

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6083646号  
(P6083646)

(45) 発行日 平成29年2月22日 (2017. 2. 22)

(24) 登録日 平成29年2月3日 (2017. 2. 3)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 31/198 (2006. 01)

A 6 1 K 31/198

A 6 1 K 31/192 (2006. 01)

A 6 1 K 31/192

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 16 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-510342 (P2013-510342)  
 (86) (22) 出願日 平成23年5月13日 (2011. 5. 13)  
 (65) 公表番号 特表2013-528376 (P2013-528376A)  
 (43) 公表日 平成25年7月11日 (2013. 7. 11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/036464  
 (87) 国際公開番号 W02011/143579  
 (87) 国際公開日 平成23年11月17日 (2011. 11. 17)  
 審査請求日 平成26年5月9日 (2014. 5. 9)  
 (31) 優先権主張番号 61/345, 048  
 (32) 優先日 平成22年5月14日 (2010. 5. 14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 511058475  
 アリゾナ ボード オブ リージェンツ  
 オン ビハーフ オブ ザ ユニバーシテ  
 ィー オブ アリゾナ  
 Arizona Board of Re  
 gents on behalf of  
 the University of A  
 rizona  
 アメリカ合衆国 アリゾナ州 85721  
 -0158, トゥーソン, ノース ユ  
 ークリッド アヴェニュー 888, ル  
 ーム 204  
 Rm. 204, 888 N. Euc  
 lid Ave., Tucson, A  
 Z 85721-0158, USA  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 食事性ポリアミン含量に基づく癌予防及び治療法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

スリンドクと共に使用されることを特徴とする、癌腫のある患者の治療に使用するためのオルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) 阻害剤であって、前記治療が、

a) 前記患者による食事性ポリアミン摂取及び / または前記患者における組織ポリアミンレベルを評価すること、

b) 少なくとも一方のODC 1 プロモーター遺伝子アレルの位置 + 3 1 6 で前記患者の遺伝子型を決定する試験の結果を得ること、及び

c) (i) a) のステップにおける評価が、前記患者による食事性ポリアミン摂取が食事性ポリアミン摂取の上位 4 分の 1 に該当せず、前記患者による食事性ポリアミン摂取が 3 0 0  $\mu$ mol ポリアミン / 日未満であり、かつ / または前記患者の組織ポリアミンレベルがスペルミジンについて 2 . 4 9 nmol / mg 以下のタンパク質であるかまたはスペルミンについて 7 . 9 0 nmol / mg 以下のタンパク質であることを示し、かつ、

(i i) b) のステップにおける結果が少なくとも一方のODC 1 遺伝子プロモーターアレルの位置 + 3 1 6 における前記患者の遺伝子型が G であることを示す場合に限り

、前記オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) 阻害剤とスリンドクとの併用有効量を含む併用療法を前記患者に施すこと、を含み、

ここで前記オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) 阻害剤は - ジフルオロメチルオルニチン (DFMO) である、オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) 阻害剤。

10

20

## 【請求項 2】

前記食事性ポリアミン摂取が患者食事歴から決定される、請求項 1 に記載のオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

## 【請求項 3】

前記組織ポリアミンレベルが、直腸粘膜組織、前立腺組織又は尿から決定される、請求項 1 に記載のオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

## 【請求項 4】

前記治療が、前記併用療法開始前又は開始時に前記患者を低ポリアミン食に供することをさらに含む、請求項 1 に記載のオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

## 【請求項 5】

前記 - ジフルオロメチルオルニチン（DFMO）の有効量が、 $0.05 \sim 5.0 \text{ g/m}^2$  / 日である、請求項 1 に記載のオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

## 【請求項 6】

前記スリンダクの有効量が、 $10 \sim 1500 \text{ mg}$  / 日である、請求項 1 に記載のオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

## 【請求項 7】

前記患者が固形腫瘍を有し、前記治療が前記固形腫瘍の切除をさらに含む、請求項 1 に記載のオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

## 【請求項 8】

DFMO 及びスリンダクが前記切除の前に投与される、請求項 7 に記載のオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

## 【請求項 9】

DFMO 及びスリンダクが前記切除の後に投与される、請求項 7 に記載のオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

## 【請求項 10】

前記癌腫が、結腸直腸癌、乳癌、膵臓癌、脳腫瘍、肺癌、胃癌、血液癌、皮膚癌、精巣癌、前立腺癌、卵巣癌、肝臓癌又は食道癌、子宮頸癌、頭頸部癌、非メラノーマ皮膚癌、神経芽細胞腫又は膠芽細胞腫である、請求項 1 に記載のオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

## 【請求項 11】

前記癌腫が結腸直腸癌である、請求項 1 に記載のオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

## 【請求項 12】

スリンダクと共に使用されることを特徴とする、以前に癌腫と診断されたことがある患者の再発を予防するための方法において使用するためのオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤であって、前記方法が、

a) 前記患者による食事性ポリアミン摂取及び / 又は前記患者における組織ポリアミンレベルを評価すること、

b) 少なくとも一方の ODC 1 プロモーター遺伝子アレルの位置 + 316 で前記患者の遺伝子型を決定する試験の結果を得ること、及び

c) (i) a) のステップにおける評価が、前記患者による食事性ポリアミン摂取が食事性ポリアミン摂取の上位 4 分の 1 に該当せず、前記患者による食事性ポリアミン摂取が  $300 \mu\text{mol}$  ポリアミン / 日未満であり、かつ / または前記患者の組織ポリアミンレベルがスperlミジンについて  $2.49 \text{ nmol/mg}$  以下のタンパク質であるかまたはスperlミンについて  $7.90 \text{ nmol/mg}$  以下のタンパク質であることを示し、かつ、

(ii) b) のステップにおける結果が少なくとも一方の ODC 1 遺伝子プロモーターアレルの位置 + 316 における前記患者の遺伝子型が G であることを示す場合に限り

、前記オルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤とスリンダクとの併用有効量を前記患者に投与すること、を含む、

10

20

30

40

50

ここで前記オルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤は - ジフルオロメチルオルニチン（DFMO）である、オルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

【請求項 1 3】

前記患者が、癌腫瘍の外科的切除を以前に受けたことがある、請求項 1 2 に記載のオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

【請求項 1 4】

スリンドクと共に使用されることを特徴とする、癌腫の家族歴を有する患者において癌腫を予防するための方法において使用するためのオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤であって、前記方法が、

a) 前記患者による食事性ポリアミン摂取及び / または前記患者における組織ポリアミンレベルを評価すること、

b) 少なくとも一方のODC 1 プロモーター遺伝子アレルの位置 + 3 1 6 で前記患者の遺伝子型を決定する試験の結果を得ること、及び

c) (i) a) のステップにおける評価が、前記患者による食事性ポリアミン摂取が食事性ポリアミン摂取の上位 4 分の 1 に該当せず、前記患者による食事性ポリアミン摂取が  $300 \mu\text{mol}$  ポリアミン / 日未満であり、かつ / または前記患者の組織ポリアミンレベルがスベルミジンについて  $2.49 \text{ nmol} / \text{mg}$  以下のタンパク質であるかまたはスベルミンについて  $7.90 \text{ nmol} / \text{mg}$  以下のタンパク質であることを示し、かつ、

(i i) b) のステップにおける結果が少なくとも一方のODC 1 遺伝子プロモーターアレルの位置 + 3 1 6 における前記患者の遺伝子型が G であることを示す場合に限り

、前記オルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤とスリンドクとの併用有効量を前記患者に投与すること、を含み、

ここで前記オルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤は - ジフルオロメチルオルニチン（DFMO）である、オルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

【請求項 1 5】

前記組織ポリアミンが、プトレッシン、モノアセチルスベルミジン、またはモノアセチルスベルミンである、請求項 3 に記載のオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

【請求項 1 6】

前記結腸直腸癌が、家族性腺腫性ポリープ症と関連する、請求項 1 1 に記載のオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、その全体において参照により内容全体が本明細書中に組み込まれる、2010年5月14日出願の米国仮出願第61/345,048号に対する優先権を主張する。

【0002】

本発明は、National Cancer Institute 及び Institute of Health からの契約番号 NO1-CN75019 及び助成金 CA59024、CA88078、CA47396、CA72008 及び CA95060 のもと、政府からの援助を受けてなされた。政府は本発明においてある一定の権利を有する。

【0003】

I. 発明の分野

本発明は、全般的に、癌生物学及び医学の分野に関する。より具体的には、本発明は、癌腫及びそのリスク因子の診断、予防及び治療のための方法に関する。

【背景技術】

【0004】

結腸直腸癌及び他の癌腫を治療及び予防するためのより有効な方法が今もなお必要とさ

10

20

30

40

50

れている。National Cancer Instituteによると、2009年、米国でおよそ147,000例の新規症例があり、結腸癌による死亡は50,000例にのぼった。現在の治療プロトコル、特に結腸癌及びポリープに対するプロトコルには、腫瘍切除、化学療法及び放射線療法が含まれる。

#### 【0005】

結腸直腸腫瘍形成を説明するキーマニズムを理解することによって、結腸直腸癌予防に対する新しいアプローチの開発が促進されよう。実験的及び疫学的研究を受け入れることによって、食事及び栄養要因が、正常上皮の明らかな癌腫への形質転換を調節することにおいて重要な因子であることが示される。抗腫瘍活性のある食品成分を同定し、それらの作用機序を調べることによって、特に結腸内で、癌予防が顕著に促進され得る。Lin  
salata M, Russo F: Nutritional factors and  
polyamine metabolism in colorectal cancer. Nutrition 24:382-9, 2008。

#### 【0006】

ポリアミンは、生きている全ての細胞で見られる有機陽イオンである。Wallace  
HM: Polyamines in Human health. Proc Nutr  
Soc 55:419-31, 1996。これらは、律速酵素オルニチンデカルボキシ  
ラーゼ(ODC)によりアルギニン由来生成物、オルニチンから内因的に合成される。G  
erner EW, Meyskens FL, Jr.: Polyamines and  
Cancer: old molecules, new understanding. Nat  
Rev Cancer 4:781-92, 2004。オルニチンはODCにより  
プトレッシンに変換され、これがSSAT(スペルミンスペルミジンアセチルトランスフ  
ェラーゼ)によりスペルミン及びスペルミジンへと連続的に変換され;これらの3種類の  
分子は相互交換可能である。ポリアミンと癌との間の関連は、数十年にわたり立証されて  
きた。結腸直腸癌腫形成に関与する、詳細に報告されている一連の生化学的、遺伝学的及  
び疫学的変化に加えて、上皮ポリアミン含量上昇はCRC癌腫形成と一貫して関連付けら  
れてきた。Gerner EW, Meyskens FL, Jr.: Polyamine  
s and Cancer: old molecules, new understand  
ing. Nat Rev Cancer 4:781-92, 2004; Fearon  
ER, Vogelstein B: A genetic model for col  
orectal tumorigenesis. Cell 61:759-67, 199  
0; Jass JR, Whitehall VL, Young JR: Emerging  
concepts in colorectal neoplasia. Gastro  
enterology 123:862-76, 2002。直腸粘膜におけるODCの過  
剰発現は、結腸直腸癌リスクと関連付けられており、CRCにおける増殖の生化学的マー  
カーとなる可能性があることが分かっている。Wang W, Liu LQ, Higuc  
hi CM: Mucosal polyamine measurements and  
colorectal cancer risk. J Cell Biochem 6  
3:252-7, 1996; McGarrity TJ, Peiffer LP, Bar  
tholomew MJ: Colonic polyamine content a  
nd ornithine decarboxylase activity as m  
arkers for adenomas. Cancer 66:1539-43, 19  
90; Brabender J, Lord RV, Danenberg KD: Up  
regulation of ornithine decarboxylase mRN  
A expression in Barrett's esophagus and  
Barrett's-associated adenocarcinoma. J Ga  
strointest Surg 5:174-81; discussion 182,  
2001。ポリアミンは、転写及び転写後プロセスを通じて癌遺伝子発現及び機能を制御  
することが報告されている。Tabib A, Bachrach U: Role of  
polyamines in mediating malignant transf

10

20

30

40

50

ormation and oncogene expression. Int J Biochem Cell Biol 31:1289-95, 1999; Bachrach U, Wang YC, Tabib A: Polyamines: new cues in cellular signal transduction. News Physiol Sci 16:106-9, 2001. ジフルオロメチルオルニチン (DFMO、エフロルニチン) は、ODCを不可逆的に阻害し、その結果、ポリアミン合成が低下する。DFMOは、動物モデルにおいて癌の発現を抑制するポリアミン代謝阻害剤の中で広く研究が行われている例である。Meyskens FL, Jr., Gerner EW: Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent. Clin Cancer Res 5:945-51, 1999. NSAIDスリダクと一緒に、ヒト臨床試験において、近年DFMOが異時性結腸直腸腺腫の発生率を低下させることが示された。Meyskens FL, McLaren C.E., Pelot D., Fujikawa S.ら: Difluoromethylornithine plus sulindac for the prevention of sporadic colorectal adenomas: a randomized placebo-controlled, double-blind trial. Cancer Prevention Research 1:32-38, 2008.

#### 【0007】

内因性ポリアミン生成に加えて、食事性ポリアミン及び腸内微生物によるそれらの代謝は、全身ポリアミンプールの主要な決定因子であることが分かっている。Zoumas-Morse C, Rock CL, Quintana ELら: Development of a polyamine database for assessing dietary intake. J Am Diet Assoc 107:1024-7, 2007. 重要な食事性ポリアミンとしては、スペルミン、スペルミジン及びブトレッシンが挙げられる。ポリアミン吸収は胃腸で起こり、様々な形態のポリアミンが厳しいODC制御下で組織において代謝される。Thomas T, Thomas TJ: Polyamine metabolism and cancer. J Cell Mol Med 7:113-26, 2003. 食事性ポリアミンに関する広範な証拠にもかかわらず、食事性ポリアミンがヒトにおいて組織ポリアミン又は腺腫形成に影響を与えるか否かは分かっていない。食事性ポリアミン摂取が癌リスク因子に影響を及ぼし得るか否か及びどのように影響を及ぼすかならびに予防的及び治療的処置プロトコールにそれが組み入れられるか否か又はどのように組み入れられるかを決定することは大きな進歩となろう。

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

ある局面において、オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) 阻害剤と、全体的な細胞ポリアミン含量を減少させるためのポリアミン経路を調節する薬剤と、を含む抗癌腫併用療法の有効性を予測するための方法であって、この併用療法で治療しようとする患者における組織ポリアミンレベル又は組織ポリアミン流入を評価することを含み、高組織ポリアミンレベル又は流入によって、治療の有効性が低いことが予測される、方法が提供される。

#### 【0009】

いくつかの実施態様において、全体的な細胞ポリアミン含量を減少させるためのポリアミン経路を調節する薬剤は、スペルミジン/スペルミンN<sup>1</sup>-アセチルトランスフェラーゼ発現アゴニストである。いくつかの実施態様において、この組織ポリアミンレベル又は組織ポリアミン流入は、直腸粘膜組織、前立腺組織又は尿から決定される。

#### 【0010】

いくつかの実施態様において、本方法は、前記組織ポリアミンレベル又は組織ポリアミン流入が高くない場合、前記併用療法で前記患者を治療することをさらに含む。いくつか

の実施態様において、本方法は、前記併用療法開始前又は開始時に低ポリアミン食に前記患者を供することをさらに含む。いくつかの実施態様において、本方法は、少なくとも一方のODC1プロモーター遺伝子アレルの位置+316で前記患者の遺伝子型を決定する試験の結果を得ることをさらに含む。

【0011】

いくつかの実施態様において、前記結果は、前記遺伝子型を含有する報告を受け取るか又は該遺伝子型を明らかにする患者病歴を取得することにより得られる。いくつかの実施態様において、前記試験は、前記患者のODC1プロモーター遺伝子の一方のアレルで位置+316のヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施態様において、前記患者のODC1プロモーター遺伝子の両方のアレルの位置+316のヌクレオチド塩基を決定する。

10

【0012】

上記実施態様の何れかにおけるいくつかの変形物において、オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)阻害剤は、-ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)である。上記実施態様の何れかにおけるいくつかの変形物において、スペルミジン/スペルミン<sup>N1</sup>-アセチルトランスフェラーゼ発現アゴニストは、アスピリン非含有非ステロイド抗炎症剤(NSAID)である。

【0013】

いくつかの実施態様において、アスピリン非含有NSAIDは、選択的COX-2阻害剤である。いくつかの実施態様において、アスピリン非含有NSAIDは、スリダク又はセレコキシブである。いくつかの実施態様において、アスピリン非含有NSAIDはスリダクである。いくつかの実施態様において、アスピリン非含有NSAIDはセレコキシブである。

20

【0014】

別の態様において、オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)阻害剤及びスペルミジン/スペルミン<sup>N1</sup>-アセチルトランスフェラーゼ発現アゴニストを含む抗癌腫併用療法の有効性を予測するための方法であって、該併用療法で治療しようとする患者による食事性ポリアミン摂取を評価することを含み、高食事性ポリアミン摂取レベルによって、該治療の有効性が低いことが予測される、方法が提供される。

【0015】

いくつかの実施態様において、全体的な細胞ポリアミン含量を減少させるためのポリアミン経路を調節する薬剤は、スペルミジン/スペルミン<sup>N1</sup>-アセチルトランスフェラーゼ発現アゴニストである。いくつかの実施態様において、食事性ポリアミンレベルは患者食事歴から判定される。

30

【0016】

いくつかの実施態様において、高食事性ポリアミンレベルは、300µmolポリアミン/日以上として定義される。いくつかの実施態様において、その食事性ポリアミンレベルが高くない場合、患者を前記併用療法で。いくつかの実施態様において、本方法は、前記併用療法開始前又は開始時に、その患者を低ポリアミン食に供することをさらに含む。いくつかの実施態様において、本方法は、少なくとも一方のODC1プロモーター遺伝子アレルの位置+316で前記患者の遺伝子型を調べる試験の結果を得ることをさらに含む。

40

いくつかの実施態様において、前記結果は、前記遺伝子型を含有する報告を受け取るか又は該遺伝子型を明らかにする患者病歴を取得することにより得られる。

【0017】

いくつかの実施態様において、前記試験は、前記患者のODC1プロモーター遺伝子の一方のアレルで位置+316のヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施態様において、前記試験は、患者のODC1プロモーター遺伝子の両アレルで位置+316のヌクレオチド塩基を決定する。上記実施態様の何れかにおけるいくつかの変形物において、オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)阻害剤は、-ジフルオロメチルオルニチン(DF

50

MO)である。上記実施態様の何れかにおけるいくつかの変形物において、スペルミジン/スペルミン $N^1$ -アセチルトランスフェラーゼ発現アゴニストは、アスピリン非含有非ステロイド抗炎症剤(NSAID)である。いくつかの実施態様において、前記アスピリン非含有NSAIDは、選択的COX-2阻害剤である。いくつかの実施態様において、前記アスピリン非含有NSAIDは、スリダク又はセレコキシブである。いくつかの実施態様において、前記アスピリン非含有NSAIDは、スリダクである。いくつかの実施態様において、前記アスピリン非含有NSAIDは、セレコキシブである。

#### 【0018】

他の局面において、

a) 患者による食事性ポリアミン摂取及び/又はその患者における組織ポリアミンレベル又は流入を評価することと、

b) オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)阻害剤と、全体的な細胞ポリアミン含量又は流入を減少させるためのポリアミン経路を調節する薬剤と、の併用有効量をその患者に投与することと、

を含む、癌腫を有する患者を治療するための方法が提供される。

#### 【0019】

いくつかの実施態様において、全体的な細胞ポリアミン含量を減少させるためのポリアミン経路を調節する薬剤は、スペルミジン/スペルミン $N^1$ -アセチルトランスフェラーゼ発現アゴニストである。いくつかの実施態様において、食事性ポリアミンレベルは患者食事歴から判定される。いくつかの実施態様において、高食事性ポリアミンレベルは300  $\mu\text{mol}$  ポリアミン/日以上として定義される。いくつかの実施態様において、組織ポリアミンレベル又は流入は、直腸粘膜組織、前立腺組織又は尿から決定される。いくつかの実施態様において、本方法は、前記併用療法開始前又は開始時に、患者を低ポリアミン食に供することをさらに含む。いくつかの実施態様において、本方法は、少なくとも一方のODC1プロモーター遺伝子アレルの位置+316で前記患者の遺伝子型を調べる試験の結果を得ることをさらに含む。いくつかの実施態様において、前記結果は、前記遺伝子型を含有する報告を受け取るか又は該遺伝子型を明らかにする患者病歴を取得することにより得られる。いくつかの実施態様において、前記試験は、患者のODC1プロモーター遺伝子の一方のアレルで位置+316のヌクレオチド塩基を決定する。いくつかの実施態様において、前記試験は、患者のODC1プロモーター遺伝子の両アレルで位置+316のヌクレオチド塩基を決定する。

#### 【0020】

上記実施態様の何れかにおけるいくつかの変形物において、オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)阻害剤は、 $\alpha$ -ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)である。上記実施態様の何れかにおけるいくつかの変形物において、スペルミジン/スペルミン $N^1$ -アセチルトランスフェラーゼ発現アゴニストは、アスピリン非含有非ステロイド抗炎症剤(NSAID)である。

#### 【0021】

いくつかの実施態様において、アスピリン非含有NSAIDは、選択的COX-2阻害剤である。いくつかの実施態様において、アスピリン非含有NSAIDは、スリダク又はセレコキシブである。いくつかの実施態様において、アスピリン非含有NSAIDは、スリダクである。いくつかの実施態様において、アスピリン非含有NSAIDは、セレコキシブである。いくつかの実施態様において、DFMOは全身的に投与される。いくつかの実施態様において、スリダク又はセレコキシブは全身的に投与される。いくつかの実施態様において、DFMO又はアスピリン非含有NSAIDは、経口、動脈内又は静脈内投与される。いくつかの実施態様において、DFMOは経口投与される。いくつかの実施態様において、DFMOの有効量は500mg/日である。いくつかの実施態様において、DFMOは静脈内投与される。いくつかの実施態様において、DFMOの有効量は約0.05から約5.0g/m<sup>2</sup>/日である。いくつかの実施態様において、DFMO及びアスピリン非含有NSAIDは、経口投与用に製剤化される。いくつかの実施態様におい

10

20

30

40

50

て、DFMO及びアスピリン非含有NSAIDは、硬もしくは軟カプセル又は錠剤として製剤化される。いくつかの実施態様において、DFMO及びアスピリン非含有NSAIDは12時間ごとに投与される。いくつかの実施態様において、DFMO及びアスピリン非含有NSAIDは24時間ごとに投与される。いくつかの実施態様において、スリダクの有効量は約10から約1500mg/日である。いくつかの実施態様において、スリダクの有効量は約10から約400mg/日である。いくつかの実施態様において、スリダクの有効量は150mg/日である。いくつかの実施態様において、DFMOはスリダクの前に投与される。いくつかの実施態様において、DFMOはスリダクの後に投与される。いくつかの実施態様において、DFMOはスリダクの前及び後に投与される。いくつかの実施態様において、DFMOはスリダクと同時に投与される。いくつかの実施態様において、DFMOは少なくとも2回目に投与される。いくつかの実施態様において、スリダクは少なくとも2回目に投与される。いくつかの実施態様において、患者は固形腫瘍を有し、前記方法には、固形腫瘍の切除がさらに含まれる。いくつかの実施態様において、DFMO及びスリダクは切除前に投与される。いくつかの実施態様において、DFMO及びスリダクは切除後に投与される。

10

#### 【0022】

上記実施態様の何れかにおけるいくつかの変形物において、癌腫は、結腸直腸癌、乳癌、膵臓癌、脳腫瘍、肺癌、胃癌、血液癌、皮膚癌、精巣癌、前立腺癌、卵巣癌、肝臓癌又は食道癌、子宮頸癌、頭頸部癌、非メラノーマ皮膚癌、神経芽腫及び膠芽細胞腫である。いくつかの実施態様において、癌腫は結腸直腸癌である。いくつかの実施態様において、結腸直腸癌はステージIである。いくつかの実施態様において、結腸直腸癌はステージIIである。いくつかの実施態様において、結腸直腸癌はステージIIIである。いくつかの実施態様において、結腸直腸癌はステージIVである。

20

#### 【0023】

別の態様において、

a) 患者による食事性ポリアミン摂取及び/又はその患者における組織ポリアミンレベルを評価することと、

b) オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)阻害剤と、スベルミジン/スベルミンN<sup>1</sup>-アセチルトランスフェラーゼ発現アゴニストと、の併用有効量をその患者に投与することと、

30

を含む、以前に癌腫と診断されたことがある患者の再発を予防するための方法が提供される。

#### 【0024】

いくつかの実施態様において、患者は癌腫瘍の外科的切除を以前に受けたことがある。

#### 【0025】

別の態様において、

a) 患者による食事性ポリアミン摂取及び/又はその患者における組織ポリアミンレベルを評価することと、

b) オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)阻害剤とスベルミジン/スベルミンN<sup>1</sup>-アセチルトランスフェラーゼ発現アゴニストとの併用有効量をその患者に投与することと、

40

を含む、患者における癌腫瘍を切除可能にする方法が提供される。

#### 【0026】

いくつかの実施態様において、本方法は、段階b)の後に患者から腫瘍を切除することをさらに含む。

#### 【0027】

他の局面において、

a) 患者による食事性ポリアミン摂取、その患者における組織ポリアミンレベル又は組織ポリアミン流入を評価することと、

b) オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)阻害剤とスベルミジン/スベルミンN<sup>1</sup>

50



- アセチルトランスフェラーゼ発現アゴニストとの併用有効量をその患者に投与することと、

を含む、癌腫の家族歴を有する患者において癌腫を予防するための方法が提供される。

【0028】

上記実施態様の変形物において、患者はヒトである。

【0029】

「a」又は「an」という語の使用は、特許請求の範囲及び／又は明細書において、「を含む」という用語と一緒に使用される場合、「1」を意味し得るが、「1以上の」、「少なくとも1つ」及び「1又は1を超える」の意味とも一致する。

【0030】

本願を通じて、「約」という用語は、値が、その値を決定するために使用される機器、方法に対する固有の誤差の変動又は研究対象間に存在する変動を含むことを指すために使用される。

【0031】

「含む (comprises)」、「有する (has)」及び「含む (include)」という用語は、非制限の連結動詞である。「含む (comprises)」、「含むこと (comprising)」、「有する (has)」、「有すること (having)」、「含む (includes)」及び「含むこと (including)」などのこれらの動詞の1以上の何らかの形態又は時制も非制限である。例えば、1以上の段階を「含む (comprises)」、「有する (has)」又は「含む (include)」何らかの方法は、これらの1以上の段階のみを保持することに限定されず、他の列挙されていない段階も包含する。

