoma cancer stem cells, not present in either of Groups I or III; the special technical features of Group III include anti-GD2 therapy, not present in either of Groups I or II.

Groups I-III share the technical features including: preventing carcinoma in a patient, comprising administering to the patient an effective amount of a therapy. Groups I and II share the technical features including: a-difluoromethylomithine (DFMO); Groups I and III share the technical features including: a method for the preventative or curative treatment of neuroblastoma comprising an agent that inhibits ornithine decarboxylase (ODC).

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2013/0164751 A1 to the Arizona Board of Regents on Behalf of University of Arizona (hereinafter 'Arizona').

Arizona discloses preventing carcinoma in a patient (preventing carcinoma in a patient: paragraphs [0004], [0008]), comprising administering to the patient an effective amount of a therapy (comprising administering to the patient an effective amount of a therapy; paragraph [0011]); a-difluoromethylomithine (DFMO) (a-difluoromethylomithine (DFMO); paragraph [0015]); and a method for the preventative or curative treatment of neuroblastoma (a method for the preventative or curative treatment of neuroblastoma; paragraphs [0008], [0048], Claim 1) comprising an agent that inhibits ornithine decarboxylase (ODC) (comprising an agent that inhibits ornithine decarboxylase (ODC); paragraph [0011], Claim 1).

Since none of the special technical features of the Groups I-III inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Arizona reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
	C 1 2 Q 1/04	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 ユージーン・ガーナー

アメリカ合衆国・アリゾナ・85704・ツーソン・ウェスト・サンセット・1780

(72)発明者 エリザベス・ブラックハイマー

アメリカ合衆国・アリゾナ・85718・ツーソン・イースト・リヴァー・ロード・1760・ス
イート・250・キャンサー・プリヴェンション・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテ
ッド内

F ターム(参考) 4B063 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ43 QR32 QR62 QR72 QR77
 QS02 QS34 QS38 QX01
 4C084 AA19 AA22 MA17 MA35 MA37 MA43 MA52 MA66 NA05 NA14
 ZB072 ZB112 ZB262 ZC202 ZC412 ZC751
 4C085 AA03 AA13 EE03 GG01 GG02 GG08
 4C206 AA01 AA02 FA53 MA01 MA02 MA03 MA04 MA37 MA55 MA57
 MA63 MA72 MA86 NA05 NA14 ZB26 ZC20 ZC75