



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102483415 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 09

(21) 申请号 201080031983. 5

(22) 申请日 2010. 05. 14

(30) 优先权数据

61/216, 216 2009. 05. 14 US

61/217, 682 2009. 06. 03 US

61/217, 679 2009. 06. 03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 01. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/034974 2010. 05. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/132817 EN 2010. 11. 18

(73) 专利权人 代表亚利桑那大学的亚利桑那校
董会

地址 美国亚利桑那州

专利权人 加利福尼亚大学董事会, 加利福尼
亚法人

(72) 发明人 尤金·格尔纳 J·泽尔

C·麦克拉伦 F·麦斯金斯

H·安东卡尔弗 P·A·汤普森

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262

代理人 陈建芳 阎斌斌

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1346282 A, 2002. 04. 24,

W0 9949859 A1, 1999. 10. 07,

Anne R. Simoneau 等. The effect of
difluoromethylornithine on decreasing

prostate size and polyamines in men:

results of a year-long phase IIb randomized
placebo-controlled chemoprevention trial..

《Cancer Epidemiol Biomarkers Prev》. 2008, 第
17 卷

Elizabeth L. R. Barry 等. Ornithine
decarboxylase polymorphism modification
of response to aspirin treatment for
colorectal adenoma prevention.. 《J Natl
Cancer Inst》. 2006, 第 98 卷

Eugene W. Gerner, Frank L. Meyskens.
Combination Chemoprevention for colon
cancer targeting polyamine synthesis and
inflammation.. 《Clin Cancer Res》. 2009, 第 15
卷

J. A. Zell 等. 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》. 2008, 第 26 卷 (第 15S 期),

Jason A. Zell 等. Risk of
cardiovascular events in a randomized
placebo-controlled, double-blind trial of
difluoromethylornithine plus sulindac
for the prevention of spordic colorectal
adenomas.. 《Cancer Prev Res》. 2009, 第 2 卷
Maria Elena Martinez 等. Pronounced

(续)

审查员 毕秀华

权利要求书4页 说明书43页

序列表2页 附图11页

(54) 发明名称

基于 ODC1 基因型的癌诊断与治疗

(57) 摘要

本发明提供方法和试剂盒, 用于 a) 预测结直
肠癌患者存活, 以及具有其它侵入性癌症的患
者的存活, 在所述癌症中细胞增殖和癌发生与高水

平 ODC 活性和增加的细胞多胺含量部分地关联,
和 b) 用于基于等位基因核苷酸序列或者 ODC1 启
动子基因+316 位置上的 SNP 选择对于此类患者的
相应治疗选项, 以及每一病例中的癌症治疗方法,
这包括确定 ODC1 启动子+316 位置上的基因型, 作
为工具指导治疗选择。

[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

reduction in adenoma recurrence associated with aspirin use and a polymorphism in the ornithine decarboxylase gene..《PNAS》.2003, 第 100 卷 (第 13 期),

Richard A. Hubner 等.Ornithine decarboxylase G316A genotype is prognostic for colorectal adenoma recurrence and predicts efficacy of aspirin chemoprevention..《Clin Cancer Res》.2008,

第 14 卷

Upal K. Basuroy, Eugene W. Gerner. Emerging Concepts in targeting the polyamine metabolic pathway in epithelia cancer chemoprevention and chemotherapy..《J Biochem》.2006, 第 139 卷

Yongjun Guo 等.Functional analysis of human ornithine decarboxylase alleles..《Cancer Res》.2000, 第 60 卷

1. (i) α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 和 (ii) 舒林酸在制备用于预防性治疗患者中结直肠腺瘤的低毒性药物中的用途, 其中从确定所述患者的至少一个 ODC1 基因启动子等位基因 +316 位置上的基因型的测试中得到的结果表明所述患者的 ODC1 基因启动子的至少一个等位基因 +316 位置上的基因型是 G。

2. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中所述结果通过接收包含所述基因型的报告或者获取显示所述结果的患者病史得到。

3. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中所述测试确定所述患者 ODC1 基因启动子的一个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。

4. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中所述测试确定所述患者 ODC1 基因启动子的两个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。

5. 根据权利要求 4 所述的用途, 其中所述结果表明所述患者 ODC1 基因启动子的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GG。

6. 根据权利要求 4 所述的用途, 其中所述结果表明所述患者 ODC1 基因启动子的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GA。

7. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中如果在得到所述测试结果之前, 所述患者正在用 DFMO 或舒林酸但以较低的剂量进行治疗, 则所述治疗还包含增加 DFMO 或舒林酸的剂量。

8. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中如果在得到所述测试结果之前, 所述患者正在用 DFMO 和舒林酸但以较低的剂量进行治疗, 则所述治疗还包含增加 DFMO 和舒林酸的剂量。

9. (i) α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 和 (ii) 舒林酸在制备用于治疗患者中结直肠癌风险因素的低毒性药物中的用途, 其中从确定所述患者的至少一个 ODC1 基因启动子等位基因 +316 位置上的基因型的测试中得到的结果表明所述患者的 ODC1 基因启动子的至少一个等位基因 +316 位置上的基因型是 G, 其中所述治疗预防所述患者内新的变异结肠腺窝病灶、新的腺瘤性息肉或者新的发育异常腺瘤的形成。