【0032】

「有効な」という用語は、この用語が明細書及び／又は特許請求の範囲で使用される場合、望ましいか、予想されるか又は意図される結果を完遂するのに適切であることを意味する。

【0033】

本明細書中で使用される場合、「IC<sub>50</sub>」という用語は、得られる最大反応の50%である阻害用量を指す。

【0034】

本明細書中で使用される場合、「患者」又は「対象」という用語は、生きている哺乳動物、例えば、ヒト、サル、ウシ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット又はそれらのトランスジェニック種などを指す。ある種の実施態様において、患者又は対象は霊長類である。ヒト対象の非限定例は、成人、若年者、幼児及び胎児である。

【0035】

「医薬的に許容可能な」は、一般に安全で、無毒性であり、生物学的にも他の意味でも望ましくないものではない医薬組成物を調製することにおいて有用であることを意味し、これには獣医学での使用ならびにヒトの医薬的使用に対して許容可能であるものが含まれる。

【0036】

「予防」又は「予防すること」とは、(1) リスクがあり得る及び／又は疾患に罹患し易いが、その疾患の病的状態又は症状の何れか又は全てをまだ経験していないか又は示していない対象又は患者における疾患の発現を抑制すること及び／又は(2) リスクがあり得る及び／又は疾患に罹患し易いが、その疾患の病的状態又は症状の何れか又は全てをまだ経験していないか又は示していない対象又は患者における疾患の病的状態又は症状の発現を遅延させることを含む。

【0037】

「有効量」、「治療的有效量」又は「医薬的有效量」は、疾患を治療するために対象又は患者に投与される場合、その疾患に対してそのような治療を実現させるのに十分な量を意味する。

10

20

30

40

50

## 【0038】

「治療」又は「治療すること」とは、(1)ある疾患の病的状態又は症状を経験するか又は示す対象又は患者においてその疾患を抑制し(例えば、病的状態及び/又は症状のさらなる発現を抑止すること)、(2)ある疾患の病的状態又は症状を経験しているか又は示している対象又は患者においてその疾患を改善すること(例えば病的状態及び/又は症状を回復させること)及び/又は(3)その疾患の病的状態又は症状を経験しているか又は示している対象又は患者において疾患の何らかの測定可能な低下をもたらすことを含む。

## 【0039】

本明細書中に参照により組み込まれる参考文献の何れかにおける定義の何らかの不一致に対しては、上記定義が優先する。しかし、ある一定の用語が定義されるということは、定義されていない何らかの用語が限定されていないことを示すものとしてみなすべきではない。むしろ、使用される用語は全て、当業者が本発明の範囲及び実施を認識し得るように、本発明を説明すると考えられる。

10

## 【0040】

次の詳細な説明から本開示のその他の目的、特性及び長所が明らかになる。しかし、詳細な説明及び具体的な例は、本発明の具体的な実施態様を示す一方で、単なる説明のためのものである。本発明の精神及び範囲内の様々な変化及び変更がこの詳細な説明から当業者に明らかになることを理解されたい。単に特定の化合物はある特定の一般的手段に起因するので、別の一般的手段にも属し得ないことを意味するものではないことに注

20

## 【0041】

次の図面は、本明細書の一部をなし、本開示のある特定の局面をさらに明らかにするために含まれる。本発明は、本明細書中で提示される具体的な実施態様の詳細な説明と合わせて、これらの図面の1つを参照することにより、より良好に理解され得る。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0042】

【図1】MAD1及びc-MYCによるポリアミン制御の差別的効果。ODC1+316マイナーA-アレルにおけるMAD1及びc-MYCによる、ポリアミン制御の差別的効果の案を示す概略図。ODC阻害剤DFMO(ジフルオロメチルオルニチン)の効果も示す。

30

【図2】結腸直腸癌 - 特異的予測生存率。この図は、ODC1+316遺伝子型によって層別される、ステージIII結腸直腸癌の症例に対するカプラン・マイヤー結腸直腸癌 - 特異的予測生存率を示す。1994年から1996年の間に診断され、2008年3月までフォローアップした、University of California Irvine Gene-Environment Study of Familial Colorectal Cancerからの症例が含まれる：ODC1 GG(64例、結腸直腸癌特異的死亡例15例)、ODC1 GA/AA(62例、結腸直腸癌特異的死亡例25例)。

【図3】A及び3B：ODC1プロモーターSNPの位置及び分析。図Aは、ODC1A、プロモーターSNPの位置を示す。この実験で調べているSNPは、ODC1転写開始部位の3'の316ヌクレオチド(\*)である。このSNPは、下線を付した配列により示されるような2個のコンセンサスE-ボックスの間にあり、PstI制限部位(ボックス)(配列番号5)に影響を与える。図3Bは、ODC1 SNPの制限断片長遺伝多型分析を示す。2種類の細胞型からDNAを得て、ODC1 SNP部位周囲の領域の配列を決定した。ODC1 SNP遺伝子座において、結腸由来HT29細胞はヘテロ接合GAであることが分かり、一方HCT116細胞はホモ接合GGであることが分かった。各細胞型からこの領域の350-bpのPCR産物が得られ、これをPstIで消化した。制限産物が<350bpであることによりA-アレルの証拠が示された。

40

【図4】A及び4B：E-ボックス発現及び免疫沈降分析。ODC1プロモーターSNP

50

の位置。図4Aは、結腸由来細胞におけるE-ボックスタンパク質発現を示す。ウエスタンブロット分析によって、+316ODC1 SNPへの結合について評価しようとするタンパク質の発現を評価した。c-MYC、MAD1及びMAD4についてHT29及びHCT116細胞両方の抽出物を評価し、 $\alpha$ -アクトンを添加対照として使用した。図4Bは、下記の実施例セクションで記載のように行ったクロマチン免疫沈降分析による、アレルト異的転写因子結合に対する考証を示す。HT29細胞は、この部位でヘテロ接合GAなので、これらの細胞はODC1 A-アレルのソースであった。ODC1 G-アレルのソースとしてHCT116細胞を使用した。

【図5】A及び5B：ODC1活性におけるc-MYC及びMAD1発現の効果。図5Aは、HT29結腸由来細胞におけるODC1アレルト異的プロモーター活性に対するc-MYC発現の効果を示す。pcDNA3.0プラスミド又はCMV-MYC発現ベクターと同時に形質移入してODC1プロモーターレポータープラスミドを形質移入した後、プロモーター活性を測定した。プロモーターコンストラクトは、-485から-480bpの位置の第一のE-ボックスエレメントの存在の点で異なる（野生型配列の場合は「wtE-ボックス1」又は突然変異体配列の場合は「mutE-ボックス1」）。このコンストラクトはODC1+316SNPも異なる（「+316G」又は「+316A」）。\*、pcDNA3.0同時形質移入によるプロモーター活性に対する4種類の比較のそれぞれに対して $P=0.013$ 。図5Bは、HT29結腸腫瘍由来細胞におけるODC1アレルト異的プロモーター活性に対するMAD1発現の効果を示す。pcDNA3.1プラスミド又はpcDNA-MAD1プラスミドと同時に形質移入したODC1プロモーターレポータープラスミドを形質移入した後、プロモーター活性を測定した。使用したプロモーターコンストラクトはこの図のパネルAに対する説明に記載した。\*、 $P=0.027$ 、pcDNA3.1同時形質移入によるプロモーター活性に対して統計学的に有意。

【図6】腺腫性ポリープの減少。この図は、患者の腺腫性ポリープをDFMO及びスリダクで治療した場合の腺腫性ポリープの%再発を、プラセボと比較して示す。腺腫総数は70%減少し、進行性腺腫は92%減少し、多発性腺腫は95%減少した。

【図7】+316ODC1遺伝子型に基づく薬理ゲノミクスベネフィット/リスク分析。この図は、患者の+316ODC1遺伝子型の関数として、治療及びプラセボ群に対して、プラセボと比較した場合の3年間の最後の腺腫再発の%低下と、%聴器毒性と、を比較する。聴力検査を用いて聴器毒性を判定した。

【図8】A-C：+316ODC1遺伝子型に基づく薬理ゲノミクスベネフィット/リスク分析。この図は、患者の+316ODC1遺伝子型の関数として、治療及びプラセボ群に対して、ベネフィットである3年間の最後の%腺腫再発の低下を、リスクである%聴器毒性と比較する。聴力検査を用いて聴器毒性を判定した。

【図9】Min/+マウスの結腸における大きさによる平均腫瘍数。この図は、未処置対照と比較した、3種類の治療群の結腸における大きさ別の平均腫瘍数を示す。Jackson Laboratory (Bar Harbor, Me.)より購入したマウスをC57BL/6J-Apc<sup>Min/+</sup>雄マウス及びC57/BL6雌マウスと交配させた。tail-tip DNAを用いてアレルト異的PCRアッセイにより離乳時に遺伝子型を調べることで、ヘテロ接合MinマウスApc<sup>Min/+</sup> (Apcのコードン850におけるナンセンス突然変異に対するヘテロ接合)を同定した。ホモ接合(Apc<sup>+/+</sup>/Apc<sup>+/+</sup>)同腹仔を対照とした。一方の処置は、2%DFMO (Merrell Dow Research Inst.)入りの飲用水を試験第8日目に補給することから構成された。他方の処置において、試験第21日に167ppmのスリダク (Harlen Teklad)をAIN-93Gマウス飼料に添加した。第三の処置はDFMO及びスリダクの併用であった。114日後、CO<sub>2</sub>窒息によりマウスを屠殺した。小腸及び結腸片をマウスから取り出し、縦方向に切り、標本にして70%エタノール中で固定し、腫瘍スコア化のために4に置いた。組織病理評価のためにも代表的な組織を採取した。

【図10】Min/+マウスの小腸における大きさ別の平均腫瘍数。この図は、未処置対

10

20

30

40

50

照と比較した、3種類の治療群の小腸における大きさ別の平均腫瘍数を示す。実験の詳細については上記図9の記述を参照のこと。

【図11】Min/+マウスにおける治療の関数としての高悪性度腺腫数。この図は、高悪性度腺腫数が治療のタイプによってどのように変動するかを示す。実験の詳細については上記図9の記述を参照のこと。

【図12】1日の総食事性ポリアミン及び1日の総タンパク質摂取。全供給源からの1日の総食事性ポリアミン摂取と1日の総タンパク質摂取との間のベースライン時の相関。P値はスピアマンの順位相関係数( $r_s$ )を用いて報告する。

【図13】1日の総食事性ポリアミン及び1日の総アルギニン摂取。1日の食事からの総ポリアミン摂取と1日の総アルギニン摂取との間のベースライン時の相関。P値はスピアマンの順位相関係数( $r_s$ )を用いて報告する。

10

【発明を実施するための形態】

【0043】

場合によっては患者のODC1プロモーター遺伝子型に基づき、例えばオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)阻害剤及びスベルミジン/スベルミン $N^1$ -アセチルトランスフェラーゼ発現アゴニストを含む抗癌腫併用療法など、ポリアミン阻害物質による化学的予防に対する補助的な戦略として、いくつかの局面において、外因性ポリアミンを調節することが利用され得る。例えばオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)阻害剤と、全体的な細胞ポリアミン含量を減少させるためのポリアミン経路を調節する薬剤と、を含む抗癌腫併用療法の有効性を予測するために、いくつかの局面において、組織ポリアミンレベル又は組織ポリアミン流入を評価することが使用され得る。

20

【0044】

本発明はまた、いくつかの局面において、癌の発症を予防するための及び/又は、新規異常陰窩巢の形成、新規腺腫性ポリープの形成又は異形成のある新規腺腫などの癌リスク因子の発現を予防するための、前癌症状を示す個体への治療用化合物の送達も含む。このカテゴリーの細胞には、患者のODC1プロモーター遺伝子型に少なくとも一部基づき、癌状態に進行する可能性があることを示す、ポリープ及びその他の前癌病変、前悪性、前腫瘍性又は他の異常な表現型が含まれる。

【0045】

I. ポリアミン代謝

30

過剰なポリアミン形成は、長年にわたり、上皮癌腫形成、特に結腸直腸癌腫形成と関連付けられてきた。ポリアミンは、転写、RNA安定化、イオンチャネルゲーティングその他を含む様々なプロセスに関与するユビキタな小分子である(Wallace、2000)。ポリアミン合成における最初の酵素であるオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)は、哺乳動物において正常な発現及び組織修復に必須であるが、殆どの成体組織では下方制御されている(Gerner及びMeyerskens、2004)。ポリアミン代謝及び輸送の調節に複数の異常があるとポリアミンレベルが上昇するが、これは一部の組織において腫瘍形成を促進し得る(Thomas及びThomas、2003)。

【0046】

結腸及び他の癌のリスクが高いことと関連する症候群である、家族性腺腫性ポリープ症(FAP)を有するヒトの腸上皮組織において、ポリアミン代謝が上方制御される(Giardielloら、1997)。

40

【0047】

FAPは、腺腫性大腸ポリポーシス(APC)腫瘍抑制因子遺伝子における突然変異により起こり得、APCシグナル伝達は、ヒト細胞(Fultz及びGerner、2002)及びFAPのマウスモデル(Erdmanら、1999)の両方でODC発現を制御することが示されている。

【0048】

野生型APC発現によりODC発現が低下し、一方で突然変異体APCによりODC発現が上昇する。ODCのAPC-依存性制御のメカニズムには、転写活性化因子c-MY

50

C及び転写抑制因子MAD1を含むE-ボックス転写因子が含まれる(Fultz及びGerner、2002; Martinezら、2003)。他の研究者により、c-MYCがODC転写を制御することが示された(Bellofernandezら、1993)。ポリアミン代謝に関与する一部の遺伝子は、殆どの生物での最適発育のための必須遺伝子であり、非増殖及び/又は成体細胞及び組織において下方制御される(Gerner及びMeyskens、2004)。他所で総説されているように、ポリアミンは、ある部分、遺伝子発現パターンに影響を及ぼすことによって、特異的な細胞表現型に影響を与える(Childsら、2003)。

#### 【0049】

下記で述べるように、ODC活性(即ちポリアミン合成の律速酵素)の阻害及び/又は細胞ポリアミンレベル低下を含むストラテジーは、ヒトにおける結腸直腸ポリープ再発の予防において顕著な有効性が明らかになっている。本研究による疫学的及び実験的な結果から、ODCにおける遺伝多型によるポリアミンホメオスタシスの条件付制御が明らかとなり、+316ODC SNPが結腸腺腫再発に対する保護的なものであり得、結腸癌診断後の生存に有害であり得るというモデルが示唆される。結腸癌予後を判定するためにこの情報を使用し得る。癌進行/再発のリスクが高い患者を同定することにより、三次予防管理ストラテジーの早期実現を導入することができる。さらに、この研究は、三次癌予防療法から恩恵を受ける、ハイリスクであるがそれ以外は最適に処置されている局所結腸直腸癌患者を同定するために使用することができる。

#### 【0050】

患者の食事に依存して、ポリアミン、例えばブトレッシンが多くの一般的な食品に存在し、例えばオレンジジュースではおよそ400ppmのブトレッシン含有するという事実により、過剰ポリアミンの問題がさらに複雑化し得る。この点で、高ポリアミン食は禁忌であり、本明細書中で提供される実施態様の一部に対して、このような食事は回避すべきものである。

#### 【0051】

##### II. 食事性ポリアミン摂取の評価

ポリアミン含量が高いものを含む様々な食品の1日の平均摂取量を記録する患者の病歴を得ることによって、対象の食事性摂取を正確に推定することができる。例えば、Fred Hutchinson Cancer Research Centerの食物摂取頻度調査票(FFQ)及びこの手段に対する分析アルゴリズムを使用することができる。Kristal AR, Shattock, A.L. 及びWilliams, A.E.: Food frequency questionnaires for diet intervention research. Washington, DC: International Life Sciences Institute, Proceeding of the 17th National Nutrient Databank Conference, Baltimore, MD, 1992, 1992; Schakel SF, Buzzard, IM. 及びGebhardt, S.E.: Procedures for estimating nutrient values for food composition databases. J Food Comp Anal 10:102-14, 1997。食事性ポリアミン摂取量を推定するために、University of Minnesota Nutrition Coordinating Center(NCC) Nutrient Databaseを食品含量データの主な情報源とし、開発し、FFQにリンクさせたポリアミン食品含量データベースを使用し得る(Zoumas-Morse C, Rock CL, Quintana ELら: Development of a polyamine Database for assessing dietary intake. J Am Diet Assoc 107:1024-7, 2007)。個々の食品中のスペルミン、スペルミジン及びブトレッシンに対する値を使用し得るが、あるいは、食事性の総ポリアミン摂取の主要な貢献因子として食事のブトレッシンを単独で評価し得る。結果をエネルギーで補

正することもできる。

#### 【0052】

##### III. 組織ポリアミンレベルの評価

直腸粘膜組織、前立腺組織及び尿を含む様々な異なる組織供給源を用いて、生検から組織ポリアミン含量を決定することができる。好ましくは、組織は、不快感及び回復時間を最小限に抑える、比較的非侵襲性の組織生検プロセスが可能なものである。文献に記載のように、使用されてきた特定のソースは直腸粘膜である。Meyskens FL, Gerner EW, Emerson SR: Effect of alpha-difluoromethylornithine on Rectal Mucosal levels of polyamines in a randomized, double-blind trial for colon cancer prevention. Journal of the National Cancer Institute 90:1212-1218, 1998; Boyle JO, Meyskens FL, Jr., Garewal HS: Polyamine contents in rectal and buccal mucosae in humans treated with oral difluoromethylornithine. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1:131-5, 1992, これらは両者とも本明細書中に参照により組み込まれる。試料に氷冷食塩水をフラッシュし、使用まで - 80 で凍結保存し得る。

#### 【0053】

適切なアッセイ用に試料を処理し、内部標準として1,7-ジアミノヘプタンを用いた逆相高速液体クロマトグラフィーなどの許容可能な方法によって、ポリアミン含量(ブトレッシン、カダベリン、ヒスタミン、スペルミジン、スペルミンならびにブトレッシン、スペルミジン及びスペルミンのモノアセチル誘導体)について評価する。Meyskens FL, Gerner EW, Emerson SR: Effect of alpha-difluoromethylornithine on Rectal Mucosal levels of polyamines in a randomized, double-blind trial for colon cancer prevention. Journal of the National Cancer Institute 90:1212-1218, 1998; Seiler N, Knodgen B: High-performance liquid chromatographic procedure for the simultaneous determination of the natural polyamines and their monoacetyl derivatives. J. Chromatogr. 221:227-235, 1980, これらは両者とも本明細書中に参照により組み込まれる。市販のBCAタンパク質アッセイキット(Pierce、Rockford、IL)に記載のものなど、当技術分野で公知の技術を用いて試料中の総タンパク質含量を調べることができる。

#### 【0054】

##### IV. 低ポリアミン食

対象の組織ポリアミンレベルが高いか又は食事から摂取されるポリアミンが許容できないほど高いことが分かった場合、その対象は、本発明によるオルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤及びスペルミジン/スペルミンN<sup>1</sup>-アセチルトランスフェラーゼ発現アゴニストを含む治療レジメンの前に又はその一部として、それらのポリアミン摂取を減少させることが推奨され得る。組織ポリアミン又は食事性摂取が中程度である対象でも、低ポリアミン食から利益を得ることができる。

#### 【0055】

食品のポリアミン含量は多岐にわたるが、一般的に、ポリアミン摂取を減少させたい場合、次の食品は避けるべきである: オレンジ、グレープフルーツ、ナシ、バナナ、チーズ、ジャガイモ、プディング、塩漬け肉、ソーセージ、豚肉煮込み、タラ、魚のフライ、ア

ンチョビ、エンドウ、豆類、タマネギ、トマト、赤ワイン、ナッツ類、ハーブ類、レンティル。これらの食品の少なくとも一部の摂取量を減少させ、オレンジ、グレープフルーツ、チーズ及びトマトなどの数種類を排除することによって、ポリアミンレベルに対して大きな影響が与えられ得る。

#### 【0056】

##### V. 家族性腺腫性ポリポシス

遺伝性ポリポシス症候群である家族性腺腫性ポリポシス (FAP) は、腺腫性大腸ポリポシス (APC) 腫瘍抑制因子遺伝子の生殖系列突然変異の結果である (Sura、1992)。発現が様々であるこの常染色体優性状態は、孤発性の結腸癌に対する平均診断年齢よりも20年早く、40歳までに腺癌に一樣に進行する数百の結腸腺腫の発生に關与する (Busssey、1990)。発症前のFAP個体の先行研究において、正常な家族構成員対照と比較した場合、正常に見える結腸直腸生検組織中でポリアミン、スベルミジン及びスベルミンならびにそれらのジアミン前駆体ブトレッシンレベルの上昇が検出されている (Giardielloら、1997)。哺乳動物ポリアミン合成における第一の酵素であり律速酵素であるオルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) の活性もFAP患者由来の見かけ上正常な結腸粘膜生検組織において上昇している (Giardielloら、1997; Luk及びBaylin、1984)。ポリアミンが最適な細胞増殖に必要なので、これらの知見は興味深い (Pegg、1986)。さらに、癌原物質で処理したげっ歯類動物において、酵素で活性化される不可逆的阻害剤DFMOを用いたODC活性の抑制によって、結腸癌腫形成が抑制される (Kingsnorthら、1983; Temperoら、1989)。

#### 【0057】

下記で詳述するように、FAPと共通する変異APC/apc遺伝子型を有するMin (多発性腸腫瘍) マウスは、ヒトFAP患者に対する有用な実験動物モデルである (Lipkin、1997)。Minマウスは、生後120日までに消化管全体にわたり100個を超える胃腸腺腫/腺癌を発生させ得、GI出血、閉塞を引き起こし、死に至る。DFMO及びスリンダクの併用療法は、これらのマウスにおいて腺腫を減少させるために有効であることが示された (米国特許第6,258,845号; Gerner及びMeyerskens、2004)。結腸又は小腸の何れかでの腫瘍形成におけるDFMO単独、スリンダク単独又はDFMO及びスリンダクの併用の何れかによるMinマウスの処置の結果を図9から11に示す。

#### 【0058】

##### VI. オルニチンデカルボキシラーゼ - 1 遺伝多型

ポリアミン合成における第一の酵素であるオルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) の活性は正常な発育に必要であり、結腸直腸癌を含む多くの癌において上昇している。本明細書中で、CRC症例中での結腸直腸癌 (CRC) - 特異的生存率と+316ODC一塩基多型 (SNP) の関連を調べ、結腸癌細胞におけるその機能的意義を調べた。

#### 【0059】

ヒトODC1遺伝子のイントロン-1における一塩基多型 (SNP) は、ODC1転写に影響を及ぼし (Guoら、2000)、結腸直腸腺腫 (CRA) リスクに対する遺伝的マーカーとして研究されてきた (Martinezら、2003; Barryら、2006; Hubnerら、2008)。報告されたマイナーA-アレル頻度はおよそ25%であり、人種/民族間の差にもかかわらず、ODC1遺伝子型分布は、各人種内でハーディー・ワインベルグ平衡にある (O'Brienら、2004; Zellら、2009)。ODC1マイナーA-アレルに対してホモ接合である個体は、メジャーG-アレルの個体と比較して腺腫再発リスクが低い (Martinezら、2003; Hubnerら、2008)。さらに、ODC1A-アレル (AA又はGA遺伝子型であるがGG遺伝子型ではない) 及びアスピリン使用の報告は、結腸ポリプ再発減少と関連付けられており (Martinezら、2003; Barryら、2006; Hubnerら、2008)、進行性腺腫のリスクが統計学的に有意に50%低かった (Barryら、2006)。

## 【 0 0 6 0 】

E - ボックス転写因子のODCアレル特異的結合を調べ、2個のE - ボックス間に位置する+ 3 1 6 ODC SNPの機能的意義を評価した(図2Aで示されるE - ボックス2及び3)。各細胞株遺伝子型は、この領域においてコンセンサスPst1制限部位に影響を与える。図2Bは、ヒト結腸HT29細胞から生成されたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)産物が、ある程度はPst1切断に感受性があることを示しており、これらの細胞が少なくとも1つのODC A - アレルを含有することが示唆された。同じプライマーを用いてヒト結腸HCT116細胞から生成されるPCR産物はPstIの作用に対して不感受性であり、これらの細胞に含有されるのはODC G - アレルのみであることが示唆された。直接DNA配列決定によりこの結果を確認した。

10

## 【 0 0 6 1 】

ウエスタンブロッティングを行うことによって、HT29及びHCT116細胞(例えばMAD1及びMAD4)における転写活性化因子c - MYC及びいくつかの転写抑制因子を含む特異的E - ボックス結合タンパク質の発現を確認した(図3A)。これらのタンパク質に対する抗体を用いて、ODCプロモーターの+ 3 1 6周辺領域のクロマチン免疫沈降(CHIP)の分析を行った。図3Bで示されるように、c - MYC、MAD1又はMAD4に対する抗体によるクロマチン免疫沈降後に得られたHT29 DNAから、ODCプロモーター特異的PCR産物が合成された。同様のクロマチン免疫沈降後にHCT116 DNAから合成されたPCR産物は、HT29 DNAから合成されたものと比較して実質的に少なかった。これらの結果の定量から、ODC - Gアレルのみを含有したHCT116細胞と比較して、1つのODC - Aアレルを含有したHT29細胞においてODC SNP領域へのc - MYC、MAD1及びMAD4結合が4から14倍大きかったことが示された。

20

## 【 0 0 6 2 】

ODCアレル特異的プロモーター活性を評価した。E - ボックス活性化因子及び抑制因子の発現に依存して+ 3 1 6 ODC SNPがODC発現に影響を及ぼすという仮説を次のように検証した。転写活性化因子c - MYC又は抑制因子MAD1の何れかを発現するベクターと組み合わせてODCアレル特異的プロモーターコンストラクトを用いて結腸癌由来HT29細胞に対して一過性同時形質移入を行った(図4A及びB)。示される標準誤差バーは、1回の代表的実験内の三つ組み測定における変動を反映しており、これは再現されている。これらの実験で使用したアレル特異的プロモーターレポーターには、図2Aで示される3個のE - ボックス全てが含まれた。図4Aで示されるように、3個のコンセンサスE - ボックス及びODC - Aアレルを含有するプロモーターに対して、c - MYC発現が最大の刺激作用を有していた(wtE - ボックス1 + 3 1 6 A、 $P = 0.0014$ )。上流E - ボックスの欠失によりプロモーター活性が低下したが、c - MYC発現がこの活性を刺激し続けた(mutE - ボックス1 + 3 1 6 A、 $P = 0.0013$ )。+ 3 1 6 SNP位置のAからGへの置換によって、無傷の5'フランキングコンセンサスE - ボックスがあっても、c - MYCのプロモーター活性刺激能が低下した。5'フランキングコンセンサスE - ボックスの突然変異は、ODC - Gアレルとの組み合わせで、プロモーター活性をさらに低下させた。

30

40

## 【 0 0 6 3 】

c - MYCではなくMAD1をODCアレル特異的プロモーターレポーターとともに同時形質移入した場合(図4B)、抑制因子は、3個全てのE - ボックス及び野生型+ 3 1 6 A - アレルを含有したODCプロモーターの活性のみを低下させることができた( $P = 0.027$ )。上流E - ボックスの欠失(mutE - ボックス1 + 3 1 6 A)により、ODCプロモーター活性に対するMAD1の効果が顕著に低下した。+ 3 1 6位置でのAからGへの置換によって、2又は3個のE - ボックスの何れかを含有するプロモーターがMAD1抑制に反応しなくなった。

## 【 0 0 6 4 】

VII. ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)

50



エフロルニチンとしても知られるDFMOは次の化学式、2-(ジフルオロメチル)-d1-オルニチンを有する。これは、ポリアミン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、酵素により活性化される不可逆的阻害剤である。このポリアミン合成阻害の結果、この化合物は、多くの器官系における癌形成の阻止、癌発育の抑制及び腫瘍の縮小化に有効となる。これは、他の抗腫瘍薬との相乗作用も有する。

【0065】

DFMOはマウスにおいてAPC依存性腸腫瘍形成を抑制することが示されている(Erdmanら、1999)。ヒトに経口DFMOを毎日投与することによって、多くの上皮組織においてODC酵素活性が阻害され、ポリアミン含量が低下する(Loveら、1993; Gernerら、1994; Meyskensら、1994; Meyskensら、1998; Simoneauら、2001; Simoneauら、2008)。近年、発明者らは、非ステロイド性抗炎症剤(NSAID)スリダクと組み合わせて、DFMOが、ランダム化臨床試験においてプラセボと比較した場合、結腸腺腫を有する個体間で腺腫再発率を顕著に低下させることが報告されていることを報告した(Meyskensら、2008)。

【0066】

DFMOは最初、Centre de Recherche Merrell、Strasbourgにより合成され；現在のFDA承認には次のものが含まれる：

- ・アフリカ睡眠病。高用量全身IV剤 - 市販されていない(Sanofi/WHO)。
- ・多毛症(アンドロゲン誘発性の過剰毛髪発育)局所製剤。経口製剤は現在のところ承認されていない。

【0067】

良性前立腺肥大の治療におけるDFMO及びその使用は、米国特許第4,413,141号及び同第4,330,559号という2つの特許に記載されている。米国特許第4,413,141号は、インビトロ及びインビボの両方でのODCの強力な阻害剤であるものとしてDFMOを記載する。DFMOの投与により、プトレッシン及びスベルミジンが通常は活発に産生される細胞においてこれらのポリアミン濃度が低下する。さらに、DFMOは、標準的腫瘍モデルで試験した際に、腫瘍細胞増殖を遅延させることができることが分かっている。米国特許第4,330,559号は、良性前立腺肥大の治療のためのDFMO及びDFMO誘導体の使用を記載する。急速な細胞増殖を特徴とする多くの疾患状態のように、良性前立腺肥大にはポリアミン濃度の異常な上昇が付随する。この参考文献内に記載される治療薬を経口又は非経口の何れかで患者に投与することができる。

【0068】

DFMOは、顕著な抗腫瘍効果を継続的に与え得る可能性がある。この薬物は、ヒトに対して0.4g/m<sup>2</sup>/日という低用量では比較的毒性がなく、同時に腫瘍においてプトレッシン合成の阻害を引き起こす。ラット腫瘍モデルにおける研究から、末梢血小板数を抑制することなく、DFMO点滴により腫瘍プトレッシンレベルが90%低下し得ることが明らかになる。

【0069】

DFMOとともに認められる副作用には4g/M<sup>2</sup>/日の高用量での聴力に対する影響が含まれるが、これは投与を中断すると解決する。聴力におけるこれらの影響は、1年以下の投与の場合、0.4g/M<sup>2</sup>/日という低用量では認められない(Meyskensら、1994)。さらに、薬物を中断すると解決する眩暈/目まいの例が数例見られる。DFMOの高治療用量(>1.0g/m<sup>2</sup>/日)を用いた研究において及び主に以前に化学療法を受けたことがある癌患者又は骨髄に障害がある患者において、血小板減少症が主に報告されている。一般に、限られた臨床試験において、DFMO療法に付随する毒性は他のタイプの化学療法ほど重くないが、用量に関連して血小板減少症を促進させることが分かった。さらに、ラットにおける研究から、12日間にわたるDFMOの連続点滴により、対象と比較して血小板数が顕著に減少することが分かった。他の研究から、血小板減少症が連続i.v.DFMO療法の主要な毒性であるという同様の所見が得られている。

これらの知見から、DFMOが、巨核球の骨髓前駆細胞のODC活性を顕著に抑制し得ることが示唆される。DFMOは、上皮創傷治癒などの増殖性修復プロセスを阻害し得る。

#### 【0070】

第III相臨床試験では、ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)+スリダク又は対応するプラセボでの36ヶ月にわたる治療後の腺腫性ポリープ再発を評価した。一時的難聴は、DFMOによる治療の既知の毒性であり、従って、連続空気伝導聴力図を分析するために、包括的アプローチを開発した。周波数での反復測定による対象内相関を考慮しながら、一般化推定方程式法により、空気伝導純音閾値の変化に関して治療群間の平均差を推定した。290名の対象に基づき、プラセボで処置した対象と比較して、ベースライン値、年齢及び周波数に対して調整して、DFMO+スリダクで治療した対象間で0.50dBの平均差があった(95%信頼区間、-0.64から1.63dB; P=0.39)。500から3,000Hzの通常の会話音域で、0.99dB(-0.17から2.14dB; P=0.09)という推定差が検出された。用量強度はモデルに対する情報を追加しなかった。DFMO+スリダク群では151名中14名(9.3%)、プラセボ群では139名中4名(2.9%)で、試験した全領域にわたり、2以上の連続した周波数でベースラインからの少なくとも15dBの聴覚低下が見られた(P=0.02)。治療終了後、少なくとも6ヶ月で行ったフォローアップ空気伝導から、治療群間で1.08dBの聴覚閾値で調整済み平均差が示された(-0.81から2.96dB; P=0.26)。プラセボ群と比較して、臨床的に意義のある難聴があったDFMO+スリダク群の対象の割合に有意差はなかった。薬物曝露からの聴器毒性の推定寄与リスクは8.4%である(95%信頼区間、-2.0%から18.8%; P=0.12)。プラセボで処置した患者と比較して、DFMO+スリダクで治療した患者に対する平均閾値の差は<2dBである。この研究の結果は、その全体において参照により本明細書中に組み込まれるMcLarenら、2008に詳細に記載されている。本明細書中で、DFMO及びスリダクなどの薬物で治療する患者の聴器毒性を軽減し及び/又は予防する方法が提供される。

#### 【0071】

##### VII. NSAID

NSAIDは、ステロイドではない抗炎症剤である。抗炎症作用に加えて、これらは、鎮痛、解熱及び血小板抑制作用を有する。これらは最初、慢性関節炎状態及び疼痛及び炎症を伴うある種の軟組織障害の治療において使用された。これらは、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へとアラキドン酸を変換するシクロオキシゲナーゼを阻害することによりプロスタグランジンの合成を阻止することによって作用する。プロスタグランジン合成阻害はそれらの鎮痛、解熱及び血小板抑制作用の主要な要因であり; それらの抗炎症効果には他のメカニズムが関与し得る。ある種のNSAIDのみ、リポキシゲナーゼ酵素もしくはホスホリパーゼCも阻害し得るか又はT細胞機能も調節し得る(AMA Drug Evaluations Annual, 1814-5, 1994)。

#### 【0072】

アスピリン、イブプロフェン、ピロキシカム(Reddyら、1990; Singhら、1994)、インドメタシン(Narisawa、1981)及びスリダク(Piazzaraら、1997; Raoら、1995)を含む非ステロイド性抗炎症剤(NSAID)は、AOM-処置ラットモデルにおいて効果的に結腸癌腫形成を抑制する。NSAIDは、活性化Ki-rasを有する腫瘍の発生も抑制する(Singh及びReddy、1995)。NSAIDは、腫瘍細胞におけるアポトーシスの誘導を介して癌腫形成を抑制すると思われる(Bediら、1995; Lupulescu、1996; Piazzaraら、1995; Piazzaraら、1997b)。多くの研究から、アポトーシスの誘導を含むNSAIDの化学予防特性が、それらのプロスタグランジン合成阻害能の機能であることが示唆される(DuBoisら、1996; Lupulescu、1996; Vane及びBottting、1997において概説)。しかし、研究から、NSAIDがプロ

スタグランジン依存性及び非依存性メカニズムの両方を通じて作用し得ることが示される (Albertsら、1995; Piazzaraら、1997a; Thompsonら、1995; Hanif、1996)。NSAIDスリンダクの代謝産物である、スルホン化スリンダクはCOX-阻害活性を欠くが、それでも腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導し (Piazzaraら、1995; Piazzaraら、1997b)、一部の癌腫形成げっ歯類モデルにおいて腫瘍発生を阻害する (Thompsonら、1995; Piazzaraら、1995、1997a)。

#### 【0073】

一部のNSAIDはヒト臨床試験においてそれらの効果について試験されている。イブプロフェンの第IIa相臨床試験(1ヶ月)が完了しており、300mg/日という用量でも、平坦粘膜におけるプロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)レベルの顕著な低下が見られた。イブプロフェンの300mgという用量は非常に低く(治療用量は、1日に1200から3000mgの範囲又はそれ以上)、長期間でも毒性が見られる可能性は少ない。しかし、動物の化学的予防モデルにおいて、イブプロフェンは他のNSAIDよりも効果が低い。

#### 【0074】

A. スリンダク及びその主要な代謝産物、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、次の化学名を有する非ステロイド、抗炎症性インデン誘導体である；(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 Reference、1999)。スルフィニル部分は、インビボで可逆性の還元によりスルフィド代謝産物に変換され、不可逆的酸化によりスルホン代謝産物(エクシスリンド)に変換される。その全体において参照により本明細書中に組み込まれる米国特許第6,258,845号を参照のこと。Ki-ras活性化も阻害するスリンダクは、COX阻害能が異なる2つの異なる分子に代謝されるが、それでも両者ともアポトーシスの誘導を介して化学予防効果を発揮することができる。スルホン化スリンダクはCOX-阻害活性を欠きプロスタグランジン合成依存性に殆どがアポトーシスの誘導を促進すると思われる。入手可能な証拠から、スルフィド誘導体が生物学的に活性のある化合物の少なくとも1つであることが示される。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。

#### 【0075】

スリンダク(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。成人に対する最も一般的な投与量は1日2回150から200mgであり、最大1日用量は400mgである。経口投与後、薬物の約90%が吸収される。空腹状態の患者では約2時間でピーク血漿濃度に到達し、食後投与の場合は3から4時間で到達する。スリンダクの平均半減期は7.8時間であり、スルフィド代謝産物の平均半減期は16.4時間である。米国特許第3,647,858号及び同第3,654,349号はスリンダクの調製を包含するが、両者ともそれらの全体において本明細書中に参照により組み込まれる。

#### 【0076】

スリンダクは、変形性関節症、関節リウマチ、強直性脊椎炎、急性痛風及び急性肩痛の兆候及び症状の短期的及び長期的緩和のために適用される。スリンダク(400mg/日)によりもたらされる鎮痛及び抗炎症効果は、アスピリン(4g/日)、イブプロフェン(1200mg/日)、インドメタシン(125mg/日)及びフェニルブタゾン(400から600mg/日)により達成される効果に匹敵する。スリンダクの副作用には、患者のほぼ20%における軽度の胃腸への影響が含まれ、腹痛及び吐き気が最も頻度の高い訴えである。CNS副作用が見られるのは患者の10%以下であり、眠気、頭痛及び神経過敏が最もよく報告される。皮膚発疹及び掻痒が起こるのは患者のうち5%である。スリンダクによる長期治療により、出血、潰瘍形成及び穿孔などの重篤な消化管毒性が起こり得る。

#### 【0077】

癌及び特に結腸直腸ポリープの化学的予防法のためのスリダク使用の可能性について、詳細に研究されてきた。2つの最近の米国特許第5,814,625号及び同第5,843,929号は、ヒトにおけるスリダクの化学予防の使用の可能性について詳述している。両特許ともそれらの全体において本明細書中に組み込まれる。米国特許第5,814,625号で主張されるスリダクの用量は、10mgから1500mg/日の範囲であり、好ましい用量は50mgから500mg/日である。しかし、高用量において、化学的予防における単剤としてのスリダクの使用に伴うより大きな問題は、その周知の毒性及びやや高い不耐性のリスクである。60代を超えると副作用発生率が高くなるので、高齢者は特に脆弱であると思われる。この年齢群は結腸直腸癌が発生する可能性が最も高く、従って化学的予防法により利益を受ける可能性が最も高いことに注意されたい。

10

【0078】

スリダク及びそのスルホン代謝産物エクシスリンドはいくつかの癌タイプの予防及び治療について試験され、臨床試験が継続中である。Clinical Trials.gov, U.S. National Institutes of Healthデータベースから、2010年5月10日現在で次の概要が提供される。

【表 1】

状況	臨床試験	
被験者募集中	口腔前癌病変におけるスリンダクのランダム化試験 状態： 白板症、口腔；良性腫瘍 介入： 薬物：スリンダク；薬物：プラセボ 治験依頼者： Memorial Sloan-Kettering Cancer Center； Head and Neck Surgery, AIMS, Cochin, India； Weill Medical College of Cornell University； Regional Cancer Centre (RCC), Trivandrum, India； Mazumdar Shaw Cancer Center (MSCC) フェーズ なし	10
状況	臨床試験	
被験者募集中	メラノーマのリスクが高い健康参加者におけるメラノーマ予防におけるスリンダク 状態： 前癌状態 介入： 薬物：スリンダク；その他：プラセボ 治験依頼者： University of Arizona； National Cancer Institute (NCI) フェーズ 第II相	
治験中、被験者募集なし	結腸ポリープのある患者の結腸直腸癌の予防におけるエフロルニチン及びスリンダク 状態： 結腸直腸癌； 前癌／非悪性状態 介入： 薬物：エフロルニチン＋スリンダク 治験依頼者： University of California, Irvine； Chao Family Comprehensive Cancer Center； National Cancer Institute (NCI) フェーズ 第III相	20
試験終了	乳癌に対するハイリスク女性の乳癌予防におけるスリンダク 状態： 乳癌 介入： 薬物：スリンダク； その他：実験室／バイオマーカー分析 治験依頼者： University of Arizona； National Cancer Institute (NCI) フェーズ 第I相	30
試験終了	健康ボランティアにおけるスリンダク錠剤と比較したスリンダクカプセル 状態： 不特定成人固形腫瘍、 プロトコール特異的 介入： 薬物：スリンダク； その他：薬理学的実験 治験依頼者： Mayo Clinic； National Cancer Institute (NCI) フェーズ	
治験中、被験者募集なし	良性結腸直腸ポリープのある患者での結腸直腸癌予防におけるエフロルニチン＋スリンダク 状態： 結腸直腸癌 介入： 薬物：エフロルニチン＋スリンダク 治験依頼者： University of California, Irvine； Chao Family Comprehensive Cancer Center； National Cancer Institute (NCI) フェーズ 第II相	40
状況	臨床試験	

治験中、被験者募集なし	<p>頭頸部扁平上皮癌におけるベシズマブ／タルセバ及びタルセバ／スリダク</p> <p>状態： 頭頸部の扁平上皮癌(SCCHN)</p> <p>介入： 薬物：ベシズマブ；薬物：エルロチニブ； 薬物：スリダク</p> <p>治験依頼者： Massachusetts General Hospital； Dana-Farber Cancer Institute； Emory University； University of North Carolina, Chapel Hill； Genentech；OSI Pharmaceuticals</p> <p>フェーズ 第II相</p>	10
治験中、被験者募集なし	<p>気管支異形成がある喫煙者又は以前喫煙していた対象での肺癌予防におけるスリダク</p> <p>状態： 肺癌；前癌状態； 喫煙障害</p> <p>介入： 薬物：スリダク；その他：プラセボ</p> <p>治験依頼者： Mayo Clinic； National Cancer Institute(NCI)</p> <p>フェーズ 第II相</p>	
試験終了	<p>類癌腫のある患者の治療におけるスリダク及びタモキシフェン</p> <p>状態： 類癌腫</p> <p>介入： 薬物：スリダク；薬物：クエン酸タモキシフェン</p> <p>治験依頼者： Children's Oncology Group； National Cancer Institute(NCI)</p> <p>フェーズ 第II相</p>	20
被験者募集中	<p>転移性悪性メラノーマ患者の治療におけるスリダク及びエピルビシン</p> <p>状態： メラノーマ（皮膚）</p> <p>介入： 薬物：エピルビシン塩酸塩；薬物：スリダク； その他：免疫学的技術</p> <p>治験依頼者： All Ireland Cooperative Oncology Research Group</p> <p>フェーズ 第II相</p>	
試験終了	<p>結腸直腸新生物発生リスクの高い患者での癌予防におけるアトロバスタチン、オリゴフルクトース強化イヌリン又はスリダク</p> <p>状態： 結腸直腸癌；前癌状態</p> <p>介入： 栄養補助食品：オリゴフルクトース強化イヌリン； 薬物：アトロバスタチンカルシウム；薬物：スリダク； その他：プラセボ</p> <p>治験依頼者： Mayo Clinic；National Cancer Institute(NCI)</p> <p>フェーズ 第II相</p>	30
状況	臨床試験	
参加者募集中断	<p>結腸癌の予防におけるスリダク及び植物化合物</p> <p>状態： 結腸直腸癌</p> <p>介入： 栄養補助食品：クルクミン； 栄養補助食品：ルチン；薬物：ケルセチン； 薬物：スリダク</p> <p>治験依頼者： Rockefeller University</p> <p>フェーズ</p>	40

治験中、被験者募集なし	<p>結腸直腸癌予防におけるスリダグ、アスピリン及びウルソジコールの比較</p> <p>状態: 結腸直腸癌</p> <p>介入: 薬物: アセチルサリチル酸; 薬物: スリダグ; 薬物: ウルソジコール</p> <p>治験依頼者: M. D. Anderson Cancer Center; National Cancer Institute (NCI)</p> <p>フェーズ 第II相</p>	
試験終了	<p>転移性又は再発乳癌罹患女性の治療におけるスリダグ及びドセタキセル</p> <p>状態: 乳癌</p> <p>介入: 薬物: ドセタキセル; 薬物: スリダグ</p> <p>治験依頼者: Fox Chase Cancer Center; National Cancer Institute (NCI)</p> <p>フェーズ 第II相</p>	10
被験者募集中	<p>家族性腺腫性ポリポーシス患者での回腸嚢腫(Pouch Adenoma)の発生におけるスリダグ及びプロバイオティクスの影響</p> <p>状態: 腺腫性大腸ポリポーシス</p> <p>介入: 薬物: スリダグ (薬物); 薬物: VSL#3 (プロバイオティクス); 薬物: イヌリン (プロバイオティクス)</p> <p>治験依頼者: Radboud University; Dutch Cancer Society</p> <p>フェーズ 第II相</p>	
試験中止	<p>ヒト結腸の異常陰窩巣に対するクルクミノイドの影響</p> <p>状態: 異常陰窩巣</p> <p>介入: 薬物: スリダグ; 薬物: クルクミン</p> <p>治験依頼者: University of Medicine and Dentistry New Jersey</p> <p>フェーズ</p>	20
状況	臨床試験	
被験者募集中	<p>家族性腺腫性ポリポーシス (FAP) での腸腫の治療に対するクルクミンの使用</p> <p>状態: FAP 患者における下部消化管ポリープ; FAP 患者における上部消化管ポリープ</p> <p>介入: 薬物: カルクミン (クルクミン); その他: リスク因子質問表 (Risk Factor Questionnaire); その他: 血液検料; その他: 生検 (S状結腸鏡検査); その他: 生検 (上部内視鏡検査)</p> <p>治験依頼者: University of Puerto Rico</p> <p>フェーズ</p>	30
治験中、被験者募集なし	<p>間欠性アンドロゲン除去療法の休薬期間の延長</p> <p>状態: 前立腺癌</p> <p>介入: 薬物: フルタミド; 薬物: 酢酸ロイプロリド; 薬物: エクシスリンド</p> <p>治験依頼者: University of Washington; OSI Pharmaceuticals</p> <p>フェーズ 第II相</p>	40
試験終了	<p>転移性乳癌患者におけるカベシタビンとエクシスリンドとの間の安全性、有効性及び薬物動態</p> <p>状態: 乳癌; 転移、新生物</p> <p>介入: 薬物: カベシタビン; 薬物: エクシスリンド</p> <p>治験依頼者: M. D. Anderson Cancer Center; Cell Pathways</p>	

	フェーズ: 第I相/第II相
試験終了	<p>ステージII又はステージIII 前立腺癌のために前立腺全摘手術を受けている患者の治療におけるネオアジュバントエクシスリンド</p> <p>状態: 前立腺癌</p> <p>介入: 薬物: エクシスリンド; 手段: 標準手術; 手段: ネオアジュバント療法</p> <p>治験依頼者: Mayo Clinic; National Cancer Institute (NCI)</p> <p>フェーズ 第II相</p>
試験終了	<p>進行性非小細胞肺癌患者の治療における併用化学療法</p> <p>状態: 肺癌</p> <p>介入: 薬物: カルボプラチン; 薬物: エクシスリンド; 薬物: ゲムシタビン塩酸塩</p> <p>治験依頼者: Eastern Cooperative Oncology Group; National Cancer Institute (NCI)</p> <p>フェーズ 第II相</p>
状況	臨床試験
試験終了	<p>非小細胞肺癌(NSCLC)患者においてエクシスリンドと併用したタキソテールの第II相試験</p> <p>状態: NSCLC</p> <p>介入: 薬物: エクシスリンド</p> <p>治験依頼者: OSI Pharmaceuticals</p> <p>フェーズ: 第I相/第II相</p>
試験終了	<p>非小細胞肺癌患者における、タキソテール/プラセボと比較したタキソテール/アプトシンの有効性の第III相試験</p> <p>状態: 非小細胞肺癌</p> <p>介入: 薬物: エクシスリンド</p> <p>治験依頼者: OSI Pharmaceuticals</p> <p>フェーズ 第III相</p>
試験終了	<p>前立腺切除後のエクシスリンド対プラセボ</p> <p>状態: 前立腺腫瘍</p> <p>介入: 薬物: エクシスリンド</p> <p>治験依頼者: Mayo Clinic; OSI Pharmaceuticals</p> <p>フェーズ 第II相</p>
試験終了	<p>ホルモン療法に反応しなかった転移性前立腺癌患者の治療におけるドセタキセル、エストラムスチン及びエクシスリンド</p> <p>状態: 前立腺癌</p> <p>介入: 薬物: ドセタキセル; 薬物: リン酸エストラムスチンナトリウム; 薬物: エクシスリンド</p> <p>治験依頼者: Cancer and Leukemia Group B; National Cancer Institute (NCI)</p> <p>フェーズ 第II相</p>
試験終了	<p>進展型小細胞肺癌患者の治療における併用化学療法及びエクシスリンド</p> <p>状態: 肺癌</p> <p>介入: 薬物: カルボプラチン; 薬物: エトポシド; 薬物: エクシスリンド</p> <p>治験依頼者: Cancer and Leukemia Group B; National Cancer Institute (NCI)</p> <p>フェーズ 第II相</p>
治験中、被験者募集なし	<p>家族性腺腫性ポリポーシス患者におけるポリープの予防におけるエクシスリンド</p> <p>状態: 結腸直腸癌; 小腸癌</p> <p>介入: 薬物: エクシスリンド</p>

10

20

30

40



	治験依頼者: University of Utah フェーズ: 第II相/第III相
状況	臨床試験
試験終了	前立腺全摘出術前のエクシスリンド 状態: 前立腺腫瘍 介入: 薬物: エキシスリンド療法 治験依頼者: Mayo Clinic; National Cancer Institute (NCI) フェーズ: 第II相

## 【 0 0 7 9 】

## B . ピロキシカム

4 - ヒドロキシ - 2 - メチル - N - 2 - ピリジル - 2 H - 1 , 2 - ベンゾチアジン - 3 - カルボキサミド 1 , 1 - ジオキシドの化学名を有する、関節リウマチ及び変形性関節症の治療において定着している非ステロイド抗炎症剤。筋骨格障害、月経困難症及び術後疼痛の治療においてもその有用性が明らかにされている。これは半減期が長いので、1日1回投与が可能である。この薬物は、直腸投与される場合、有効であることが示されている。副作用として報告される主訴は胃腸に関するものである。

## 【 0 0 8 0 】

ピロキシカムは、動物モデルにおいて有効な化学的予防薬であることが示されているが ( P o l l a r d 及び L u c k e r t , 1 9 8 9 ; R e d d y ら , 1 9 8 7 ) 、最近の I I b 臨床試験において副作用が明らかとなった。N S A I D の副作用の大規模メタ解析からも、ピロキシカムが他の N S A I D よりも副作用が大きいことが示されている ( L a n z a ら , 1 9 9 5 ) 。スリンダクは、家族性腺腫性ポリポーシス ( F A P ) 患者において腺腫を退縮させることが示されているものの ( M u s c a t ら , 1 9 9 4 ) 、孤発性の腺腫における少なくとも1つの研究からこのような効果がないことが示されている ( L a d e n h e i m ら , 1 9 9 5 ) 。

## 【 0 0 8 1 】

D F M O 及びピロキシカムの併用は、結腸癌腫形成の A O M 処置ラットモデルにおいて相乗的な化学予防効果があることが分かっているが ( R e d d y ら , 1 9 9 0 ) 、各薬剤を個別に投与した場合、D F M O は K i - r a s 突然変異及び腫瘍形成に対してピロキシカムよりも大きな抑制効果を発揮した ( R e d d y ら , 1 9 9 0 ) 。ある研究において、A O M 処置ラットに対する D F M O 又はピロキシカムの投与により、K i - r a s 突然変異を有する腫瘍数が 9 0 % からそれぞれ 3 6 % 及び 2 5 % に減少した ( S i n g h ら , 1 9 9 4 ) 。両薬剤とも、既存の腫瘍において生化学的活性のある p 2 1 r a s の量も低下させた。

## 【 0 0 8 2 】

## C . N S A I D の併用

様々な N S A I D の併用療法も様々な目的で使用されている。2 以上の N S A I D をより低用量で使用するることによって、より高用量の個々の N S A I D に付随する副作用又は毒性を抑えることができる。例えば、いくつかの実施態様において、スリンダクをセレコキシブと一緒に使用し得る。いくつかの実施態様において、N S A I D S の一方又は両方が選択的 C O X - 2 阻害剤である。単独で又は併用において使用し得る N S A I D S の例としては、次のものが挙げられるがこれらに限定されない：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。

## 【 0 0 8 3 】

## I X . エフロルニチン / スリンダク併用療法

低用量で併用で与えられた化学的予防薬の前臨床試験は、さらなる毒性が殆どなく、腺

10

20

30

40

50

腫の予防において顕著な有効性を示しており、このことから再発性腺腫の予防に対してリスクベネフィット比を向上させるための戦略が示唆される。

#### 【0084】

上述のように、FAPと共通する突然変異APC/apc遺伝子型を有するMin(多発性腸腫瘍)マウスは、ヒトFAP患者に対する有用な実験動物モデルとなる(Lipkin、1997)。Minマウスは、生後120日までに消化管全体にわたり100個を超える胃腸腺腫/腺癌を発生させ得、GI出血、閉塞を引き起こし、死に至る。DFMO及びスリンダクの併用療法は、これらのマウスにおいて腺腫を減少させるのに有効であることが示された(米国特許第6,258,845号; Gerner及びMeyskens、2004)。結腸又は小腸の何れかでの腫瘍形成に対して、DFMO単独、スリンダク単独又はDFMO及びスリンダク併用の何れかでMinマウスを処置した結果を図9から10で示す。図9は、未処置対照と比較した、この3種類の治療群の結腸における、大きさ別の平均腫瘍数を示す。図10は、未処置対照と比較した、この3種類の治療群の小腸における、大きさ別の平均腫瘍数を示す。図11は、高悪性度腺腫数が治療法、単独又は併用によってどのように変動するかを示す。

10

#### 【0085】

X. 患者プロファイルに基づくポリアミン抑制療法の有効性

CRA患者間での、経口D,L-ジフルオロメチルオルニチン(DFMO、エフロルニチン)及びスリンダクの長期連日投与による、ポリアミン抑制併用療法の有効性が明らかになったが(Meyskensら、2008)、治療には、中等度の無症候性聴器毒性が付随し(McLarenら、2008)、ベースライン時心血管系リスクが高い患者では心血管系イベントがより多かった(Zellら、2009)。プラセボと比較して、エフロルニチン及びスリンダク治療後では、腺腫再発、組織ポリアミン反応又は毒性プロファイルに対してODC1遺伝子型が与える影響が異なることが明らかになった。2010年5月14日出願の、Eugene Gerner, Jason Zell, Christine McLaren, Frank Meyskens, Hoda Anton-Culver及びPatricia A. Thompsonによる米国仮出願、題名「Carcinoma Diagnosis and Treatment, Based on ODC1 Genotype」、これはその全体において参照により組み込まれる。

20

#### 【0086】

腺腫(3mm)切除歴がある375名の患者を無作為に指名して、経口ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)500mg及びスリンダク150mgを1日1回又は適合するプラセボを36ヶ月間投与し、ベースライン時及び試験実施医療機関での低用量アスピリン(81mg)使用によって層別化した。ランダム化又は試験脱落から3年後にフォローアップ大腸内視鏡検査を行った。対数の二項分布回帰により群間で結腸直腸腺腫再発について比較した。プラセボ投与を受けた患者と活性薬投与を受けた患者との転帰を比較すると、(a)1以上の腺腫再発はそれぞれ41.1%及び12.3%であり(リスク比、0.30; 95%信頼区間、0.18-0.49;  $P < 0.001$ ); (b)1以上の進行性腺腫を有するのはそれぞれ患者の8.5%及び0.7%であり(リスク比、0.085; 95%信頼区間、0.011-0.65;  $P < 0.001$ ); (c)複数の腺腫(>1)を有するのは、最終的な大腸内視鏡検査でそれぞれ17名(13.2%)と1名であった(0.7%; リスク比、0.055; 0.0074-0.41;  $P < 0.001$ )。重篤な有害事象(グレード3)はプラセボ群の患者の8.2%で起こり、それに対して活性薬介入群では11%で起こった( $P = 0.35$ )。ベースラインからの聴覚変化を報告した患者の割合に有意差はなかった。経口低用量DFMO及びスリンダクの併用によって、少ない副作用で再発性腺腫性ポリープを顕著に減少させることができる。この試験の詳細は下記及びその全体において参照により本明細書中に組み込まれるMeyskensら、2008で詳細に論じる。

30

40

#### 【0087】

267名の患者が試験終了時の大腸内視鏡検査を完了した後、Data Safety

50

Monitoring Board (DSMB) によりこの試験は中止された (試験がその有効性エンドポイントに達したため)。DSMB は安全性及び有効性エンドポイントを全て監視した。実施例セクションでさらに詳細に論じるように、この試験には、多施設第 III 相結腸腺腫予防試験からの患者データの分析が含まれた。その全体において参照により本明細書中に組み込まれる (Meyers 等、2008) も参照のこと。

#### 【0088】

##### A. ODC1 遺伝子型分布

UC Irvine CRC Gene-Environment Study から確認された全部で 440 名の結腸直腸癌 (CRC) 症例を症例のみ分析において使用した。フォローアップ期間中央値は 11 年であった。270 例の (61%) 結腸癌症例、162 例の (37%) 直腸癌症例及び 8 例 (2%) の位置不明の CRC 症例があった。結腸及び直腸癌症例に対する臨床病理学的データを表 1 で示す。全 CRC 症例間の ODC + 316 遺伝子型分布は、53% GG、41% GA 及び 7% AA であった。CRC 例において ODC + 316 遺伝子型分布は、家族歴の有無にかかわらず同様であった。年齢 ( $P = 0.38$ )、性別 ( $P = 0.56$ )、家族歴 ( $P = 0.94$ )、結腸直腸内の部位 ( $P = 0.55$ )、組織学 ( $P = 0.46$ ) 又は腫瘍グレード ( $P = 0.73$ ) 別で ODC 遺伝子型分布において有意差はなかった。ODC 遺伝子型分布は、診断時のステージにより有意差はなかった：ステージ I (49% GG、42% GA、8% AA)、ステージ II (56% GG、38% GA、6% AA)、ステージ III (51% GG、43% GA、6% AA)、ステージ IV (59% GG、37% GA、4% AA) ( $P = 0.87$ )。ODC 遺伝子型分布は民族による有意差が明らかになった：白人 (382 例：53% GG、41% GA、6% AA、マイナー - A アレル頻度 = 26%)、アフリカ系アメリカ人 (7 例：71% GG、29% GA、0% AA、マイナー - A アレル頻度 = 15%)、ヒスパニック系 (21 例：57% GG、43% GA、0% AA、マイナー - A アレル頻度 = 21%) 及びアジア系 (27 例：33% GG、41% GA、26% AA、マイナー - A アレル頻度 = 46%) ( $P = 0.009$ )。しかし、各人種内で、ODC 遺伝子型分布はハーディー・ワインベルグ平衡になった (白人  $P = 0.36$ 、アフリカ系アメリカ人  $P = 0.66$ 、ヒスパニック系  $P = 0.21$ 、アジア人系  $P = 0.35$ )。

#### 【0089】

##### B. 腺腫再発

ODC1 遺伝子型分布は、126 GG (55%)、87 GA (38%) 及び 15 AA (7%) であった。ベースライン臨床特性から表 1 で示されるように差が明らかとなった。年齢、性別、人種、アスピリン使用、治療、ODC1 遺伝子型及び治療という予測因子を用いた回帰モデルにおいて、治療は、腺腫再発、組織ポリアミン反応及び聴器毒性の差異に關与する唯一の因子であった。腺腫再発に対するフルモデルにおいて ODC1 遺伝子型及び治療に対して統計学的に有意な相互作用が検出され ( $P = 0.021$ )、プラセボ患者間の腺腫再発パターンは、GG - 50%、GA - 35%、AA - 29% であり、一方、エフロルニチン/スリンダク患者では GG - 11%、GA - 14%、AA - 57% であった。

#### 【0090】

このモデルにおける ODC1 遺伝子型と治療との間で統計学的に有意な相互作用が検出された ( $P = 0.038$ )。ODC1 遺伝子型は完全回帰モデルにおいて組織プロレスシンレスポンス又はスペルミジン：スペルミン比レスポンスと有意な関連はなかった (データは示さず)。完全回帰モデルにおける治療に關連する腺腫再発に対する調整済み相対的リスク (RR) は、0.39 (95% CI 0.24 - 0.66) であった。心血管系又は消化管系有害事象に關して、治療と ODC1 遺伝子型群との間で有意な関連はなかった (表 3 及び 4)。

#### 【0091】

ここで、少なくとも 1 つの A - アレルを有するアスピリン投与 CRA 患者間で再発性腺腫のリスクが低下したことを示す以前の報告とは異なり、エフロルニチン及びスリンダク

の腺腫抑制効果は、メジャー G ホモ接合 O D C 1 遺伝子型を有する場合により大きいことが認められた (Martinez ら、2003; Barry ら、2006; Hubner ら、2008)。O D C 1 遺伝子型分布は以前のアスピリンに基づく臨床試験での報告と同様であり (Martinez ら、2003; Barry ら、2006; Hubner ら、2008)、以前の報告と一致して、A - アレルは、プラセボ群において、有意ではない、より低い再発性腺腫リスクと関連があった (Martinez ら、2003; Hubner ら、2008)。これらの結果から、O D C 1 A - アレルキャリアでは、G G 遺伝子型患者と比較して、エフロルニチン及びスリダグでの長期曝露に対する反応性の点が異なり、A - アレルキャリアは腺腫再発に関してベネフィットが少なく、特に A A ホモ接合型では聴器毒性を発生するリスクが高くなる可能性があることが明らかになる。

10

#### 【0092】

##### C. 生存解析

440 例の C R C 症例のうち、解析時に 138 例 (31%) が死亡していた。A A / A G 遺伝子型を有する例で死亡例が 74 例 (54%) であったことと比較して、G G 遺伝子型を有する症例で死亡例は 64 例 (46%) であった。死因は 138 例の死亡 C R C 症例のうち 102 例については入手可能であった。85 例 (83%) の C R C 症例は、C R C が死因であった。少なくとも 1 つの A - アレル (O D C G A / A A) を有する例 (10 年生存率 = 76%;  $P = 0.031$ ) と比較して、O D C G - アレルに対してホモ接合の C R C 症例全てにおいて統計学的に有意な C R C 特異的生存率の向上が認められた (10 年生存率 = 84%)。ステージ別の C R C 特異的生存率解析から、A J C C ステージ I (  $P = 0.055$  )、I I (  $P = 0.61$  ) 又は I V (  $P = 0.65$  ) C R C に対して、生存率の違いにおいて有意差が認められなかったことが明らかになった。しかし、ステージ I I I の C R C の症例の間で、O D C G G 遺伝子型は C R C 特異 10 年生存率の向上と関連しており、O D C G A / A A 遺伝子型の例では 60% であるのに対して 75% であった;  $P = 0.024$  (図 1)。結腸癌症例の間で、O D C G A / A A 例と比較して、O D C G G 遺伝子型を有する例に対して統計学的に有意な C R C 特異的生存率ベネフィットが認められ (10 年生存率 = 87% 対 79%;  $P = 0.029$ ) ; これは直腸癌症例では見られなかった (O D C G G 例の場合 10 年生存率 = 78%、一方で O D C G A / A A 例の場合 72%;  $P = 0.42$ ) 。

20

#### 【0093】

年齢 (歳)、性別、民族、C R C 家族歴、診断時 T N M ステージ、結腸内の腫瘍部位、組織学的サブタイプならびに手術、放射線療法及び化学療法による治療について調整した後の O D C 遺伝子型に基づく、全 C R C 症例間の C R C 特異的予測生存率は、次の通りであった: O D C G G ハザード比 (H R) = 1.00 (基準値)、O D C G A H R = 1.73 及び O D C A A 遺伝子型 H R = 1.73 ( $P$ -トレンド = 0.0283)。結腸症例のみの間で、C R C 特異的生存率解析から、上記の臨床的変数に対する調整後、O D C + 316 S N P が C R C 特異的生存率の独立予測因子であることが明らかになった。O D C G G 結腸癌症例と比較して、死亡の C R C 特異リスク (H R) は、O D C G A 遺伝子型の場合 2.31 (1.15 - 4.64) であり、O D C A A 遺伝子型の場合 3.73 (0.93 - 14.99) であった ( $P$ -トレンド = 0.006) (表 2)。これらの結腸癌症例の全生存期間解析は C R C 特異的生存率解析と一致した (表 2)。直腸癌症例間で、C R C 特異的生存率解析から、上述の臨床的変数に対して調整後に、O D C + 316 S N P が C R C 特異的生存率の独立予測因子ではないことが明らかになった。O D C G G 直腸癌症例と比較して (H R = 1.00、基準値)、C R C 特異的死亡リスク (H R) は、O D C G A ヘテロ接合体の場合 1.72 (0.83 - 3.57) であり、O D C A A ホモ接合体の場合 1.93 (0.56 - 6.67) であった ( $P$ -トレンド = 0.12)。

30

40

#### 【0094】

上述のように、O D C + 316 遺伝子型分布は民族間で異なっていた。偶然を除き、観察された死亡リスクは、O D C 遺伝子型に基づく相違を反映すると思われるが、しかし

50

スクは特定の民族グループに限定され得る。従って、白人結腸癌症例の間で多変量解析を行い、この単一民族内の遺伝子型特異的死亡リスクを評価した。234例の白人結腸癌症例中、CRC - 関連死が37例あった。多変量CRC特異的生存率解析から、上述の関連臨床変数に対して調整後、ODC + 316 SNPが、白人結腸癌症例においてCRC特異的生存率の独立予測因子であることが明らかになった。ODC GG遺伝子型の例と比較して(HR = 1.00、基準値)、CRC特異的死亡リスク(HR)は、ODC GA遺伝子型の場合は2.67(1.22 - 5.82)であり、ODC AA遺伝子型の場合は6.28(1.46 - 26.95)であった(P - トレンド = 0.0018)。

#### 【0095】

CRC症例における遺伝子型特異的生存率の差は結腸癌症例に限定され、ODC GG遺伝子型の症例と比較して(HR = 1.00、基準値)、調整済みのCRC - SSハザード比(HR)は、ODC GA症例の場合2.31(1.15 - 4.64)であり、ODC AA症例の場合3.73(0.93 - 14.99)であった(P - トレンド = 0.006)。結腸癌細胞において、2個のE - ボックスに隣接するODC + 316 SNPにより、ODCプロモーター活性が予測される。E - ボックス活性化因子c - MYC及び抑制因子MAD1及びMAD4は、培養細胞中で、メジャーG - アレルと比較してマイナーA - に選択的に結合する。

#### 【0096】

11年間のフォローアップ期間がある結腸直腸癌症例でのこの母集団ベース分析に基づいて、結腸癌症例において、+ 316 ODC SNPが結腸直腸癌特異的生存率に関連することが認められた。年齢、性別、民族、腫瘍ステージ、CRC家族歴、腫瘍部位、組織学ならびに手術、放射線療法及び化学療法による治療に対する調整後、結腸癌症例において、ODC Aアレルが付加される度に(即ちODC GGからGA、そしてAAへ)、CRC特異的死亡リスクの統計学的に有意な上昇が認められた(P - トレンド = 0.006)。

#### 【0097】

D . 転写因子のアレル特異的制御

結腸癌上皮細胞において、G - 、アレルと比較してA - を含有するプロモーターエレメントへのE - ボックス転写因子の結合が多いことにより証明されるように、ODC + 316 SNPが機能的に意義があることが示されている。活性化因子c - MYC及び抑制因子MAD1の両者とも、G - アレルよりもA - を含有するレポーターエレメントにおけるプロモーター活性に対してより大きな影響を示す。これらの結果から、E - ボックス転写因子によるODCのアレル特異的制御が示唆される。ODCタンパク質酵素活性はODC + 316 SNP遺伝子型により明らかな影響は受けず、ODC + 316 SNP遺伝子型はODC転写に影響を及ぼすと発明者らは考える。

#### 【0098】

結腸細胞において、正常結腸粘膜で発現される遺伝子である野生型APCの条件付き発現が、c - MYCを抑制し、MAD1発現を向上させることが示されている(Fultz及びGerner、2002)。さらに、+ 316 SNP依存性に野生型APCがODCプロモーター活性を制御することができることが報告されている(Martinezら、2003)。野生型APCは、FAPに罹患していない個体の見かけ上正常な結腸粘膜において発現され、一方で孤発性の結腸腺腫の大部分は、APCに突然変異又は欠失があるという所見が認められる(Iwamotoら、2000)。MYCは、正常腸粘膜では発現レベルが低い、APC<sup>Min/+</sup>マウスの腸腺腫では上昇している。腸上皮MYC発現の条件付きノックアウトにより、APC<sup>Min/+</sup>マウスにおいて腸腫瘍形成が抑制される(Ignatenkoら、2006)。上述のように、発明者らのグループによる先行研究(Martinezら、2003)及びその他(Hubnerら、2008)から、臨床予防試験において結腸ポリープ再発に対して、特にアスピリン使用者において、ODC A - アレルに関する予防的役割が明らかになった。しかし、本明細書中で提示される母集団ベース研究において、ODC A - アレルは低生存率と関連があった。この明ら

10

20

30

40

50

かな矛盾は、本明細書中で示される結果により説明され得、このことから、E - ボックス活性化因子及び抑制因子の両者とも選択的にODC A - アレルに結合することが示される。E - ボックス抑制因子を発現する正常上皮から腫瘍上皮への遷移はODC A - アレルを有する個体において遅延し得る。この効果は、ポリアミン合成抑制の結果によるものであり得る。しかし、形質転換上皮がE - ボックス活性化因子(c - MYCなど)を発現し始めたら、ODC A 遺伝子型を有する個体において癌進行が起こる可能性が高くなり得る。結腸癌特異的死亡リスクに対する結果は、前立腺癌リスクが、遺伝子環境相互作用の結果として特定の個人の間でODC A - アレルと関連があり得ることを示す結果と一致する(O'Brienら、2004; Visvanathanら、2004)。このような結腸癌進行は、前立腺癌に対して既に明らかにされているように、ポリアミン合成の促進によるものであり得る(Simoneauら、2008)。

10

#### 【0099】

ODC SNPなどの因子が癌腫形成に対して促進及び抑制効果両方を有し得るというこの知見は特別なものではない。例えば、形質転換増殖因子-(TGF-)は、癌腫形成及び癌進行において多様な役割を有する(Derynckら、2001; Pardali及びMoustakas、2007; Roberts及びWakefield、2003)。形質転換された細胞におけるTGF-は、細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導する。また、これはヒト腫瘍全てによって過剰発現され、末期癌の進行、具体的には腫瘍浸潤及び転移に関連する。ヒト結腸直腸腫瘍におけるODC活性を報告する1つの研究から、高レベルのODC発現が生存率向上と顕著に関連することが明らかになった(Matsubaraら、1995)。このことから、ODC過剰発現がヒト結腸直腸腺腫の形成を促進するにもかかわらず、既存病変において、ODC過剰発現により増殖が促進され、抗増殖治療に対する反応性向上と関連する可能性があることが示唆される。しかし、その研究には、ODC遺伝子型による層別化は含まれておらず、これらの効果がODC遺伝子型に独立であるか否かは分からない。

20

#### 【0100】

CRC特異的死亡率とのODC + 316 SNPの関連が認められるのは、結腸癌の症例に限定されていた。結腸癌症例の間で、白人については特に強い効果が認められた。他の報告と同様に、ODC + 316 SNPアレル頻度は民族によって大きく異なる(O'Brienら、2004)。生存率解析が白人(即ちこのような解析に対して十分な検出力がある唯一の民族グループ)のみに限定された場合、ODC + 316 SNPの関連は有意であり、コホート全体に対して認められた推定値よりも大きかった。

30

#### 【0101】

疫学的研究は、併発状態におけるデータ不足、一般状態及び使用される特定の化学療法レジメンを含め、他の母集団ベース分析と同じ制限を有する。さらに、家族性結腸直腸癌のUC Irvine Gene - Environment Studyの参加者から得られた組織生検試料はパラフィン包埋検体であり、従って高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による組織ポリアミン定量の正確な評価には使用できない。中央値16ヶ月という、CRC診断から試験登録までの遅延があったため、CRC生存者のうち比較的健康な群が優先されがちであるという選択バイアスの可能性もある。本発明において考慮されなかったポリアミン代謝に影響を及ぼす他の因子により発明者らの所見が説明され得る。例えば、アスピリンはポリアミンアセチル化及び輸出を活性化し、細胞及び組織ポリアミン含量を減少させるためにODC A - アレルとともに作用する(Gernerら、2004; Martinezら、2003; Babbabarら、2006)。

40

#### 【0102】

まとめると、結腸癌症例でのCRC特異的死亡率におけるODC + 316 SNPの臨床的帰結が認められた。さらに、ヒト結腸癌細胞におけるこの遺伝子のc - MYC - 及びMAD1 - 依存性転写におけるODC + 316 SNPの機能的意義がより詳細に理解される。総合すると、これらの実験的及び疫学的知見から、結腸腺腫への進行において以前報告されていた役割とは異なる、結腸癌の進行におけるODC + 316 SNPの役割が示唆さ

50

れる。これらの知見は、結腸癌進行リスクを評価するために使用することができ、患者特異的薬理遺伝学的管理、サーベイランスモニタリングを指導し、二次及び三次結腸癌予防に対する新規の標的となるアプローチを知らせるために使用し得る。

#### 【0103】

##### E. 要約

腺腫再発に対する完全モデルにおいてODC1遺伝子型及び治療に対して統計学的に有意な相互作用が検出され ( $P = 0.021$ )、プラセボ患者間の腺腫再発パターンはGG - 50%、GA - 35%、AA - 29%であり、それ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%であった。ここで、エフロルニチン及びスリンダクの腺腫抑制効果は、少なくとも1つのA - アレルを有するアスピリン投与CRA患者における再発性腺腫リスク低下を示す以前の報告と対照的に、メジャーGホモ接合ODC1遺伝子型の患者でより大きかった (Martinezら、2003; Barryら、2006; Hubnerら、2008)。これらの結果から、ODC1A - アレルキャリアが、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での長期曝露に対する反応性の点で異なり、A - アレルキャリアは腺腫再発に関してベネフィットが少なく、特にAAホモ接合型では聴器毒性を発生するリスクが高くなる可能性があることが明らかになる。

#### 【0104】

##### XI. DFMO及びスリンダクによる治療と食事性ポリアミン摂取との間の相互作用

下記実施例セクションで詳細に記載する研究において、発明者らは、結腸直腸腺腫予防臨床試験で、再発性腺腫のリスクにおいてDFMO + スリンダクによる治療と食事性ポリアミン摂取との間の有意な相互作用を認めた。ポリアミン摂取量が下位4分の3に相当する患者では81%のリスク低下が認められるのに対して、食事性ポリアミン摂取量が上位4分の1に相当する患者は、DFMO + スリンダクでの治療後、異時性腺腫リスク低下が示されなかった。

#### 【0105】

この実験において、ベースライン時で、最大食事性ポリアミン摂取群の患者は組織ポリアミンレベルがより高く、大きな腺腫 (43.6%対26.4%、 $P = 0.016$ ) 及び進行性腺腫 (52.7%対35.9%、 $P = 0.028$ ) の割合がより大きかった (表2)。さらに、最大食事性ポリアミン摂取群の患者のより多くの割合が高悪性度腺腫を有したが (32.7%対20.4%、 $P = 0.060$ )、この差は有意ではなかった。これらの結果は全般的に、食事性ポリアミン摂取増加が腸腺腫異形成のグレード上昇と顕著に関連しているというマウスモデル研究の結果を反映する。Ignatenko NA, Besselsen DG, Roy UKら: Dietarny putrescine reduces the intestinal anticarcinogenic activity of sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. Nutr Cancer 56: 172 - 81, 2006。別の動物実験において、食事を介したビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) の投与によってポリアミン吸収が低下した結果、細胞増殖速度ならびにODC活性を抑制することにより、結腸腫瘍発生率、腫瘍多発性が顕著に抑制され、腫瘍サイズが縮小することが認められた。Singh J, Rivenston A, Tomita Mら: Bifidobacterium longum, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. Carcinogenesis 18: 833 - 41, 1997。

#### 【0106】

これらの結果から、食事性ポリアミン摂取量が上位4分の1に相当する患者においてベースライン組織スperlミン及びスperlミジンレベルが上昇した。これらの知見は、全般的

に、食事性のプトレッシン補充がAPC<sup>M<sup>in</sup>/+</sup>マウスにおける腸組織プトレッシンレベルを上昇させたというIgnatenkoにより行われた実験的研究と一致する。Ignatenko NA, Besselsen DG, Roy UKら: Dietary putrescine reduces the intestinal anticarcinogenic activity of sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Nutr Cancer* 56:172-81, 2006。しかし、本分析において、組織プトレッシンレベルは、ベースラインの食事性ポリアミン摂取とは関連がなかった。これは、身体組織に保持される割合が食事性スペルミジンの場合は40%であるのに対して、食事性プトレッシンのうち身体組織に保持されるのは僅か10%であるからであり得る。Hughes EL, Grant G, Pusztai Aら: Uptake and inter-organ distribution of dietary polyamines in the rat. *Biochem Soc Trans* 26:S369, 1998。外部から得られたポリアミンは、細胞外間隙から細胞に輸送され、細胞内に入ると、外因性プトレッシンはスペルミジン及びスペルミンへと迅速に変換される(これらは相互交換可能)。Milovic V, Turhanowa L, Fares FAら: S-adenosylmethionine decarboxylase activity and utilization of exogenous putrescine are enhanced in colon cancer cells stimulated to grow by EGF. *Z Gastroenterol* 36:947-54, 1998。

#### 【0107】

試験の目的の1つは、異時性腺腫リスク低下における食事性ポリアミン摂取及びDFMO+スリンダクによる治療の相互作用を評価することであり、統計学的に有意な相互作用が認められた( $P=0.01$ )。ここで、発明者らは、DFMO+スリンダクによる低食事性ポリアミン群における81%の異時性腺腫リスク低下を報告したが、これは70%腺腫リスク低下が認められた親試験と比較して実質的なリスク低下である。これは、食事性ポリアミン摂取の制限が結腸直腸腫瘍の予防に有用である可能性があることを強調する。発明者らはまた、低食事性ポリアミン群における進行性腺腫の94%リスク低下にも注目したが、これは、親実験で報告されたものと同様であった。しかし最大食事性ポリアミン群において、DFMO+スリンダク(対プラセボ)でのベネフィットは認められなかった[RR、1.04; 95%CI、0.32-3.36]。マウスの実験的研究において、NSAIDによる、ODCの阻害、スペルミジン/スペルミン<sup>N<sup>1</sup></sup>-アセチルトランスフェラーゼの誘導及びポリアミン輸送の誘導は、細胞内ポリアミン含量及びアポトーシスの減少に寄与した。細胞へのスペルミジン添加によってアポトーシスが阻止され、細胞数が保持され、このことから、発明者らの研究で認められたように、外因性ポリアミンがNSAIDの有効性を反転させ得ることが示唆される。Ignatenko NA, Besselsen DG, Roy UKら: Dietary putrescine reduces the intestinal anticarcinogenic activity of sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Nutr Cancer* 56:172-81, 2006; Hughes A, Smith NI, Wallace HM: Polyamines reverse non-steroidal anti-inflammatory drug-induced toxicity in human colorectal cancer cells. *Biochem J* 374:481-8, 2003。これらのデータは、外因性ポリアミンがポリアミンホメオスタシスを支配し、DFMO及びスリンダクの有効性に影響を与えることを示すマウス実験による結果を補強する。低食事性ポリアミン群(即ち試験母集団の下位4分の3)において、プラセボと比較して、DFMO+スリンダクによって腺腫再発リスクが低下することから、ODC阻害がこの群での結腸癌の化学的予防における有望なアプローチと



して確認される。

#### 【0108】

ポリアミン制御の他のソースが考慮されるべきである。ODC1における遺伝的多型は、結腸直腸癌生存率と関与することが示されており、DFMO+スリンダクによる治療後の腺腫再発リスクに影響を及ぼし得る。Zell JA, Ziogas A, Ignatenko Nら: Associations of a polymorphism in the ornithine decarboxylase gene with colorectal cancer survival. Clin Cancer Res 15:6208-16, 2009; Zell JA, McLaren CE, Chen W-Pら: Ornithine decarboxylase (Odc)-1 gene polymorphism effects on baseline tissue polyamine levels and adenoma recurrence in a randomized phase III adenoma prevention trial of DFMO+sulindac versus placebo. J Clin Oncol 26S: Abstract 1502, 2008。従ってODC1遺伝子型と食事性ポリアミン摂取との間の相互作用は、ポリアミンホメオスタシスに影響を与え得る。しかし、発明者らは、ODC遺伝子型により本分析を層別化する十分な分析力がない。

#### 【0109】

ここで、発明者らは、ベースライン時の食事性ポリアミン摂取と組織ポリアミンレベルとの間の関係を明らかにすることによって、以前に確立されたポリアミンデータベースを検証する。ナッツ類、ある種のチーズ及び肉を含むいくつかの食品においてポリアミン含量が高い。肉の消費は、ポリアミン消費に取って代わるものであるが、食事性ポリアミンの相当量がオレンジジュース、トウモロコシ及びエンドウなどの様々な食品からも得られる。総ポリアミン摂取及び1日の総アルギニンに対して観察された関連性 ( $r_s = 0.64$ ) は、動物由来タンパク質摂取に対して認められたものよりも大きかった ( $r_s = 0.49$ )。このアルギニンと食事性ポリアミンとの間の関係は、食事性アルギニンにより誘発される腸腫瘍形成をDFMO及びNSAIDなどのポリアミン-阻害物質により抑制することができることを示す、APC<sup>Min/+</sup>マウスにおける以前の研究を裏付ける。Zell JA, Ignatenko NA, Yerushalmi HFら: Risk and risk reduction involving arginine intake and meat consumption in colorectal tumorigenesis and survival. Int J Cancer 120:459-68, 2007。

#### 【0110】

この研究にはいくつかの制限がある。主要な制限は、再発リスクの分析において被験者数が比較的少数 ( $n = 188$ ) であることである。このように少数であったため、この研究は、特に最大食事性ポリアミン群において詳細なサブセット分析を行うのに十分な分析力がなかった。また、認められるべきこととして、この試験計画が、ベースラインの食事性ポリアミン摂取に基づく層別化を含まなかった。特に発明者らの分析がベースラインの食事に関する質問表に基づき、本研究中に様々な時間間隔におけるものでないことを考えれば、人々の食生活が時間とともに変化し得、これが発明者らの結果に影響し得ることが認識される。しかし、中年から高齢層の患者は一般に食事パターンが安定しており一定であるので、生命にかかわる新しい医学的状態がない場合、3年間の試験中に中年から高齢層では大きな食事の変化の可能性が低いことが推定されることに着目されたい。従って、この分析における単回の最初のFFQからのデータを使用することは妥当である。自己報告に基づく食事評価法は全て、正確性に限界があり、精密な摂取測定を与えるというよりも、(この研究において分析されるように) 精々高摂取と低摂取を区別することができる程度である。患者のほぼ50%が、ポリアミンの体内プールを調整し得るアスピリンを服用していたが、最終的な推定をアスピリン使用に対して調整し、発明者らは、ロジスティ

ック回帰モデルにおいてベースラインの食事性ポリアミン摂取とアスピリンとの間で有意な相互作用を認めなかった。

#### 【0111】

親研究において、3年間の治療期間にわたるDFMO（ポリアミン合成の選択的阻害剤）及びスリダク（NSAID）の併用の前向きランダム化プラセボ比較臨床試験の結果、プラセボと比較して、全異時性腺腫の再発が70%減少し、進行性及び多重腺腫の再発が>90%減少した。この食事性ポリアミン分析で与えられる知見から、低量から通常量の食事性ポリアミン摂取を報告している患者間で、異時性腺腫のリスクが81%低下し、進行性腺腫が94%減少したことが明らかとなり、このことから、食事性ポリアミンが腺腫予防における重要な因子であり得ることが示唆される。ポリアミン阻害物質による化学的予防に対する補助的戦略として外因性ポリアミンの調節を使用し得、例えばポリアミン-阻害物質を用いた二次及び三次結腸直腸癌予防試験が展開される。

10

#### 【0112】

##### XII. 遺伝多型分析

実施例セクションに記載される具体的な方法を含む、下記で提供される方法を用いて、患者のODC1プロモーター遺伝子の+316位置での遺伝子型を決定することができる。これらの方法は、当業者により適用されるように分子生物学の原理及び技術を用いてさらに改変し、最適化し得る。このような原理及び技術は、例えば参照により本明細書中に組み込まれるSmallら、(2002)で教示される。一塩基多型(SNP)の同定のために使用される一般的方法を下記で与える。Kwok及びChen(2003)及びKwok(2001)の参考文献は、これらの方法のいくつかの概要を提供し、これらは両者とも参照により具体的に組み込まれる。

20

#### 【0113】

ODC1に関連するSNPの特徴は、これらの方法又はその適切な改法の何れかの使用であり得る。このような方法には、部位の直接又は間接的配列決定、その部位の個々のアレルが制限部位を生成させるか又は破壊する制限酵素の使用、アレル特異的ハイブリッド形成プローブの使用、遺伝多型の異なるアレルによりコードされるタンパク質に特異的な抗体の使用又は何らかの他の生化学的解釈が含まれる。

#### 【0114】

##### A. DNA配列決定

一般に使用される、遺伝多型の特徴評価の方法は、遺伝多型に隣接し、遺伝多型を含む遺伝子座の直接的DNA配列決定である。「サンガー法」としても知られる「ジデオキシ連鎖停止法」(Sangerら、1975)又は「マクサムギルバート法」としても知られる「化学分解法」(Maxamら、1977)の何れかを用いてこのような分析を遂行することができる。望ましい遺伝子の回収を容易にするために、ポリメラーゼ連鎖反応などのゲノム配列特異的増幅技術と組み合わせて配列決定を使用し得る(Mullisら、1986; 欧州特許出願第50,424号; 欧州特許出願第84,796号、欧州特許出願第258,017号、欧州特許出願第237,362号; 欧州特許出願第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、これらは全て参照により本明細書中に組み込まれる)。

30

40

#### 【0115】

##### B. エキソヌクレアーゼ抵抗性

多型部位に存在するヌクレオチドの正体を調べるために使用することができる他の方法は、特別なエキソヌクレアーゼ抵抗性ヌクレオチド誘導体を利用する(米国特許第4,656,127号)。多型部位のすぐ3'側にあるアレル配列に相補的なプライマーは、研究対象下のDNAとハイブリッド形成する。DNAにおける多型部位が、存在する特定のエキソヌクレオチド抵抗性ヌクレオチド誘導体と相補的であるヌクレオチドを含有する場合、誘導体はハイブリッド形成されるプライマーの末端にポリメラーゼにより組み込まれる。このような組み込みにより、プライマーがエキソヌクレアーゼ切断に対して抵抗性になり、それによってその検出が可能になる。エキソヌクレオチド抵抗性誘導体の正体が分

50

かっているので、DNAの多型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。

#### 【0116】

##### C. ミクロシーケンシング

DNAにおける多型部位をアッセイするためのいくつかの他のプライマー誘導性ヌクレオチド組み込み手段が記載されている (Komherら、1989; Sokolov, 1990; Syvanen 1990; Kuppuswamyら、1991; Prezantら、1992; Uguzzoliら、1992; Nyrenら、1993)。これらの方法は、多型部位において塩基と塩基とを区別するための標識付加デオキシヌクレオチドの組み込みによる。シグナルは組み込まれるデオキシヌクレオチド数に比例するので、同じヌクレオチドの分析中に生じる多型の結果、その分析の長さに比例するシグナルが得られる (Syvanenら、1990)。

10

#### 【0117】

##### D. 溶液中での伸長

仏国特許第2,650,840号及びPCT出願第WO91/02087号は、多型部位のヌクレオチドの正体を決定するための溶液ベースの方法を考察する。これらの方法に従い、多型部位のすぐ3'側にあるアレル配列に相補的なプライマーを使用する。その部位のヌクレオチドの正体は、多型部位のヌクレオチドと相補的である場合、プライマーの末端に組み込まれる標識化ジデオキシヌクレオチド誘導体を使用して決定される。

20

#### 【0118】

##### E. ジェネティックビット (Genetic Bit) 分析又は固相伸長

PCT出願第WO92/15712号は、標識化ターミネーター及び、多型部位の3'側の配列に相補的なプライマーの混合物を使用する方法を記載する。組み込まれる標識化ターミネーターは、評価している標的分子の多型部位に存在するヌクレオチドに相補的であり、従って同定される。この方法では、このプライマー又は標的分子は固相に固定される。

#### 【0119】

##### F. オリゴヌクレオチドライゲーショナッセイ (OLA)

これは、異なる方法論を利用する別の固相法である (Landegrenら、1988)。標的DNAの1本鎖の隣接配列とハイブリッド形成可能な2つのオリゴヌクレオチドを使用する。これらのオリゴヌクレオチドのうち一方が生合成され、その一方で他方が検出可能に標識される。的確な相補配列が標的分子中に見つけられる場合、オリゴヌクレオチドが、それらの末端が隣接し、ライゲーシオン基質を形成するように、ハイブリッド形成する。ライゲーシオンにより、アビジンを使用することによって標識化オリゴヌクレオチドの回収が可能となる。PCRと組み合わせた、この方法に基づく他の核酸検出アッセイも記載されている (Nickersonら、1990)。この方法では、標的DNAの指数関数的増幅を達成するためにPCRを使用し、次いでOLAを用いてこの標的DNAを検出する。

30

#### 【0120】

G. リガーゼ/ポリメラーゼが介在するジェネティックビット (Genetic Bit) 分析

40

米国特許第5,952,174号は、標的分子の隣接配列に対してハイブリッド形成可能な2つのプライマーも含む方法を記載する。標的が固定された固体支持体上でハイブリッド形成生成物が形成される。ここで、1ヌクレオチド分のスペースによりプライマーが互いに分離されるようにハイブリッド形成が起こる。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三リン酸を含有するヌクレオシド三リン酸混合物の存在下でこのハイブリッド形成生成物をインキュベートすると、隣接するハイブリッド形成オリゴヌクレオチドの何れかのペアのライゲーシオンが可能になる。リガーゼを添加すると、その結果、シグナル生成に必要な2つの事象である伸長及びライゲーシオンが起こる。これにより、伸長又は連結の何れかのみを使用する方法よりも特異性が高く、「ノイズ

50

」が少なくなり、そしてポリメラーゼに基づくアッセイとは異なり、この方法では、シグナルを固相に連結させるための第二のハイブリッド形成及びライゲーション段階と組み合わせることによって、ポリメラーゼ段階の特異性が向上している。

#### 【0121】

H. 侵出開裂反応 (Invasive Cleavage Reaction)

特定の遺伝多型について細胞DNAを評価するために、侵出開裂反応を使用することができる。INVADER (登録商標) と呼ばれる技術はこのような反応を使用する (例えば、参照により組み込まれる、de Arrudaら、2002; Stevensら、2003)。一般に、3種類の核酸分子がある: 1) 標的部位上流のオリゴヌクレオチド (「上流オリゴ」)、2) 標的部位を包含するプローブオリゴヌクレオチド (「プローブ」) 及び3) 標的部位のある1本鎖DNA (「標的」)。これらの上流オリゴ及びプローブは重複しないが、連続配列を含有する。プローブは、フルオレセインなどの供与体フルオロフォア及びダブシルなどのアクセプター色素を含有する。上流オリゴの3'末端のヌクレオチドは、プローブ-標的2量体の最初の塩基対と重複 (「侵出」) する。次いで、構造特異的5'ヌクレアーゼによりプローブが切断され、フルオロフォア/クエンチャーペアの分離が起こり、検出できる蛍光量が増加する。Luら、2004参照。

10

#### 【0122】

一部の例では、固体表面上で又はアレイ方式でアッセイが行われる。

#### 【0123】

I. SNPを検出するための他の方法

20

遺伝多型検出及び同定のためのいくつかの他の具体的方法を下記で与えるが、これらは、本発明におけるODC1遺伝子の多型を同定することと組み合わせて、そのまま又は適切な改変を行って使用され得る。参照により本明細書中に組み込まれるNCBIのSNPウェブサイト、World Wide Web at [ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP) 上にもいくつかの他の方法が記載されている。

#### 【0124】

特定の実施態様において、集団において任意の遺伝子座で拡張したハプロタイプを決定し得、これによって正確にどのSNPが冗長であるか及びどれが関連研究に必須であるかを同定できるようになる。後者は「ハプロタイプタグSNP (htSNP)」と呼ばれ、連鎖不平衡の遺伝子又は領域のハプロタイプを捕捉するマーカーである。それぞれ、例示的方法として、参照により本明細書中に組み込まれるJohnsonら (2001) 及びKe及びCardon (2003) を参照のこと。

30

#### 【0125】

VDA - アッセイは、Takara LA Taq 試薬及び他の標準的反応条件を用いたロングPCR法によるゲノムセグメントのPCR増幅を利用する。長い増幅によって、約2,000から12,000bpの大きさのDNAが増幅され得る。変異体検出用アレイ (VDA) と産物とのハイブリッド形成は、Affymetrix High Throughput Screening Centerによって行い、コンピュータソフトウェアで分析することができる。

#### 【0126】

40

チップアッセイと呼ばれる方法は、標準的又はロングPCRプロトコールによるゲノムセグメントのPCR増幅を使用する。ハイブリッド形成産物は、VDA (参照により本明細書中に組み込まれる、Halushkaら (1999)) により分析される。SNPは一般に、ハイブリッド形成パターンのコンピュータ分析に基づき、「確実」又は「可能性が高い」として分類される。ヌクレオチド配列決定などの代替的検出法との比較により、「確実」なSNPは100%確証され、「可能性が高い」SNPの場合、この方法によって確証されるのは73%である。

#### 【0127】

他の方法は、単に、関連制限酵素での消化後、PCR増幅を含む。さらに他のものは、既知のゲノム領域からの精製PCR産物の配列決定を含む。

50

## 【0128】

また別の方法において、個々のエクソン又は大きなエクソンの重複断片をPCR増幅する。プライマーは公開又はデータベース配列から設計し、次の条件を用いてゲノムDNAのPCR増幅を行う：200 ng DNAテンプレート、プライマー各0.5 μM、dCTP、dATP、dTTP及びdGTP各80 μM、5%ホルムアミド、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、Taqポリメラーゼ0.5 U及びTaq緩衝液0.1体積。サーマルサイクリングを行い、様々な条件下、例えば15%尿素入りで5%グリセロールを含むか又は含まない5又は10%ポリアクリルアミドゲルでのPCR-1本鎖高次構造多型(PCR-SSCP)分析によって、得られたPCR産物を分析する。電気泳動を一晩行う。移動変化を示すPCR産物を再増幅し、ヌクレオチド変異を同定するために配列決定する。

10

## 【0129】

CGAP-GAI(DEMIGLACE)と呼ばれる方法において、配列及びアラインメントデータ(PHRAP.acceファイルより)、配列ベースコールに対する品質スコア(PHRED品質ファイルより)、距離情報(PHYLIP dnadist及びneighbourプログラムより)及びベースコールデータ(PHRED'-d'スイッチより)をメモリに加える。配列をアラインし、得られたアセンブリの各垂直チャック(「スライス」)を不一致に対して調べる。このようなスライスはどれもSNP候補と考えられる(DEMIGLACE)。DEMIGLACEでは、真の多型に当てはまる可能性が少ないスライスを排除するために多くのフィルターが使用される。これらには、(i)隣接配列品質スコアが40%以上低下する場合、所定スライス中の配列をSNPの検討から除外する；(ii)ピーク幅がそのヌクレオチドタイプに対する全てのベースコールの15パーセント以下であるコールを除外する；(iii)コンセンサスとの不一致を多数有する配列領域を不適格とし、SNP計算に加えない；(iv)コールされるピーク中でピーク面積の25%以上を占める代替コールがある何れのベースコールも検討から除外する；(v)ある1つの読み取り方向でのみ起こる変動を除外する、フィルターが含まれる。PHRED品質スコアをスライス中の各ヌクレオチドに対して誤識別値に変換する。標準ベイズ法を使用して、ある一定の位置でヌクレオチド異質性の証拠がある事後確率を計算する。

20

## 【0130】

CU-RDF(RESEQ)と呼ばれる方法において、各SNPに対する特異的プライマーを用いて、血液から単離されるDNAからPCR増幅を行い、使用されなかったプライマー及び遊離ヌクレオチドを除去するための典型的なクリーンアッププロトコルの後、同じ又はネステッドプライマーを用いて直接配列決定を行う。

30

## 【0131】

DEBNICKと呼ばれる方法において(方法-B)、クラスター化EST配列の比較分析を行い、蛍光を用いたDNA配列決定により確認する。DEBNICKと呼ばれる関連法(方法-C)において、ミスマッチ部位でphredクオリティーが>20であり、SNPの5'-FLANK及び3'側の5塩基にわたり平均phredクオリティーが20で、SNPの5'及び3'側の5塩基でミスマッチがなく、各アレルの出現が少なくとも2回であるクラスター化EST配列の比較分析を行い、トレースを調べることで確認する。

40

## 【0132】

ERO(RESEQ)により同定される方法において、電子公開されているSTSに対して新しいプライマーセットを設計し、10種類の様々なマウス系統からDNAを増幅させるために使用する。次に、各系統からの増幅産物をゲル精製し、<sup>33</sup>P-標識ターミネーターを用いた標準的なジデオキシ、サイクル配列決定技術を用いて配列決定する。次いでddATPで停止した反応を全て、配列決定ゲルの隣接レーンに載せ、続いてddGTP反応物全てを同様に載せる。放射線写真を目視で走査することによりSNPを同定する。

## 【0133】

50

ERO (RESEQ-HT) として認識される別の方法において、電子公開されているマウスDNA配列に対して新しいプライマーセットを設計し、10種類の様々なマウス系統からDNAを増幅するために使用する。エキソヌクレアーゼI及びエピアルカリホスファターゼで処理することによって、各系統からの増幅産物を配列決定用に調製する。ABI Prism Big Dye Terminator Ready Reactionキット (Perkin-Elmer) を用いて配列決定を行い、配列試料を3700 DNA Analyzer (96キャピラリーシーケンサー) にかける。

【0134】

FGU-CBT (SCA2-SNP) は、プライマーSCA2-FP3及びSCA2-RP3を用いて、SNP含有領域をPCR増幅した方法である。5mM Tris、25mM KCl、0.75mM MgCl<sub>2</sub>、0.05%ゼラチン、プライマー各20pmol及びTaq DNAポリメラーゼ0.5Uの最終濃度を含有する50mLの反応体積でおよそ100ngのゲノムDNAを増幅させる。試料を変性させ、アニーリングさせ、伸長させて、例えばQIAquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いてアガロースゲルから切り出されたバンドからPCR産物を精製し、PCRプライマーを用いてABI Prism 377自動DNAシーケンサー上でダイターミネーター化学法を用いて配列決定する。

【0135】

JBLACK (SEQ/RESTRICT) として認識される方法において、ゲノムDNAを用いて2種類の独立したPCR反応を行う。第一の反応由来の産物を配列決定により分析し、これによりユニークなFspI制限部位が示される。FspIで消化することにより第二のPCR反応産物において突然変異を確認する。

【0136】

KWOK (1) として記載される方法において、ダイターミネーター化学法を用いたPCR産物の直接DNA配列決定による、無作為に選択した4個体の高品質ゲノム配列データを比較することによって、SNPを同定する (Kwokら、1996参照)。KWOK (2) として認識される関連法において、バクテリア人工染色体 (BAC) 又はPIベースの人工染色体 (PAC) などの重複する大きなインサートクローン由来の高品質ゲノム配列データを比較することによって、SNPを同定する。次に、このSNPを含有するSTSを構築し、プールDNA配列決定により、様々な集団におけるSNPの存在を確認する (Taillon-Millerら、1998参照)。KWOK (3) と呼ばれる別の同様の方法において、重複する大きなインサートクローンBAC又はPACからの高品質のゲノム配列データを比較することによってSNPを同定する。このアプローチにより見出されるSNPは、2つのドナー染色体間のDNA配列変動に相当するが、一般集団におけるアレル頻度が決定されたことはない。方法KWOK (5) において、ダイターミネーター化学法でのPCR産物の直接DNA配列決定によるホモ接合DNA試料及び1以上のプールDNA試料の高品質ゲノム配列データを比較することによってSNPを同定する。使用するSTSは、一般利用可能なデータベースで見出される配列データから作製される。具体的に、全ての遺伝子座でホモ接合であることが示されている全胎状奇胎 (CHM) 及び80名のCEPH親からのDNA試料に対するPCRによりこれらのSTSが増幅される (Kwokら、1994参照)。

【0137】

別のこのような方法であるKWOK (Overlap Snp Detection With Poly Bayes) において、ラージインサートヒトゲノムクローン配列の重複領域の自動コンピュータ分析によりSNPを発見する。データ取得のために、大規模配列決定センターから直接クローン配列を得る。これが必要であるのは、ベースクオリティー配列がGenBankに存在しない/GenBankから入手不可能なためである。生データ処理には、整合性に対する、クローン配列及び付随するベースクオリティー情報の分析が含まれる。関連ベースクオリティー配列のない終了した (「ベースパーフェクト (base perfect)」、エラー率10,000bp中1未満) 配列に一定のベースクオ

10

20

30

40

50

リティー値40を割り当てる(エラー率10,000bp中1個)。ベースクオリティー値内のドラフト配列を除外する。処理した配列をローカルデータベースに入力する。マスクされる既知のヒトリピート配列がある各配列も保存する。リピートマスキングは、プログラム「MASKERAID」により行われる。重複検出:プログラム「WUBLAST」で推定重複を検出する。その後、偽の重複検出結果、即ち、真の重複ではなく、配列重複ゆえに生じるクローン配列ペア間の類似性を除外するために、いくつかのフィルタリング段階を行う。重複の全長、全体的類似度(パーセント)、ベースクオリティー値が高いヌクレオチド間で異なる配列数「ハイクオリティーミスマッチ」。結果は、Washington University Genome Sequencing Centerでのゲノムクローンの制限断片マッピングの結果、重複に関する完了者の報告及びNCBIでの配列コンティグ構築の取り組みの結果とも比較する。SNP検出:「POLYBAYES」SNP検出ソフトウェアを用いて候補となるSNP部位に対してクローン配列の重複ペアを分析する。配列決定エラーに対立するものとして、真の配列変動を示す可能性について、配列ペア間の配列の相違をスコア化する。この過程には、両配列に対してベースクオリティー値が存在する必要がある。高スコア候補を抽出する。検索は置換型の一塩基変動に対して制限される。POLYBAYESソフトウェアにより候補SNPの信頼スコアを計算する。

#### 【0138】

KWOKにより識別される方法(TaqManアッセイ)において、90例のランダム個体に対して遺伝子型を決定するためにTaqManアッセイを使用する。KYUGEN(Q1)として識別される方法において、指定集団のDNA試料をプールし、PLACE-SSCPにより分析する。プール分析における各アレルのピークの高さをヘテロ接合体におけるものにより補正し、続いてアレル頻度の計算に対して使用する。10%より高いアレル頻度は、この方法によって高い信頼性をもって定量される。アレル頻度=0(ゼロ)とは、個体間でアレルが見出されたが、プールの試験では対応するピークが見られないことを意味する。アレル頻度=0-0.1とは、プールにおいてマイナーアレルが検出されるが、ピークが低すぎて信頼性をもって定量できないことを指す。

#### 【0139】

KYUGEN(方法1)として識別されるさらに別の方法において、PCR産物を蛍光色素で後標識し、SSCP条件下で自動キャピラリー電気泳動システムにより分析する(PLACE-SSCP)。一連の実験において、2種類のプールDNA(日本人プール及びCEPH親プール)とともに又はそれらなしで4以上の個々のDNAを分析する。目視によりアレルを同定する。遺伝子型が異なる個々のDNAの配列決定を行い、SNPを同定する。ヘテロ接合体におけるピーク高を用いたシグナルバイアス補正後、プール試料においてピーク高からアレル頻度を推定する。PCRに対して、両鎖の後標識のためにプライマーの末端に5'-ATT又は5'-GTTを有するようにタグの付加を行う。緩衝液(10mM Tris-HCl、pH8.3又は9.3、50mM KCl、2.0mM MgCl<sub>2</sub>)、プライマー各0.25μM、dNTP各200μM及び抗Taq抗体と予め混合されているTaq DNAポリメラーゼ0.025単位/Lを含有する反応混合液中でDNA試料(10ng/μL)を増幅する。DNAポリメラーゼIのクレノウ断片の交換反応により、PCR産物の2本の鎖をR110及びR6Gで修飾されたヌクレオチドで別々に標識する。EDTA添加によって反応を停止させ、ウシ腸アルカリホスファターゼを添加することによって、取り込まれなかったヌクレオチドを脱リン酸化する。SSCPの場合:蛍光標識PCR産物及びTAMRA-標識内部マーカのアリコートを開イオン化ホルムアミドに添加し、変性させる。ABI Prism 310 Genetic Analyzerを用いてキャピラリーにおいて電気泳動を行う。データ回収及びデータ処理のためにGenescanソフトウェア(P-E Biosystems)を用いる。SSCPにおいて異なる遺伝子型を示したものを含む個々のDNA(2から11)に対して、ABI Prism 310シーケンサーにおいてビッグダイターミネーター化学を用いて直接配列決定を行う。ABI Prism 310から得た複数の配列ト

10

20

30

40

50

レースファイル进行处理し、Phred/Phrapによりアラインし、Consed viewerを用いて調べる。Polyphredソフトウェア及び目視によりSNPを同定する。

#### 【0140】

KYUGENとして認識されるさらに別の方法(方法2)において、変性HPLC(DHPLC)又はPLACE-SSCP(Inazukara, 1997)により遺伝子型が異なる個体を探し、SNPを同定するためにそれらの配列を決定する。両鎖の後標識のためにそれらの末端で5'-ATT又は5'-GTTによりタグ付加したプライマーを用いてPCRを行う。WAVE DNA断片分析システム(Transgenomic)を用いてDHPLC分析を行う。PCR産物をDNasepカラムに注入し、WAVEMakerプログラム(Transgenomic)を用いて決定された条件下で分離する。DNAポリメラーゼIのクレノウ断片の交換反応により、PCR産物の2本の鎖をR110及びR6Gで修飾されたヌクレオチドで別々に標識する。EDTA添加によって反応を停止させ、ウシ腸アルカリホスファターゼを添加することによって取り込まれなかったヌクレオチドを脱リン酸化する。SSCP後に、続いてABI Prism 310 Genetic Analyzerを用いてキャピラリー中で電気泳動を行う。Genescanソフトウェア(P-E Biosystems)。DHPLC又はSSCPにおいて異なる遺伝子型を示したものを含む個々のDNAに対して、ABI Prism 310シーケンサーにおいてビッグダイターミネーター化学を用いて直接配列決定を行う。ABI Prism 310から得た複数の配列トレースファイル进行处理し、Phred/Phrapによりアラインし、Consed viewerを用いて調べる。Polyphredソフトウェア及び目視によりSNPを同定する。UnigeneにおけるEST配列のトレスクロマトグラムデータをPHREDで処理する。可能性のあるSNPを同定するために、各UnigeneクラスターについてプログラムPHRAP、BRO及びPOAによって生成された多重配列アラインメントから一塩基ミスマッチが報告される。BROは、間違って報告される可能性があるEST方向を補正し、一方POAは、偽SNPを生じさせ得る遺伝子混合/キメラを指す非線形アラインメント構造を同定し、分析する。生クロマトグラム高、尖鋭度、重複及び間隔;配列決定エラー率;コンテキスト感受性(context-sensitivity);cDNAライブラリ起源などのデータを評価しながら、ベイズ推論を使用し、配列決定エラー、ミスアラインメント又は曖昧性、ミスクラスタ化又はキメラEST配列に対して真の遺伝多型に対する証拠を比較検討する。

#### 【0141】

##### XIII. 製剤処方及び投与経路

本開示の治療用化合物は、様々な方法、例えば経口により又は注射(例えば皮下、静脈内、腹腔内など)により投与し得る。投与経路に依存して、活性化合物は、その化合物を不活性化し得る酸及びその他の天然の状態の作用から化合物を保護する材料中で被覆され得る。これらはまた、疾患又は創傷部位の連続かん流/点滴により投与し得る。

#### 【0142】

非経口投与以外の方法により治療用化合物を投与するためには、その化合物の不活性化を防ぐための材料で化合物を被覆するか又は不活性化を防ぐための材料とともにその化合物を同時投与する必要がある。例えば、適切な担体、例えばリポソーム又は希釈剤中で本治療用化合物を患者に投与し得る。医薬的に許容可能な希釈剤としては、生理食塩水及び水性緩衝液溶液が挙げられる。リポソームとしては、水中油中水CGF乳剤ならびに従来のリポソームが挙げられる(Strejanら, 1984)。

#### 【0143】

本治療用化合物はまた、非経口、腹腔内、髄腔内又は脳内投与することもできる。グリセロール、液体ポリエチレングリコール及びそれらの混合物中及び油中で分散液を調製し得る。通常の保管及び使用状態で、これらの調製物には、微生物の増殖を防ぐための保存料が含有され得る。



## 【0144】

注射としての使用に適切な医薬組成物としては、滅菌水溶液（水溶性である場合）又は分散液及び、滅菌水溶液又は分散液の即時調整のための滅菌粉末が挙げられる。全ての例において、組成物は滅菌状態でなければならず、容易にシリンジに吸い取ることができる程度に流動性がなければならない。これは、製造及び保管の条件下で安定でなければならず、細菌及び真菌などの微生物の混入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（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など）、適切なそれらの混合物及び植物油を含有する溶媒又は分散媒であり得る。例えば、レシチンなどの被覆を使用することによって、分散液の場合は要求される粒子サイズの維持によって及び界面活性剤の使用によって、的確な流動性を維持することができる。様々な抗菌及び抗真菌剤、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、チメロサルなどによって微生物作用の防御を達成することができる。多くの場合、組成物中に、等張剤、例えば糖類、塩化ナトリウム又はポリアルコール、例えばマンニトール及びソルビトールなど、を含むことが好ましいであろう。吸収を遅延させる物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムを又はゼラチンを組成物中に含めることによって、注射用組成物の持続的吸収を行うことができる。

10

## 【0145】

滅菌注射溶液は、上述の成分の1つ又は組み合わせとともに、適切な溶媒中で、必要とされる量、治療化合物を組み込み、続いて必要に応じて過滅菌することにより調製することができる。一般に、分散液は、基本的な分散媒及び上述のもののうち必要とされる他の成分を含有する滅菌担体に本治療化合物を組み込むことにより調製する。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、その予め過滅菌した溶液から活性成分（即ち治療化合物）+何らかのさらなる望ましい成分の粉末が得られる真空乾燥及び凍結乾燥である。

20

## 【0146】

例えば不活性希釈剤又は吸収可能な可食担体とともに本治療化合物を経口投与することができる。本治療化合物及び他の成分を硬又は軟殻ゼラチンカプセルに封入するか、圧縮して錠剤にするか又は対象の食餌中に直接組み込むこともできる。経口による治療薬投与の場合、本治療化合物を賦形剤とともに組み込み、摂取可能な錠剤、バッカル錠、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁液、シロップ剤、ウエハース剤などの形態で使用し得る。本組成物及び調製物中の治療化合物のパーセンテージは、当然ではあるが変動し得る。このような治療上有益な組成物中の本治療化合物の量は、適切な投与量が得られるようなものである。

30

## 【0147】

投与し易くし、投与量を均一にするために、非経口組成物を投与単位形態で製剤化することは特に有利である。投与単位形態とは、本明細書中で使用される場合、治療しようとする対象に対して統一された投与量として適した物理的に個別化された単位を指し；各単位は、必要とされる医薬担体と結び付いて望ましい治療効果をもたらすように計算された所定量の治療化合物を含有する。本発明の投与単位形態に対する規格は、（a）本治療化合物及び達成しようとする特定の治療効果の独特の特徴及び（b）患者における選択された状態の治療に対するこのような治療化合物の化合の技術分野に固有の制限に左右され、これらに直接依存する。

40

## 【0148】

本治療化合物は、皮膚、眼又は粘膜に局所投与することもできる。あるいは、肺への局所的送達が望ましい場合、乾燥粉末又はエアロゾル製剤中での吸入によって本治療化合物を投与し得る。

## 【0149】

患者における状態に関連する状態を治療するのに十分な治療的有効投与量で活性化合物を投与する。例えば、実施例及び図面で示されるモデルシステムなど、ヒトにおける疾患の治療での有効性を予測し得る動物モデル系において化合物の有効性を評価することがで

50

きる。

【0150】

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与量は、年齢、性別、体重、状態の重症度、治療される疾患のタイプ、以前の又は現在の治療的介入、対象の特発性疾患などの身体的及び生理学的因子ならびに投与経路により決定される。これらの因子は、熟練者により決定され得る。投与責任医師は一般的に組成物中の活性成分濃度及び個々の対象に対する適切な用量を決定する。何らかの合併症のイベントにおいて個々の医師により投与量が調整され得る。

【0151】

有効量は一般的に、1日1回以上の投与で、1日又は数日にわたり、約0.001 mg / kg から約1000 mg / kg、約0.01 mg / kg から約750 mg / kg、約100 mg / kg から約500 mg / kg、約1.0 mg / kg から約250 mg / kg、約10.0 mg / kg から約150 mg / kg と変動する（当然ではあるが投与形式及び上記で論じた因子に依存する。）。他の適切な用量範囲としては、1 mg から10000 mg / 日、100 mg から10000 mg / 日、500 mg から10000 mg / 日及び500 mg から1000 mg / 日が挙げられる。いくつかの特定の実施態様において、この量は10,000 mg / 日未満、750 mg から9000 mg / 日の範囲である。

10

【0152】

有効量は、1 mg / kg / 日未満、500 mg / kg / 日未満、250 mg / kg / 日未満、100 mg / kg / 日未満、50 mg / kg / 日未満、25 mg / kg / 日未満又は10 mg / kg / 日未満であり得る。あるいは、これは、1 mg / kg / 日から200 mg / kg / 日の範囲であり得る。例えば、糖尿病患者の治療に関して、単位投与量は、未処置対象と比較した場合に血中グルコースを少なくとも40%低下させる量であり得る。別の実施態様において、単位投与量は、非糖尿病対象の血糖値の±10%であるレベルに血中グルコースを低下させる量である。

20

【0153】

他の非限定例において、用量はまた、投与1回あたり、約1 µg / kg / 体重、約5 µg / kg / 体重、約10 µg / kg / 体重、約50 µg / kg / 体重、約100 µg / kg / 体重、約200 µg / kg / 体重、約350 µg / kg / 体重、約500 µg / kg / 体重、約1 mg / kg / 体重、約5 mg / kg / 体重、約10 mg / kg / 体重、約50 mg / kg / 体重、約100 mg / kg / 体重、約200 mg / kg / 体重、約350 mg / kg / 体重、約500 mg / kg / 体重から約1000 mg / kg / 体重以上及びこれらにおいて導き出せる何らかの範囲も含み得る。本明細書中で列挙される数字から導き出せる範囲の非限定例において、約5 mg / kg / 体重から約100 mg / kg / 体重、約5 µg / kg / 体重から約500 mg / kg / 体重などの範囲を上述の数字に基づき投与し得る。

30

【0154】

ある種の実施態様において、本開示の医薬組成物は、本開示の化合物を例えば少なくとも約0.1%含み得る。その他の実施態様において、本開示の化合物は、単位重量の約2%から約75%の間又は約25%から約60%の間、例えばこれらにおいて導き出せる何らかの範囲を占め得る。

40

【0155】

薬剤の単回又は複数回投与が企図される。複数回投与量の送達のための望ましい時間間隔は、通常の実験のみを使用して、当業者により決定され得る。例として、対象におよそ12時間の間隔で1日2回投与し得る。いくつかの実施態様において、薬剤を1日1回投与する。

【0156】

通常のスケジュールで薬剤を投与し得る。本明細書中で使用される場合、通常のスケジュールとは、予め定められた指定の期間を指す。通常のスケジュールは、このスケジュールが予め定められたものである限り、長さが同一であるか又は異なる期間を包含し得る。

50

例えば、通常のスケジュールは、1日2回、毎日、2日ごと、3日ごと、4日ごと、5日ごと、6日ごと、毎週、毎月又はそれらの間の日数もしくは週数の何らかのセットを含み得る。あるいは、予め定められた通常スケジュールは、第1週に1日2回、次いで数ヶ月にわたり毎日などの投与を含み得る。その他の実施態様において、本発明は、薬剤が経口で摂取され得、そのタイミングが食物摂取に依存するか又は依存しないことを提供する。従って、例えば、対象がいつ食べたか、いつ食べるのかにかかわらず、薬剤が毎朝及び/又は毎夕摂取され得る。

#### 【0157】

##### XIV. 併用療法

単一組成物又は両薬剤を含む医薬製剤を用いて又は、一方の組成物が本発明の化合物を含み、他方が第二の薬剤を含み、同時投与される2種類の個別の組成物もしくは製剤を使用して、有効な併用療法を達成し得る。あるいは、本治療薬を先に投与し、続いて分単位から月単位の範囲の間隔で他方の薬剤を投与し得る。

10

#### 【0158】

様々な併用投与を使用し得るが、「A」が第一の薬剤（例えば、DFMO）に相当し、「B」が第二の薬剤（例えばスリダク）に相当するものとして、これらの非限定例を下記で述べる：

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.

20

#### 【0159】

##### XV. 実施例

次の実施例は、本発明の好ましい実施態様を明らかにするために含まれる。当業者にとって当然のことながら、続く実施例で開示される技術は本発明の実施において良好に機能することが本発明者により発見された代表的技術を表し、従ってその実施に対する好ましい方式を構成すると考えられ得る。しかし、当業者は、本開示に照らして、開示される具体的な実施態様において多くの変更がなされ得、それでも本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、同様の結果を得ることができるとを認識するであろう。

30

#### 【0160】

##### 実施例1 - 疫学的研究：CRC特異的生存率とODC+316SNPとの関連

実験計画：本研究には、集団ベースのUC Irvine Gene-Environment Study of Familial CRC（1994から1996年に診断、2008年3月までフォローアップ）からの440例の偶発CRC症例が含まれた。一次アウトカムは、ODC遺伝子型（GG対AA/GA）によるCRC特異的生存率（CRC-SS）であった。ヒト結腸癌細胞株において、ウエスタンブロッティング及びクロマチン免疫沈降（CHIP）アッセイを介してE-ボックス転写因子のODCアレル特異的結合を調べた。転写活性化因子c-MYC又は抑制因子MAD1の何れかを発現するベクターと組み合わせてプロモーターコンストラクトを用いて、ODCアレル特異的プロモーター活性を調べた。

40

#### 【0161】

結果：CRC症例間の遺伝子型特異的生存率の相違は結腸癌症例に限定されており、ODC GG遺伝子型症例と比較して（HR = 1.00、基準値）、ODC GAの場合、調整済みCRC-SSハザード比（HR）は2.31（1.15 - 4.64）であり、ODC AA症例の場合、3.73（0.93 - 14.99）であった（P-トレンド = 0.006）。結腸癌細胞において、2個のE-ボックスが隣接するODC+316SNPは、ODCプロモーター活性を予測する。E-ボックス活性化因子-MYC及び抑制因子MAD1及びMAD4は、培養細胞において、メジャーG-アレルと比較してマイナー

50

A - に選択的に結合する。

【0162】

試験対象母集団。発明者らは、1994年から1996年の間に行われ、2008年3月までフォローアップを行った、University of California、Irvine Gene-Environment Study of Familial Colorectal Cancer (Peelら、2000; Zellら、2007)に登録された侵襲性CRCの偶発症例について研究を行った。結腸直腸癌症例の大規模集団ベースコホートにおけるHNPPC発生率を調べるために親研究を計画した。2008年4月のデータファイルを使用して、Cancer Surveillance Program of Orange County/San Diego Imperial Organization for Cancer Controlの集団ベースの癌登録を通じて参加者を特定した。親研究において (Peelら、2000)、1994年から1996年の間にOrange County、CAで全年齢でCRCと診断された対象全てを確認した。San Diego及びImperial Counties、CAで1994年から1995年の間に<65歳で診断された対象全ても確認した。次に、対象が本研究にふさわしかった場合 (確認時に生存しており、連絡先がある。) 及びその対象の担当医師が連絡許可を拒否しなかった場合、その対象に連絡を取った。試験エントリー時に、対象は血液採取及び医学的情報の公開を許可する同意書に署名した。この研究は、UC Irvine 治験審査委員会 (#93-257) により承認を受けた。既に記載のように、地域癌登録データベースとの連携を通じて生命状態及びフォローアップを含む臨床及び人工統計学的データを得た (Peelら、2000; Zellら、2007; Zellら、2008)。腫瘍、結節、転移 (TNM) ステージ決定は、利用可能な場合は既存のAJCCコードであり、以前に報告されているように、疾患コードの範囲の変換によるものであった (Leら、2008)。登録時に行った電話インタビュー中に第一度近親者中の癌の家族歴を自己報告により確認した (Zellら、2008; Ziogas及びAnton-Culver、2003)。Amsterdam基準により判定した遺伝性非ポリポーシス結腸癌 (HNPPC) の22例を同定し、本分析から除外した。CRC診断から試験エントリー (即ち家族歴インタビューの日) までの時間の中央値は16ヶ月であった (95% CI 12-23ヶ月)。

【0163】

DNA抽出物及びODC+316SNP遺伝子型決定。製造者の説明書に従い、QIAGEN QIAamp DNAMidi又はMiniキット (Qiagen) を使用して2.0mLの赤血球細胞クロット試料からDNAを抽出した。+316に多型塩基を含有する172bp断片を増幅するように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、ODC+316SNPの遺伝子型決定を行った (Applied Biosystems、Foster City、CA)。異なる5'標識 (6-カルボキシフルオレセイン又はVIC) 及び同じ3'クエンチャー色素 (6-カルボキシテトラメチルローダミン) を用いてアレル特異的TaqManプローブを合成した (23)。各PCR反応液 (全部で5µL) は、以前に報告されたとおり、10ngの参加者DNA、プライマー各30pmol、TaqManプローブ各12.5pmol及び1xTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems、Foster City、CA) を含有した (Martinezら、2003; Guoら、2000)。

【0164】

統計学的解析 - 集団ベース研究。ODC GG遺伝子型とODC GA/AA遺伝子型との推定1:1比に基づいて被験者数を決定した (Martinezら、2003; Barryら、2006; Hubnerら、2008; Guoら、2000)。UC Irvine Gene-Environment Study of Familial CRCにおける1154例の結腸及び直腸癌症例からのデータの以前の分析から、10年間のCRC特異的生存率が66%と概算されたことが明らかになった (Zellら、200

8)。発明者らは、発明者らの被験数計算に対して、ODC遺伝子型のみに基づき、CRC特異的生存率において15%以上の差があるという考えを提示した。従って、80%検出力で5%有意レベルで、提示した2群間の10年CRC特異的生存率の差：第1群で55%であり第2群で70%、を検出するために全部で315名の対象が必要であった。481検体のDNA試料のうち440検体の遺伝子型決定に成功した。41検体(8.5%)では、DNA濃度が低いこと及び/又はDNA品質が低いことによりODC+316遺伝子型を決定できなかったが、遺伝子型決定に成功した例と失敗した例との間で臨床病理学的な相違は認められなかった。従って、本研究は、主要エンドポイントに対処するのに十分に分析力が与えられている。

#### 【0165】

ピアソンのカイ二乗検定又は名義変数に対するフィッシャーの正確確立検定及び連続変数に対するスチューデントのt検定を用いて、結腸及び直腸症例間の人口統計学的、臨床及び病理学的変数の比較を行った。結腸直腸癌特異的生存率は、CRCそれ自身による死亡として定義し、次の場合はデータ取得を打ち切った：フォローアップ終了時の生存、フォローアップ不能又はCRCを除く何れかの原因による死亡。全生存期間(OS)は、あらゆる原因による死亡により定めた。カプラン・マイヤー法を用いて結腸及び直腸癌症例に対して生存曲線を作成し、単変量解析のためにログランク検定により分析した。診断からの時間を用いて、CRC症例、結腸癌症例及び直腸癌症例の全てに対してコックス比例ハザードモデル法を行い、ODC遺伝子型に基づく全体的及びCRC特異的死亡の調整済みリスクの概略を調べた。コックスモデルにおいて、次の共変量に対して調整して、生存におけるODC遺伝子型(GG、GA又はAA)の影響を分析した：年齢、性別、民族、CRC家族歴、診断時のTNMステージ、結腸内の腫瘍部位、組織学的サブタイプならびに外科手術、放射線療法及び化学療法による治療。ダミー変数を用いてこのモデルにおける各変数をコード化した。SAS9.2統計ソフトウェア(SAS Institute、Cary、NC)を用いて全分析を行った。両側P値<0.05の場合、統計学的有意とみなした。

#### 【0166】

実施例2 - 実験的研究：結腸癌細胞におけるODC+316SNP制御

細胞培養。マッコイ5A培地(Invitrogen、Carlsbad、CA)中でヒト結腸癌細胞株HT29及びHCT116を維持した。使用した培地は全て、10%FBS+1%ペニシリン/ストレプトマイシン溶液(Invitrogen、Carlsbad、CA)を補給した。37℃で5%CO<sub>2</sub>の湿潤雰囲気中で培養物を維持した。

#### 【0167】

遺伝子型決定アッセイ。HT29及びHCT116細胞からのDNA試料をPCR-RFLP法に供して、多型PstI部位を検出した。次のプライマー：5'-TCTGCGCTTCCCCCATGGGGCT-3'(配列番号1)及び5'-TTTCCCCAACCCCTTCG-3'(配列番号2)を用いてPCRにより配列を増幅させた。各反応液には、最終体積25µL中、1µL DNA、プライマー各4pmol、2xPCR Premixes緩衝液「G」12.5µL(EPICENTRE Biotechnologies、Madison、WI)及びTaq DNAポリメラーゼ0.5単位が含有されていた。PCR産物の予想サイズは351bpであった。増幅後、37℃で2時間、30µL中で10単位のPstIにより10から20µLのPCR産物を消化した。PstI部位を含有するHT29細胞(GA)由来のDNAから156及び195bpの2つの断片が生じた。

#### 【0168】

ウエスタンブロット分析。細胞を回収し、溶解させ、12.5%SDS-PAGEゲル上でタンパク質を分離した。電気泳動によりHybond-Cメンブレン上にタンパク質を転写した。Blotto A(TTBS溶液中5%ブロッキンググレード粉乳)によってメンブレンをブロッキング処理し、Blotto A中で1:300希釈した一次抗体(Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA)

を用いて調べた。4 で一晩一次抗体をインキュベートし、次に適切なHRPタグ付加二次抗体(1:1000希釈)とともに室温にて1時間インキュベートした。ECLウエスタン検出試薬(Amersham Biosciences、Piscataway、NJ)を用いて化学発光検出を行い、Biomax XARフィルム(Kodak)上で曝露した。

#### 【0169】

クロマチン免疫沈降(CHIP)。製造者により推奨されるように、市販のキットを用いて、CHIPアッセイを行った(Upstate Biotech、Lake Placid、NY、USA)。簡潔に述べると、細胞を1%ホルムアルデヒドで処理し、DNA及びタンパク質を架橋し、超音波処理により200から1000bpの間の長さになるようにDNA-タンパク質複合体を破壊した。プロテアーゼ阻害剤を含有する免疫沈降(IP)希釈緩衝液で細胞溶解液を10倍希釈した。c-MYC、MAD1及びMAD4に対する抗体(Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA)を使用してクロマチンを沈殿させ、一方でさらなる試料を抗体なし(-Ab)対照群とした。試料を回転させながら4 で一晩免疫沈降させた。60µLのサケ精子DNA/プロテインAアガローススラリーを添加し、回転させながら4 で1時間インキュベートして、続いて穏やかに遠心分離(1000rpm、1分)することによって、免疫複合体を得た。プロテインAアガロースペレットを低塩緩衝液、高塩緩衝液、LiCl緩衝液及びTE緩衝液で洗浄した。次いで、250µLの溶出緩衝液(0.1M NaHCO<sub>3</sub>、1%SDS)を2回添加することによって複合体を溶出し、投入DNA及び - Ab

DNA対照を含め、全試料に対して65 で4時間加熱することによって、0.2M NaClを用いてDNA-タンパク質架橋を無効にした。30µLのddH<sub>2</sub>O中でDNAを再懸濁した。PCR産物及びその大きさを視覚化するために、標準的PCR反応を行った。PCRのために使用されるODCプライマーの配列は5'-CCTGGGCGCTCTGAGGT-3'(配列番号3)(17mer)及び5'-AGGAAGCGGCGCCTCAA-3'(配列番号4)(17mer)であった。ABI7700配列検出システム上でTaqMan遺伝子発現アッセイキット(Applied Biosystems、Foster City、CA)を用いて定量的リアルタイムPCRを行った。相対的結合の計算に関する詳細は、製造者のウェブサイト(<http://www.appliedbiosystems.com>)で見ることができる。

#### 【0170】

一過性形質移入。補足ファイル中で詳述されるように製造者のプロトコルに従い、LipofectAMINE試薬(Invitrogen、Carlsbad、CA)を用いて一過性形質移入を行った。HCT116及びHT29細胞に対して、0.01µgのウミシタケ-TKプラスミドとともに1µgのpGL3-ODC/A又はpGL3-ODC/Gプラスミドにより形質移入を行った(Martinezら、2003)。ウミシタケ-TKプラスミドはPromega(Madison、WI)から購入し、全てのプロモーター-レポーター形質移入実験において形質移入効率対照群として使用した。c-MYC実験の場合、ODC pGL3-プラスミドをpCDNA3.0又はCMV-c-MYC発現ベクターの何れかと同時形質移入した(OriGene、Rockville、MD)。MAD1実験の場合は、ODCプラスミドをpCDNA3.1又はpCDNA-MAD1の何れかと同時形質移入した。c-MYC及びMAD1同時形質移入に対して、pGL3ベクターにクローニングしたODC遺伝子の最初の1.6kbを含有するODCプロモーターレポーターコンストラクトを調製した。このコンストラクトには、E-ボックス1(-485から-480bp)インタクト(wtE-ボックス1)又は欠失(mutE-ボックス1)が含まれた。さらに、+316ODC SNPの両変異体を使用し、全部で4種類の異なるコンストラクトを作製した。インキュベート6時間後、20%FBSを含有する完全培地を細胞に補充し、一晩増殖させた。翌日、形質移入後、20%FBS-含有完全培地から10%FBS-含有培地に置き換えた。形質移入から48時間後、PBSで細胞を洗浄し、Dual Luciferaseアッセイキット(Prom

e g a、M a d i s s o n、W I ) の P a s s i v e L y s i s 緩衝液中で溶解させた。製造者により記載のように T u r n e r D e s i g n s T D - 2 0 / 2 0 照度計を用いて二重ルシフェラーゼ活性を測定し、相対的ルシフェラーゼ単位 ( R L U ) として示した。3 つ組みで実験を行い、少なくとも 2 回繰り返した。

#### 【 0 1 7 1 】

統計学的解析 - 実験的研究。一過性形質移入実験の場合、2 試料 t 検定を使用した ( M i c r o s o f t E x c e l M i c r o s o f t C o r p . , R e d m o n d , W A ) 。第一の E - ボックスエレメントの有無が異なる O D C プロモーターコンストラクト : ( a ) 野生型 ( w t ) E - ボックス 1 + 3 1 6 G、( b ) 突然変異体 ( m u t ) E - ボックス 1 + 3 1 6 G、( c ) w t E - ボックス 1 + 3 1 6 A 及び ( d ) m u t E - ボックス 1 + 3 1 6 A を用いて、H T 2 9 結腸癌細胞中で O D C アレル特異的プロモーター活性に対する c - M Y C 発現の影響を調べた。各プロモーターコンストラクトに対して、p c D N A 3 . 0 プラスミドを同時形質移入した細胞と C M V - c - M Y C 発現ベクターで形質移入した細胞との間で、2 試料 t 検定を使用してプロモーター活性を比較した。同様に、O D C アレル特異的プロモーター活性に対する M A D 1 発現の影響を調べるために、2 試料 t 検定を使用して、p c D N A 3 . 1 プラスミドを同時形質移入したプロモーターコンストラクトのプロモーター活性の効果と p c N A - M A D 1 プラスミドで形質移入したものの効果とを比較した。両側 P 値 < 0 . 0 5 の場合、統計学的に有意とみなした。

#### 【 0 1 7 2 】

##### 実施例 3 - O D C 1 遺伝子型の異なる影響

本研究は、多施設第 I I I 相結腸腺腫予防試験由来の患者データの分析を含む ( M e y s k e n s ら、2 0 0 8 ) 。3 7 5 名の患者が登録され、2 6 7 名の患者において試験終了時の大腸内視鏡検査を完了した後、D a t a S a f e t y M o n i t o r i n g B o a r d ( D S M B ) により中止された ( 試験がその有効性エンドポイントに達したため ) 。D S M B は全ての安全性及び有効性エンドポイントを監視した。O D C 1 S N P の重要性を示すデータ ( 2 ) に照らしてプロトコルを改変した場合、2 0 0 2 年 1 1 月以降、遺伝子型決定分析のために 2 2 8 名の同意のある試験患者において血液標本を回収した ( この日付前にランダム化した 2 4 6 名の患者のうち 1 5 9 名及びこの日付の後にランダム化した 1 2 9 名の患者のうち 6 9 名を含む ) 。既に記載されるように ( G u o ら、2 0 0 0 ) 、アレル特異的 T a q M a n プローブを用いて患者由来ゲノム DNA に対して O D C 1 ( r s 2 3 0 2 6 1 5 ) 遺伝子型決定を行った。無作為に選択した 8 検体の直腸粘膜生検標本のうち 3 検体を使用して、既に記載されるように ( M e y s k e n s ら、1 9 9 8 ; S e i l e r 及び K n o d g e n、1 9 8 0 ) 直腸組織ポリアミン含量を調べた。2 5 % から 4 5 % の範囲の反応値に対して組織ポリアミン反応を行った。

#### 【 0 1 7 3 】

優性モデル : A A / G A 対 G G 患者下で O D C 1 遺伝子型を分析した。2 つの遺伝子型群にわたる非正規分布する連続変数においてウイルクスン順位和検定を行った。カイニ乗検定又はフィッシャーの正確確率検定を使用して、ベースラインカテゴリー変数と遺伝子型群との間の関連性を評価した。遺伝子型相互作用によって、予測因子 : 治療群、年齢、性別、人種 ( 白人対その他 ) 、アスピリン使用、O D C 1 遺伝子型 ( 優性モデルにおける ) 及び治療に相当する項とともに主要エンドポイント ( 腺腫再発 ) において対数二項分布回帰を行った。副次評価項目 ( 直腸組織ポリアミン反応、毒性 ) に対して、完全対数二項分布モデルを用いて、治療群、遺伝子型及び治療と遺伝子型との間の相互作用の影響を調べた。S A S 9 . 2 統計ソフトウェア ( S A S I n c . , C a r y , N C ) を用いて統計学的解析を行った。患者は、臨床試験組み入れ及び標本採取 / 分析に対するインフォームドコンセントに署名した。この研究は、U C I r v i n e 治験審査委員会 ( I R B 治験実施計画書 # 2 0 0 2 - 2 2 6 1 ) による全員参加の委員会審査及び参加試験施設の各地域 I R B による審査後、承認を受けた。

#### 【 0 1 7 4 】

O D C 1 遺伝子型分布は : 1 2 6 G G ( 5 5 % ) 、8 7 G A ( 3 8 % ) 及び 1 5 A A (

7%)であった。ベースラインの臨床的特徴から、表1で示されるように相違が明らかになった。完全回帰モデルでの調整後の治療に関連する腺腫再発に対する相対リスク(RR)は0.39であった(95%CI 0.24 - 0.66)。プラセボ又は治療薬の投与を受けている患者において、それぞれODC1 GG患者では23%対22%で、ODC1 GA患者では20%対21%で、ODC1 AA患者では0%(7名中0)対57%(7名中4名)で聴器毒性が起こった。

#### 【0175】

##### 実施例4 - 食事性ポリアミン摂取分析

患者集団、親研究の説明。この研究は、他所に記載のような、多施設結腸腺腫予防試験からの患者データ及び標本の分析を含む。Meyskens FL, McLaren C. E., Pelot D., Fujikawa S.ら: Difluoromethylornithine plus sulindac for the prevention of sporadic colorectal adenomas: a randomized placebo-controlled, double-blind trial. Cancer Prevention Research 1:32-38, 2008。これは、結腸直腸腺腫の病歴がある患者における、スリダク150mgの連日投与と組み合わせたDFMO500mgの連日投与対プラセボのランダム化二重盲検、プラセボ比較第IIb相臨床試験として開始され、その後2003年に第III相臨床試験へと拡大された。375名の患者をランダム化して、DFMO及びスリダク又はプラセボの何れかを投与した。試験施設及び以前の低用量アスピリン使用について層別化を行った。計画した治療期間は36ヶ月であった。ベースライン及び試験終了時に内視鏡検査を行い、8検体の直腸粘膜組織生検をそれぞれ入手した。ベースラインインタビュー時に臨床データを回収し、試験チャートに記録した。試験開始時に患者が記入した食物摂取頻度調査票を回収した。2回目の中間解析時に臨床有効性エンドポイントが達成されたので本研究は中止され、従って、267名の患者が本臨床試験を完遂した。Meyskens FL, McLaren C. E., Pelot D., Fujikawa S.ら: Difluoromethylornithine plus sulindac for the prevention of sporadic colorectal adenomas: a randomized placebo-controlled, double-blind trial. Cancer Prevention Research 1:32-38, 2008。

#### 【0176】

食事性ポリアミン摂取。Fred Hutchinson Cancer Research Center食物摂取頻度調査票(FFQ)を用いて、この臨床試験における参加者の食事性摂取を推定したが、この手段に対する解析アルゴリズムは他所で公開されている。Kristal AR, Shattock, A. L. 及びWilliams, A. E.: Food frequency questionnaires for diet intervention research. Washington, DC: International Life Sciences Institute, . Proceeding of the 17<sup>th</sup> National Nutrient Databank Conference, Baltimore, MD, 1992., 1992; Schakel SF, Buzzard, I. M. 及びGebhardt, S. E.: Procedures for estimating nutrient values for food composition database. J Food Comp Anal 10:102-14, 1997。このFFQに列挙される370種類の食品中の食事性ポリアミンを推定するために、ポリアミン食品含量データベースを開発し、FFQと連結し、Zoumas-Morseらにより記載されるように、このためにUniversity of Minnesota Nutrition Coordinating Center(NCC)Nutrient Databaseを食品含量データの主な情報源とした。Zoumas-Morse C, Rock CL, Qui

10

20

30

40

50



ntana EL: Development of a polyamine database for assessing dietary intake. J Am Diet Assoc 107:1024-7, 2007。個々の食品中のスペルミン、スペルミジン及びブトレッシンに対する値を計算し、nmol/gとして表した。食事性ブトレッシンは総食事性ポリアミン摂取に対する主要な寄与因子であった。1日の総食事性ポリアミン含量は、食事性ブトレッシン、スペルミン及びスペルミジンを添加することに由来し、最上位(75から100%)4分の1の群と下位4分の3の群(0から25、25から50及び50から75%)にさらに分類した。この分析において結果をエネルギーで調整した。

#### 【0177】

組織ポリアミン分析。以前に記載のように直腸組織ポリアミン含量を調べた。Meyskens FL, Gerner EW, Emerson SR: Effect of alpha-difluoromethylornithine on Rectal Mucosal levels of polyamines in a randomized, double-blinded trial for colon cancer prevention. Journal of the National Cancer Institute 90:1212-1218, 1998; Boyle JO, Meyskens FL, Jr., Garewal HS: Polyamine contents in rectal and buccal mucosae in humans treated with oral difluoromethylornithine. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1:131-5, 1992、両者とも本明細書中に参照により組み込まれる。無作為に選択した8検体の直腸粘膜生検標本のうち3検体を用いてポリアミン含量を評価した。これらの方法により、ブトレッシン、カダベリン、ヒスタミン、スペルミジン、スペルミンならびに、ブトレッシン、スペルミジン及びスペルミンのモノアセチル誘導体を測定した。腫瘍のない直腸生検組織を回収し、氷冷生理食塩水をフラッシュし、-80で凍結保存した。試料を処理し、次いで内部標準として1,7-ジアミノヘプタンを用いて逆相高速液体クロマトグラフィーによりポリアミン含量についてアッセイした。Seiler N, Knodgen B: High-performance liquid chromatographic procedure for the simultaneous determination of the natural polyamines and their monoacetyl derivatives. J Chromatogr 221:227-235, 1980、これは本明細書中に参照により組み込まれる。BCAタンパク質アッセイキット(Pierce、Rockford、IL)を用いて各試料中のタンパク質含量を測定した。nmolポリアミン/mgタンパク質としてデータを表した。

#### 【0178】

統計学的解析。年齢、性別、民族、アスピリン使用歴及びポリープの位置、大きさ及び組織学などの変数の記述的分析を行った。ポリープの大きさ及び組織学的なグレードを考慮に入れた進行性腺腫と呼ばれる変数を生成し、絨毛性組織構造があるか又は大きさ>1cmの何れの腺腫も進行性腺腫として分類されるようにした。食事性及び組織ポリアミンデータが正規分布しなかったため、最大と低食事性ポリアミン摂取群における数字データの比較のためにノンパラメトリックのウィルコクソン順位検定を使用した。最大低食事性ポリアミン摂取群と低食事性ポリアミン摂取群における名義データの比較のために独立性に対するカイ二乗検定を使用した。スピアマン順位相関係数( $r_s$ )を使用して、ベースライン時の食事性ポリアミン摂取とタンパク質摂取、動物由来タンパク質及びアルギニンとの間の関係を評価した。ロジスティック回帰モデルを使用して、異時性腺腫の再発リスクを計算した。ロジスティック回帰を使用して、異時性腺腫の再発リスクを推定した。結果変数として異時性腺腫の存在を用いてモデルを形成し、予測因子には、食事性ポリアミン群、DFMO+スリンダク(対プラセボ)による治療、低用量アスピリンの使用(対

10

20

30

40

50

照なし)及び食事性ポリアミン群と治療との間の相互作用に相当する項が含まれた。統計学的解析は全て、SAS 9.2 統計ソフトウェア(SAS Inc.、Cary、NC)を用いて行った。

#### 【0179】

倫理的配慮。この研究には、第III相結腸直腸腺腫予防の親試験からのデータ及び組織の分析が含まれた。Meyskens FL, McLaren C.E., Pelot D., Fujikawa S.ら: Difluoromethylornithine plus sulindac for the prevention of sporadic colorectal adenomas: a randomized placebo-controlled, double-blind trial. Cancer Prevention Research 1:32-38, 2008、これは本明細書中に参照により組み込まれる。親試験は、UC Irvine 治験審査委員会(IRB 治験実施計画書#2002-2261)による全員参加の委員会審査及び参加試験施設の各地域IRBによる審査後、承認を受けた。全患者が、試験への組み入れ及び研究目的での標本採取/分析に対するインフォームドコンセントに署名した。

#### 【0180】

本試験母集団の特徴。食事性ポリアミンデータは、375名のベースライン試験患者のうち222名及び試験終了時の大腸内視鏡検査を完了した患者267名のうち188名について入手可能であった。本試験母集団の臨床的特徴を表5で示す。患者群は年齢、性別、人種/民族、アスピリン使用、以前のポリープ数、ポリープ歴及びポリープ部位が同様であった。本試験母集団の平均年齢は試験エントリー時に60歳±8歳標準偏差(SD)であり、47歳から75歳の範囲であった。患者のうち多くの割合が男性であり[164(74%)]、それに対して女性は58名(26%)であった。多くの患者が非ヒスパニック系白人[192(86%)]であり、続いてヒスパニック系[12(5%)]、アフリカ系アメリカ人[8(4%)]及びアジア系アメリカ人[7(3%)]であった。93名の患者(42%)から低用量アスピリン使用歴があることが報告され、それに対して129名がアスピリン未使用者(58%)であった。93名の患者(42%)においてはベースライン時の腺腫が1個のみであり、ベースライン時ポリープ総数は1から16個の範囲であった。次のポリープタイプが報告された: 管状腺腫170例(77%)、管状絨毛腺腫30例(13%)、未分類腺腫13例(6%)、絨毛腺腫6例(3%)、上皮内癌腫2例(<1%)及び高度異形成の腺腫1例(<1%)。ポリープ部位が次のように報告された: 直腸(n=43、19%)、左結腸(n=87、39%)、横行結腸(31、14%)、右結腸(35、16%)及び盲腸(26、12%)。

#### 【0181】

ベースライン時の食事性ポリアミン及び選択される臨床的特徴。1日の総食事性ポリアミン摂取の中央値は233, 261 nmol/日(48, 692から740, 446の範囲)であった。上位4分の1の患者は、318, 016 nmolポリアミン/日を超える報告をした者であった(他は全て低ポリアミン摂取群として分類した)。タンパク質の1日の総摂取量(全栄養源から)、動物由来タンパク質及びアルギニンの中央値はそれぞれ72.8g、51.8g及び4.0gであった。ベースライン時、1日の総タンパク質摂取量( $r_s = 0.62$ 、 $P < 0.0001$ ; 図12)、1日の総動物由来タンパク質摂取量( $r_s = 0.49$ 、 $P < 0.0001$ )及び1日の総アルギニン摂取量( $r_s = 0.64$ 、 $P < 0.0001$ ; 図13)で1日の総食事性ポリアミン摂取量を補正した。食事性アルギニン摂取量は個々の食事性ポリアミン成分スベルミン( $r_s = 0.90$ 、 $P < 0.0001$ )及びスベルミジン( $r_s = 0.74$ 、 $P < 0.0001$ )とよく相関し、食事性プトレッシンとの相関はそれほど大きくなかった( $r_s = 0.44$ 、 $P < 0.0001$ )。

#### 【0182】

低食事性ポリアミン群におけるベースライン時のポリープの平均数は2.61(±2.32SD)であり、これに対して最大食事性ポリアミン群では2.41(±1.90SD

）であり、これは有意ではなかった（ $P = 0.98$ ）。ベースライン時に、最大食事性ポリアミン群で1 cmを超える腺腫（43.6%対26.4%； $P = 0.016$ ）、より高グレードの腺腫（32.7%対20.4%  $P = 0.060$ ）の割合がより大きく、進行性腺腫の割合がより高かった（52.7%対35.9%； $P = 0.028$ ）。左側腺腫（対右）は、最大食事性ポリアミン群（49%）に対して、低食事性ポリアミン群（61.1%）内の患者間でより多かったが、この相違は統計学的に有意ではなかった（表6）。

#### 【0183】

食事性ポリアミン摂取及び直腸組織ポリアミン。ベースライン時に、平均直腸組織スぺルミジン及びスぺルミンレベルは低食事性ポリアミン群の患者間でより低かった（表3）。平均組織スぺルミジンレベルは、2.49対2.95 nmol/mg（ $P = 0.024$ ）であり、平均スぺルミンレベルは、低及び最大食事性ポリアミン群の患者に対してそれぞれ7.90対8.92 nmol/mg（ $P = 0.039$ ）であった。2つの食事性ポリアミン群にわたり、プトレッシン又はスぺルミジン：スぺルミン比の組織レベルにおいて統計学的有意差はなかった（表7）。

#### 【0184】

食事性ポリアミン及びポリープ再発における治療効果。発明者らの本研究の主要な目的は、腺腫再発における食事性ポリアミンとDFMO＋スリンダクによる治療との間の相互作用を分析することであった。食事性ポリアミン摂取データが入手可能であり、試験終了時の大腸内視鏡検査結果がある完全な試験データを有する188名の患者において分析を行い、ポリープ再発に対する影響を評価した。異時性ポリープ再発に対するロジスティック回帰モデルにおいて、食事性ポリアミン群と治療との間の相互作用に相当する項とともに、治療群（DFMO＋スリンダク対プラセボ）、アスピリン使用及び食事性ポリアミン摂取群を予測因子として使用した。全患者間で、DFMO＋スリンダクでの治療と異時性腺腫リスクがある食事性ポリアミン群との間で有意な相互作用が認められた（ $P = 0.01$ ）。リスク推定値は、下位4分の3の食事性ポリアミン群全体の患者に対して同様であり、従って最終分析（ $n = 188$ ）は2つのポリアミン摂取群とした。発明者らは、低食事性ポリアミン群でDFMO＋スリンダクでの治療による異時性腺腫の有意なリスク低下が認められたが（対プラセボ）[RR、0.19；95%CI 0.09 - 0.40； $P < 0.0001$ ]；最大食事性ポリアミン群ではプラセボと比較して治療による差は認められなかった[RR、1.04；95%CI、0.32 - 3.36； $P = 0.94$ ]。低食事性ポリアミン群において、次のエンドポイントに関してDFMO＋スリンダク治療について有意なリスク低下が認められた（対プラセボ）：大きな腺腫[RR、0.11；95%CI、0.01 - 0.88； $P = 0.03$ ]、高悪性度腺腫[RR、0.09；95%CI、0.01 - 0.71； $P = 0.02$ ]及び進行性腺腫[RR、0.06；95%CI、0.008 - 0.44； $P = 0.005$ ]（表8）。

10

20

30

【表 2】

表1. ODC1遺伝子型によるベースライン時の全対象の臨床的特徴 (n=228)

	ODC1 AA/GA 遺伝子型(n=102)	ODC1 GG 遺伝子型(n=126)	P*	
平均年齢(年齢±標準偏差)	60.2±8.4 SD	62.6±8.7 SD	0.024 <sup>†</sup>	
性別(n, %)				
男性	77 (75%)	96 (76%)	0.90	
女性	25 (25%)	30 (24%)		
人種(n, %)				
白人	84 (82%)	107 (85%)	0.007 <sup>†</sup>	10
黒人	3 (3%)	4 (3%)		
ヒスパニック系	4 (4%)	12 (10%)		
アジア系	9 (9%)	1 (1%)		
その他	2 (2%)	2 (2%)		
処置群(n, %)				
エフロルニチン+スリンダク	46 (45%)	71 (56%)	0.09	
プラセボ	56 (55%)	55 (44%)		
低用量アスピリン使用(n, %)				
はい	44 (43%)	54 (43%)	0.97	
いいえ	58 (57%)	72 (57%)		
中央値数(最小-最大で)	2.00 (1, 11)	2.00 (1, 16)	0.41 <sup>†</sup>	20
過去の最大ポリープの位置(n, %)				
直腸	26 (25%)	23 (18%)	0.19	
結腸	76 (75%)	103 (82%)		
過去のポリープ歴(n, %)				
管状	76 (75%)	99 (79%)	0.03 <sup>†</sup>	
腺腫状-NOS	6 (6%)	8 (6%)		
管状絨毛	10 (10%)	17 (13%)		
絨毛	7 (7%)	1 (1%)		
上皮内癌	3 (3%)	0 (0%)		
管状腺腫、高度異形成	0 (0%)	1 (1%)		
最大ポリープ≥1cm(n, %)	25 (25%)	40 (32%)	0.23	30
過去のポリープに対する治療(n, %)				
完全内視鏡切除	92 (90%)	117 (93%)	0.47	
外科手術	10 (10%)	9 (7%)		
ベースライン組織ポリアミン含量 <sup>§</sup> (中央値、nmol/mg タンパク質、範囲)				
プトレシン	0.47 (0.01-4.60)	0.56 (0.01-5.29)	0.48 <sup>†</sup>	
スペルミジン	1.99 (0.76-9.18)	2.17 (1.05-8.97)	0.08 <sup>†</sup>	
スペルミン	6.82 (2.29-19.86)	7.29 (2.72-22.85)	0.23 <sup>†</sup>	
スペルミジン:スペルミン比	0.30 (0.19-0.98)	0.31 (0.19-0.76)	0.23 <sup>†</sup>	

\*別段の断りがない限り $\chi^2$ 検定に対するp-値を挙げる。<sup>†</sup>ウイルクソン順位和検定に対するp-値<sup>‡</sup>フィッシャーの正確確率検定に対するp-値<sup>§</sup>ODC1 GG遺伝子型の対象1名及びODC1 AA/GA遺伝子型の対象1名に対する組織ポリアミンデータがない。

【表 3】

表2. ODC1遺伝子型に基づく結腸直腸癌症例に対する多変量の全生存期間及び結腸直腸癌特異的生存率解析

	ODC1 遺伝子型		P
	GG	GA/AA	
総死亡			
イベント数	47	62	
被リスク者数	208	192	
非調整HR(95%CI)	1 (基準値)	1.57 (1.07-2.29)	0.020
調整HR(95%CI)*	1 (基準値)	1.58 (1.07-2.34)	0.021
CRC 特異的死亡			
イベント数	22	37	
被リスク者数	208	192	
非調整HR(95%CI)	1 (基準値)	1.97 (1.16-3.34)	0.012
調整HR(95%CI)*	1 (基準値)	2.02 (1.17-3.50)	0.012

略語:95%CI、95%信頼区間

\*ステージ (I、II、III) に対する層別化及び年齢 (y)、性別、民族、結腸直腸癌家族歴、診断時TNMステージ、結腸直腸内の腫瘍部位、組織学的サブタイプ、外科手術、放射線療法及び化学療法による治療に対する調整を含む。

【表 4】

表3. ランダム化後のイベント発生率及びODC1遺伝子型による層別化 (優性モデル)

	プラセボ (n=111)		エフロルニチン/スリンダク (n=117)		P*
	ODC1 GG	ODC1 GA 又は AA	ODC1 GG	ODC1 GA 又は AA	
何らかの腺腫再発	22/44 (50)	18/53 (34)	7/64 (11)	9/42 (21)	<0.0001
何らかの有害事象 有害事象があった患者数(%)					
心血管イベント † 患者数(%)	8/55 (15)	8/56 (14)	13/71 (18)	9/46 (20)	0.30
消化器イベント ‡ 患者数(%)	4/55 (7)	8/56 (14)	9/71 (13)	7/46 (15)	0.54
≥2 の周波数での少なくとも 15dB の難聴 患者数(%)	10/44 (23)	9/52 (17)	14/63 (22)	11/41 (27)	0.26

\*共変量として年齢、性別、人種/民族、アスピリン使用、治療、遺伝子型ならびに治療及び遺伝子型の相互作用を含む完全モデルでの腺腫再発における治療効果 (エフロルニチン及びスリンダク対プラセボ) に対する尤度比検定に対するP-値。腺腫再発に対する完全モデルにおいて統計学的に有意な相互作用が検出され (P=0.038)、心血管毒性、消化器毒性又は聴器毒性については相互作用が検出されなかった。

†心血管イベントには、冠動脈疾患、心筋梗塞、脳血管障害、うつ血性心不全及び胸痛が含まれた。

‡消化器イベントには、消化管出血 (任意の領域より)、例えば直腸出血、上位胃腸出血、血便又は便中潜血が含まれた。

【表 5】

表4. 有効性及び有害事象及びODCI+316 SNP

	プラセボ (n=111)			エフロルニチン/スリンダク (n=117)			P
	ODCI GG (N=55)	ODCI GA (N=48)	ODCI AA (N=8)	ODCI GG (N=71)	ODCI GA (N=39)	ODCI AA (N=7)	
何らかの腺腫再発(%)	22/44(50)	(35)	(29)	7/64(11)	(14)	(57)	<0.0001
心血管イベント患者数(%) <sup>a</sup>	8/55(15)	7/48(15)	1/8(3)	13/71(18)	7/39(18)	2/7(29)	0.37
消化器イベント患者数(%) <sup>b</sup>	4/55(7)	8/48(17)	0/8(0)	9/71(13)	5/39(13)	2/7(29)	0.45
≥2 の周波数での少なくとも 15dB の難聴患者数(%) <sup>c</sup>	10/44(23)	9/45(20)	0/8(0)	14/63(22)	7/34(21)	4/7(57)	0.020

【表 6】

表5. ベースライン時の試験集団の特徴及び t 検定\*

	ベースライン n=222	試験終了時 n=188	
平均年齢 (歳、w/範囲)	60 (47-75)	60 (47-75)	
性別			
男性	164 (74%)	141 (75%)	
女性	58 (26%)	47 (25%)	
民族			10
白人	192 (86%)	160 (85%)	
ヒスパニック系	12 (5%)	12 (6%)	
黒人	8 (4%)	6 (3%)	
アジア系	7 (3%)	7 (4%)	
その他	3 (2%)	3 (2%)	
アスピリン使用			
はい	93 (42%)	73 (39%)	
いいえ	129 (58%)	115 (61%)	
ポリープ数			20
1	93 (42%)	81 (43%)	
2 から 3	80 (36%)	68 (36%)	
>3	46 (21%)	39 (21%)	
ポリープサイズ			
<5mm	69 (31%)	55 (29%)	
5-9mm	85 (38%)	75 (40%)	
10-15mm	47 (21%)	40 (21%)	
>15mm	21 (10%)	18 (10%)	
ポリープ部位			30
直腸	43 (19%)	37 (20%)	
左結腸	87 (39%)	75 (40%)	
横行結腸	31 (14%)	25 (13%)	
右結腸	35 (16%)	30 (16%)	
盲腸	26 (12%)	21 (11%)	
ポリープ組織学			
管状	170 (77%)	143 (76%)	
管状絨毛	30 (13%)	25 (13%)	
絨毛	6 (3%)	6 (3%)	
上皮内癌	2 (<1%)	2 (1%)	
高度異形成	1 (<1%)	1 (<1%)	
未分類/未重	13 (6%)	11 (6%)	

\*値は、カテゴリー変数に対して数及び列内パーセンテージ、連続変数に対して平均（範囲）である。

【表 7】

表6. 食事性ポリアミン群によるベースライン時の膵腫の特徴 (n=222)

	低食事性ポリアミン群 n=167	最大食事性ポリアミン群 n=55	P*
平均数	2.61 (±2.32SD)	2.41 (±1.90SD)	0.98
位置			
右側(n=92)	38.9%	51%	0.20
左側(n=130)	61.1%	49%	
大きい膵腫 (≥1cm)	26.4%(n=44)	43.6%(n=24)	0.016
高悪性度膵腫	20.4%(n=34)	32.7%(n=18)	0.060
進行性膵腫	35.9%(n=60)	52.7%(n=29)	0.028

\*平均膵腫数の比較のために、ウィルコクソン順位和検定P値を報告し、それ以外のP値は独立性に対するカイ二乗検定を用いて報告する。

【表 8】

表7. 食事性ポリアミン群によるベースライン時の組織ポリアミンレベル

平均組織ポリアミン (nmol/mg)*	低食事性ポリアミン群 n=167	最大食事性ポリアミン群 n=55	P**
プトレッシン	0.65	0.63	0.60
スペルミジン	2.49	2.95	0.024
スペルミン	7.90	8.92	0.039
スペルミジン:スペルミ ン比	0.32	0.33	0.19

\*nmolポリアミン/mgタンパク質

\*\*ウィルコクソン順位和検定P値を報告する。

【表 9】

表8. ベースライン時の食事性ポリアミン群による、DFMO+スリンダク対プラセボで治療後の結腸直腸膵腫再発リスク\*

	低食事性ポリアミン (n=144)			最大食事性ポリアミン (n=44)		
	n	リスク比 (95%信頼区間)	P	n	リスク比 (95%信頼区間)	P
何らかの膵腫	45	0.19(0.09-0.40)	0.0001	9	1.04(0.32-3.36)	0.94
膵腫>1cm	10	0.11(0.01-0.88)	0.03	2	***	***
高悪性度膵腫	12	0.09(0.01-0.71)	0.02	1	***	***
進行性膵腫*	18	0.06(0.00-0.44)	0.005	3	***	***

\*対数二項分布回帰による相対リスク推定。尤度比検定P値を報告する。リスク比は、DFMO+スリンダク対プラセボ(参照群)での治療後の異時性膵腫のリスクを示す。リスク比は全てアスピリン摂取に対して調整している。

\*\*進行性膵腫は、大きい膵腫サイズ(>1cm)及び/又は絨毛組織学を含む変数である。

\*\*\*リスク推定を計算するには分析力が不十分。

## 【0185】

本明細書中で開示及び主張される方法は全て、本開示に照らして不用な実験を行うことなく、為され、実行され得る。好ましい実施態様に関して本発明の方法を説明してきたが、本発明の概念、精神及び範囲から逸脱することなく、本方法に対して及び本明細書中に記載の方法の段階において又は段階の順序において、変更が適用され得ることは当業者にとって明らかである。より具体的には、同じ又は同様の結果を達成しながら、化学的及び生理学的に関連するある一定の物質で本明細書中に記載の物質を置き換え得ることが明らかとなろう。当業者にとって明らかなこのような同様の代替物及び変形は全て、付属の特許請求の範囲により定義されるとおりの本発明の精神、範囲及び概念内に包含されるもの



とする。

【 0 1 8 6 】

参考文献

次の参考文献は、それらが、本明細書に記載のものに対する補足となる例示的な手法的又はその他の詳細を提供する程度に、具体的に参照により本明細書中に組み込まれる。

- 米国特許第 3 , 6 4 7 , 8 5 8 号  
 米国特許第 3 , 6 5 4 , 3 4 9 号  
 米国特許第 4 , 3 3 0 , 5 5 9 号  
 米国特許第 4 , 4 1 3 , 1 4 1 号  
 米国特許第 4 , 5 8 2 , 7 8 8 号 10  
 米国特許第 4 , 6 5 6 , 1 2 7 号  
 米国特許第 4 , 6 8 3 , 1 9 4 号  
 米国特許第 4 , 6 8 3 , 2 0 2 号  
 米国特許第 5 , 8 1 4 , 6 2 5 号  
 米国特許第 5 , 8 4 3 , 9 2 9 号  
 米国特許第 5 , 9 5 2 , 1 7 4 号  
 米国特許第 6 , 2 5 8 , 8 4 5 号  
 Alberts ̄、J . Cell . Biochem . Supp . , ( 2 2 ) : 1 8 - 2  
 3 , 1 9 9 5  
 AMA Drug Evaluations Annual , 1 8 1 4 - 1 8 1 5 , 1 20  
 9 9 4 .  
 Babbar ̄、Biochem . J . , 3 9 4 : 3 1 7 - 2 4 , 2 0 0 6 .  
 Babbar ̄、J . Biol . Chem . , 2 7 8 ( 4 8 ) : 4 7 7 6 2 - 4 7 7 7  
 5 , 2 0 0 3 .  
 Barry ̄、J . Natl . Cancer Inst . , 9 8 ( 2 0 ) : 1 4 9 4 -  
 5 0 0 , 2 0 0 6 .  
 Bedi ̄、Cancer Res . , 5 5 ( 9 ) : 1 8 1 1 - 1 8 1 6 , 1 9 9 5 .  
 Bellofernandez ̄、Proc . Natl . Acad . Sci . USA、  
 9 0 : 7 8 0 4 - 8 , 1 9 9 3 .  
 Bussey、Hepatology , 1 2 ( 1 ) : 1 7 5 - 6 . 1 9 9 0 30  
 Childs ̄、Cell . Molec . Life Sci . , 6 0 : 1 3 9 4 - 1 4  
 0 6 , 2 0 0 3 .  
 de Arruda ̄、Expert Rev . Mol . Diagn . , 2 ( 5 ) : 4  
 8 7 - 4 9 6 , 2 0 0 2 .  
 Derynck ̄、Nature Genetics , 2 9 : 1 1 7 - 2 9 , 2 0 0 1  
 .  
 DuBois ̄、Cancer Res . , 5 6 : 7 3 3 - 7 3 7 , 1 9 9 6 .  
 Erdman ̄、Carcinogenesis , 2 0 : 1 7 0 9 - 1 3 , 1 9 9 9 .  
 欧州出願第 2 0 1 , 1 8 4 号  
 欧州出願第 2 3 7 , 3 6 2 号 40  
 欧州出願第 2 5 8 , 0 1 7 号  
 欧州出願第 5 0 , 4 2 4 号  
 欧州出願第 8 4 , 7 9 6 号  
 仏国出願第 2 , 6 5 0 , 8 4 0 号  
 Fultz 及び Gerner , Mol . Carcinog . , 3 4 : 1 0 - 8 , 2 0 0  
 2 .  
 Gerner 及び Meyskens , Nature Rev . Cancer , 4 : 7 8  
 1 - 9 2 . , 2 0 0 4 .  
 Gerner ̄、Cancer Epidemiol . Biomarkers Prev  
 v . , 3 : 3 2 5 - 3 3 0 , 1 9 9 4 . 50

- Giardiello, Cancer Res., (57): 199 - 201, 1997.
- Guo, Cancer Res., 60(22): 6314 - 6317, 2000.
- Halushka, Nat. Genet., 22(3): 239 - 247, 1999.
- Hanif, Biochemical Pharmacology, (52): 237 - 245, 1996.
- Hubner, Clin. Cancer Res., 14(8): 2303 - 9, 2008.
- Ignatenko, Cancer Biol. Ther., 5(12): 1658 - 64, 2006. 10
- Inazuka, Genome Res, 7(11): 1094 - 1103, 1997.
- Iwamoto, Carcinogenesis, 21: 1935 - 40, 2000.
- Johnson, Nat. Genet., 29(2): 233 - 237, 2001.
- Ke 及び Cardon Bioinformatics, 19(2): 287 - 288, 2003.
- Keller 及び Giardiello, Cancer Biol. Ther., 2(4 Suppl 1): S140 - 9, 2003. 20
- Kingsnorth, Cancer Res., 43(9): 4035 - 8, 1983.
- Komher, Nucl. Acids. Res. 17: 7779 - 7784, 1989.
- Kuppuswamy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 1143 - 1147, 1991.
- Kwok 及び Chen, Curr Issues Mol. Biol, Apr; 5(2): 43 - 60, 2003.
- Kwok, Genomics, 23(1): 138 - 144, 1994.
- Kwok, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 2: 235 - 258, 2001. 30
- Kwok, Genomics, 31(1): 123 - 6, 1996.
- Ladenheim, Gastroenterology, 108: 1083 - 1087, 1995.
- Landegren, Science, 241: 1077 - 1080, 1988.
- Lanza, Arch. Intern. Med, 155: 1371 - 1377, 1995.
- Le, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 17: 1950 - 62, 2008.
- Lipkin, J Cell Biochem. Suppl, 28 - 29: 144 - 7, 1997. 40
- Lippman, Nat. Clin. Pract. Oncol, 3(10): 523, 2006.
- Love, J. Natl. Cancer Inst., 85: 732 - 7, 1993.
- Lu, Eukaryot Cell., 3(6): 1544 - 56, 2004.
- Luk 及び Baylin, N. Engl. J. Med., 311(2): 80 - 83, 1984.
- Lupulescu, Cancer Detect. Prev., 20(6): 634 - 637, 1996. 50

Martinezら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:7859-64, 2003.

Matsubaraら、Clinical Cancer Res., 1:665-71, 1995.

Maxamら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:560, 1977.

McLarenら、Cancer Prev. Res., 1(7):514-21, 2008.

Meyskensら、Cancer Prev. Res., 1(1):32-8, 2008.

Meyskensら、J. Natl. Cancer Inst., 86(15):1122-1130, 1994.

Meyskensら、J. Natl. Cancer Inst., 90(16):1212-8, 1998.

Mullisら、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273, 1986.

Muscatら、Cancer, 74:1847-1854, 1994.

Narisawaら、Cancer Res., 41(5):1954-1957, 1981.

Nickersonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:8923-8927, 1990.

Nyrenら、Anal. Biochem. 208:171-175, 1993.

O'Brienら、Molec. Carcinog., 41(2):120-3, 2004.

Pardali及びMoustakas, Biochimica et Biophysica Acta, 1775:21-62, 2007.

PCT出願第W091/02087号

PCT出願第W092/15712号

Peelら、J. Natl. Cancer Inst., 92:1517-22, 2000.

Pegg, Biochem., 234(2):249-262, 1986.

Physician's Desk Reference, Medical Economics Data, Montville, N.J., 1745-1747, 1999

Piazzaら、Cancer Res., (55):3113-116, 1995.

Piazzaら、Cancer Res., (57):2452-2459, 1997a.

Piazzaら、Cancer Res., (57):2909-2915, 1997b.

Pollard及びLuckert, Cancer Res., 49:6471-6473, 1989.

Prezantら、Hum. Mutat., 1:159-164, 1992.

Psaty及びPotter, N. Engl. J. Med., 355(9):950-2, 2006.

Raoら、Cancer Res., (55):1464-1472, 1995.

Reddyら、Cancer Res., (50):2562-2568, 1990.

Reddyら、Cancer Res., 47:5340-5346, 1987.

Riceら、Mol Cancer Ther., 2(9):885-92, 2003.

Roberts及びWakefield, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:8621-3, 2003.

10

20

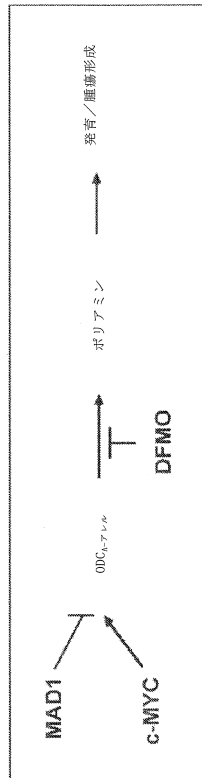
30

40

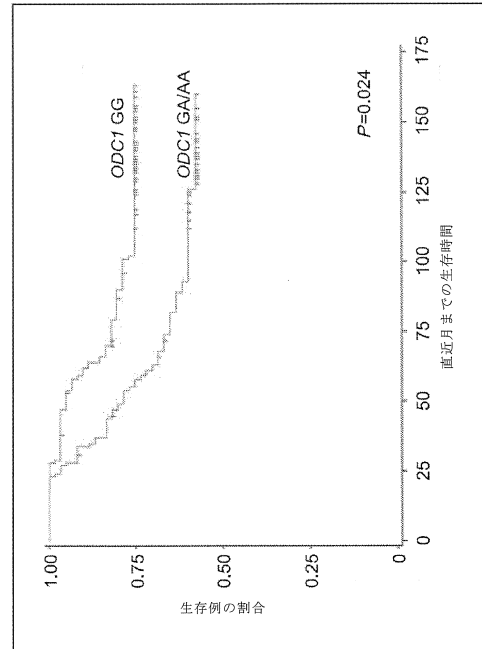
50

- Sanger R、J. Molec. Biol, 94: 441, 1975.
- Seiler 及び Knodgen, J. Chromatogr., 221(2): 227-235, 1980.
- Simoneau R、Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 17: 292-9, 2008.
- Simoneau R、J. Natl. Cancer Inst., 93: 57-9, 2001.
- Singh 及び Reddy, Annals. NY Acad. Sci, (768): 205-209, 1995.
- Singh R、Carcinogenesis, (15): 1317-1323, 1994. 10
- Small R、N. Engl. J. Med, 347: 1135-1142, 2002.
- Sokolov, Nucl. Acids Res. 18: 3671, 1990.
- Stevens R、Biotechniques, 34: 198-203, 2003.
- Strejan R、Cell Immunol., 84(1): 171-184, 1984.
- Su R、Science, (256): 668-670, 1992.
- Syvanen R、Genomics 8: 684-692, 1990.
- Taillon-Miller R、Genome Res, 8(7): 748-754, 1998. 20
- Tempera R、Cancer Res., 49(21): 5793-7, 1989.
- Thomas 及び Thomas, J. Cell Mol. Med., 7: 113-26, 2003.
- Thompson R、J. Natl. Cancer Inst., (87): 125-1260, 1995.
- Ugozzoli R、GATA 9: 107-112, 1992.
- Vane 及び Bottling, Adv Exp Med Biol., 433: 131-8, 1997.
- Visvanathan R、J. Urol., 171(2 Pt 1): 652-5, 2004. 30
- Wallace, Eur. J. Clin. Invest., 30: 1-3, 2000.
- Zell R、Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 17: 3134-40, 2008.
- Zell R、Cancer Prev. Res., 2(3): 209-12, 2009.
- Zell R、Clin. Cancer Res., 15(19): 6208-16, 2009.
- Zell R、Intl. J. Cancer, 120: 459-68, 2007.
- Ziogas 及び Anton-Culver, Am. J. Prev. Med., 24: 190-8, 2003. 40

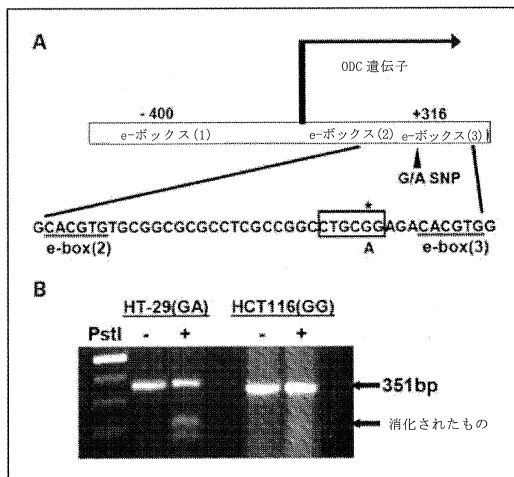
【図 1】



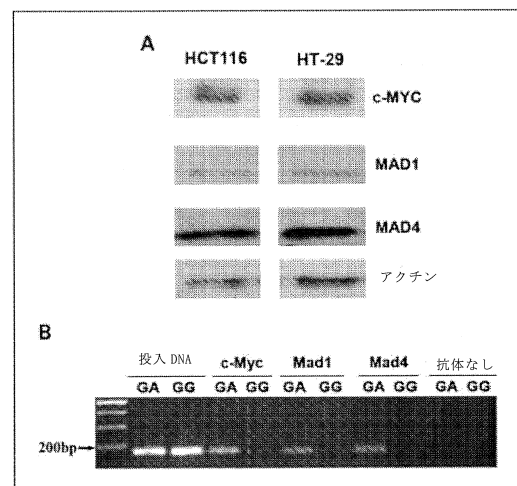
【図 2】



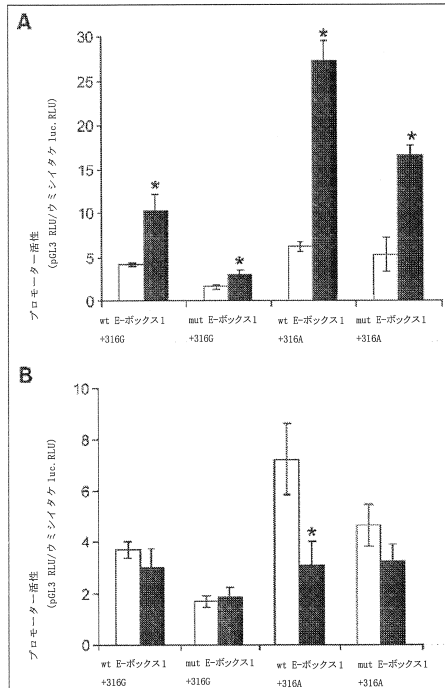
【図 3】



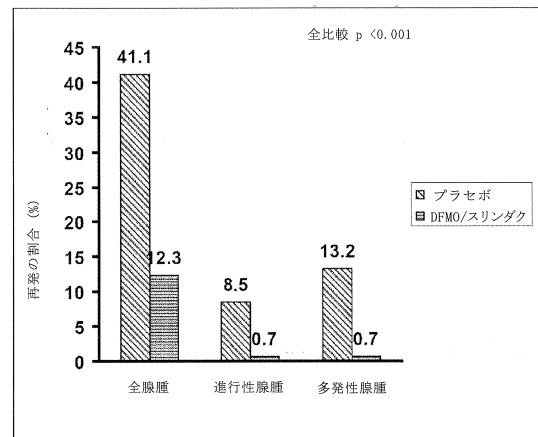
【図 4】



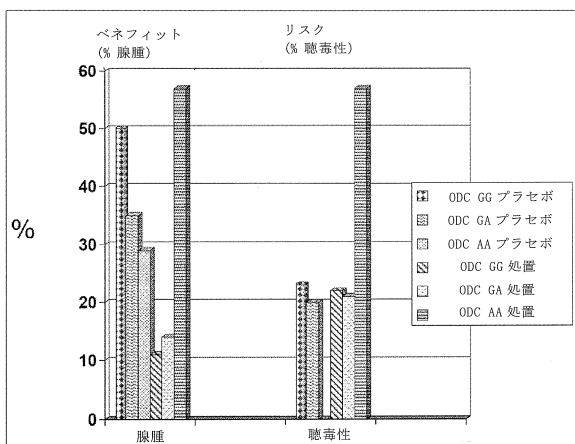
【図 5】



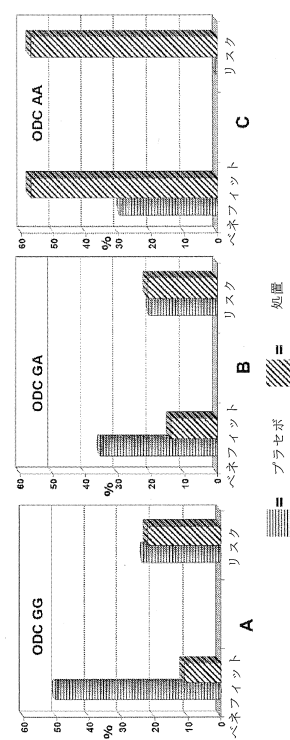
【図 6】



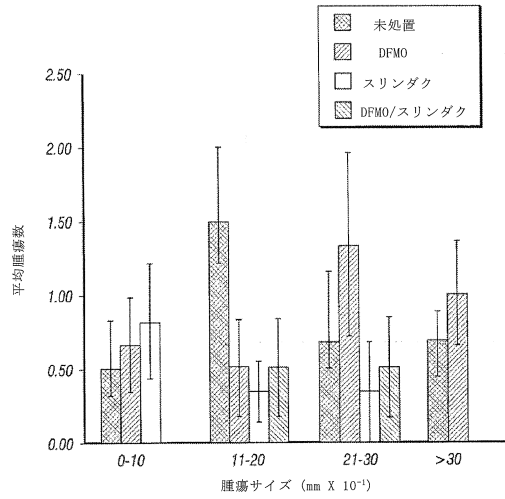
【図 7】



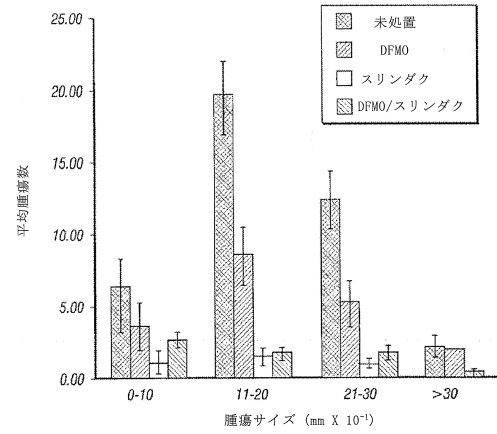
【図 8】



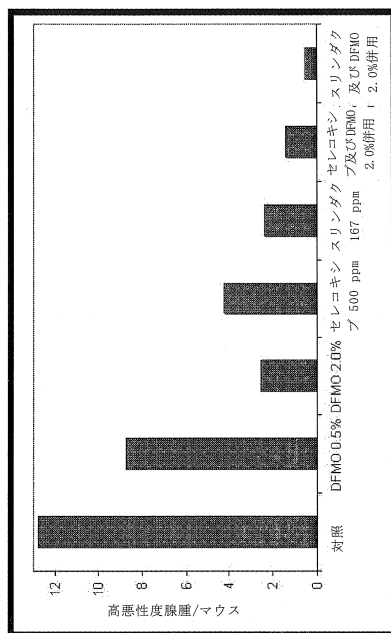
【図 9】



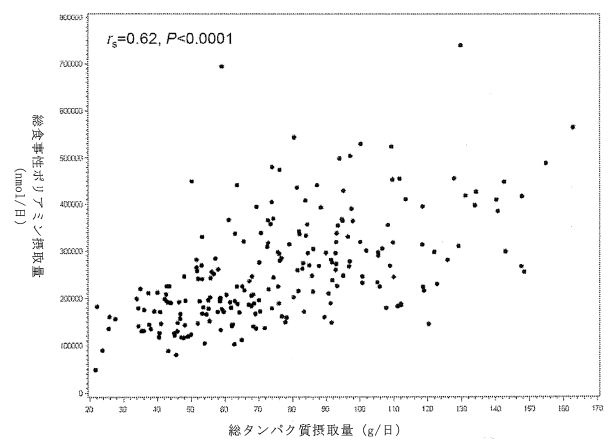
【図 10】



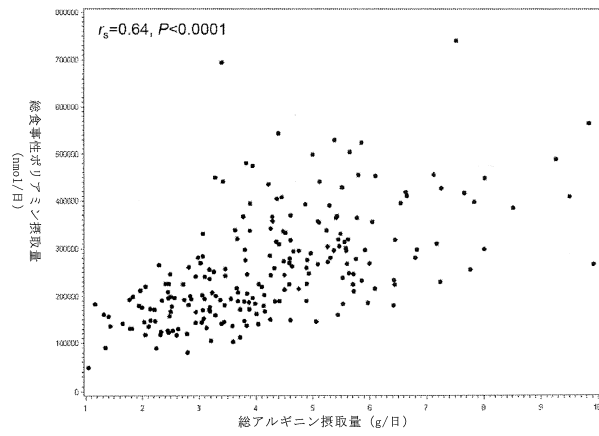
【図 11】



【図 12】



【図 13】





## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)		C 1 2 Q 1/02	Z N A
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	B
G 0 1 N 33/02 (2006.01)		G 0 1 N 33/02	

(73)特許権者 511274363

ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア, ア カリフォルニア コ  
ーポレーション  
アメリカ合衆国, 9 4 6 0 7 カリフォルニア州, オークランド, フランクリン ストリート 1  
1 1 1, 1 2 階

(73)特許権者 512293253

キャンサー プリベンション 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, アリゾナ州 8 5 7 1 8, トゥーソン, スイート 2 5 0, 1 7 6 0 イー . リ  
バー ロード

(74)代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(72)発明者 ラジ, カヴィサ, ピー .

(72)発明者 ゼル, ジェイソン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 8 6 8, オレンジ, ザ シティ ドライブ サウス 1  
0 1, ユニバーシティ オブ カリフォルニア アーバイン メディカル センター, ディビジョ  
ン オブ ヘマトロジー / オンコロジー

(72)発明者 マクラレン, クリスティン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 6 9 7 - 7 5 5 0, アーバイン, アーバイン ホール  
2 2 4, ユニバーシティ オブ カリフォルニア, アーバイン, エピデミオロジー デパートメン  
ト

(72)発明者 ガーナー, ユージーン, ダブリュー

アメリカ合衆国, アリゾナ州 8 5 7 0 4 - 1 7 1 8, トゥーソン, ウェスト サンセット ロ  
ード 1 7 8 0

(72)発明者 メイスケンス, フランク, エル

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 6 0 3, アーバイン, モーニング ブリーズ 3 0

(72)発明者 ジェイコブ, ジェフリー

アメリカ合衆国, アリゾナ州 8 5 7 1 8, トゥーソン, スイート 2 5 0, 1 7 6 0 イー . リ  
バー ロード, キャンサー プリベンション ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 特表 2 0 0 2 - 5 0 9 8 8 4 ( J P , A )

特表 2 0 1 2 - 5 2 6 8 5 2 ( J P , A )

Upal K.Basuroy et al, J. Biochem., 2 0 0 6 年, vol.139, no.1, p.27-33

Gerner, E. W., Biochem. Soc. Trans., 2007, vol.35, no.2, p.322-325

Smithson, D. C. et al., J. Biol. Chem., 2010, vol.285, no.22, p.16771-16781, Epub 2010  
Mar 10

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 4 5 / 0 0 - 4 5 / 0 8

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 3 / 4 4

C12Q 1/00 - 1/70

G01N 33/02 - 33/98

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)