10. 根据权利要求 9 所述的用途, 其中所述治疗预防所述患者中新的变异结肠腺窝病灶的形成。

11. 根据权利要求 9 所述的用途, 其中所述治疗预防所述患者中新的腺瘤性息肉的形成。

12. 根据权利要求 9 所述的用途, 其中所述治疗预防所述患者中新的发育异常腺瘤的形成。

13. 根据权利要求 9 所述的用途, 其中所述结果通过接收包含所述基因型的报告或者获取显示所述结果的患者病史得到。

14. 根据权利要求 9 所述的用途, 其中所述测试确定所述患者 ODC1 基因启动子的一个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。

15. 根据权利要求 9 所述的用途, 其中所述测试确定所述患者 ODC1 基因启动子的两个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。

16. 根据权利要求 15 所述的用途, 其中所述结果表明所述患者 ODC1 基因启动子的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GG。

17. 根据权利要求 15 所述的用途, 其中所述结果表明所述患者 ODC1 基因启动子的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GA。

18. 根据权利要求 9 所述的用途,其中如果在得到所述测试结果之前,所述患者正在用 DFMO 或舒林酸但以较低的剂量进行治疗,则所述治疗还包含增加 DFMO 或舒林酸的剂量。

19. 根据权利要求 9 所述的用途,其中如果在得到所述测试结果之前,所述患者正在用 DFMO 和舒林酸但以较低的剂量进行治疗,则所述治疗还包含增加 DFMO 和舒林酸的剂量。

20. 用于从确定患者的至少一个 ODC1 基因启动子等位基因 +316 位置上的基因型的测试中得到结果的试剂在制备用于评价所述患者对预防性治疗结直肠腺瘤的适合性的药物中的用途,

其中如果所述结果表明所述患者的 ODC1 基因启动子的至少一个等位基因 +316 位置上的基因型是 G,则所述患者被鉴定为适合通过低毒性药物疗法进行治疗,所述疗法包含组合有效量的 DFMO 和舒林酸。

21. 根据权利要求 20 所述的用途,其中所述结果通过接收包含所述基因型的报告或者获取显示所述结果的患者病史得到。

22. 根据权利要求 20 所述的用途,其中所述测试确定所述患者 ODC1 基因启动子的一个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。

23. 根据权利要求 20 所述的用途,其中所述测试确定所述患者 ODC1 基因启动子的两个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。

24. 根据权利要求 23 所述的用途,其中所述结果表明所述患者 ODC1 基因启动子的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GG。

25. 根据权利要求 23 所述的用途,其中所述结果表明所述患者 ODC1 基因启动子的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GA。

26. 根据权利要求 20 所述的用途,其中如果在得到所述测试结果之前,所述患者正在用 DFMO 或舒林酸但以较低的剂量进行治疗,则所述药物疗法还包含增加 DFMO 或舒林酸的剂量。

27. 根据权利要求 20 所述的用途,其中如果在得到所述测试结果之前,所述患者正在用 DFMO 和舒林酸但以较低的剂量进行治疗,则所述药物疗法还包含增加 DFMO 和舒林酸的剂量。

28. (i) α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 和 (ii) 舒林酸在制备用于预防处于风险中的患者中结直肠腺瘤发展或复发的低毒性药物中的用途,

其中从确定所述患者的至少一个 ODC1 基因启动子等位基因 +316 位置上的基因型的测试中得到的结果表明所述患者的 ODC1 基因启动子的至少一个等位基因 +316 位置上的基因型是 G。

29. 根据权利要求 28 所述的用途,其中所述结果通过接收包含所述基因型的报告或者获取显示所述结果的患者病史得到。

30. 根据权利要求 28 所述的用途,其中所述测试确定所述患者 ODC1 基因启动子的一个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。

31. 根据权利要求 28 所述的用途,其中所述测试确定所述患者 ODC1 基因启动子的两个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。

32. 根据权利要求 31 所述的用途,其中所述结果表明所述患者 ODC1 基因启动子的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GG。

33. 根据权利要求 31 所述的用途,其中所述结果表明所述患者 ODC1 基因启动子的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GA。

34. (i) α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 和 (ii) 舒林酸在制备用于治疗处于结直肠腺瘤发展或复发风险的患者的低毒性药物中的用途,其中所述患者已经被鉴定为至少一个 ODC1 基因启动子等位基因 +316 位置上具有 G。

35. 根据权利要求 34 所述的用途,其中在所述患者的 ODC1 基因启动子的两个等位基因 +316 位置上鉴定的基因型是 GG。

36. 权利要求 34 的用途,其中在所述患者的 ODC1 基因启动子的两个等位基因 +316 位置上鉴定的基因型是 GA。

37. 根据权利要求 1-26 任一项所述的用途,其中所述药物全身性施用。

38. 根据权利要求 1-26 任一项所述的用途,其中 DFMO 和舒林酸通过不同的途径施用。

39. 根据权利要求 1-26 任一项所述的用途,其中所述 DFMO 或舒林酸经口、动脉内或静脉内施用。

40. 根据权利要求 39 所述的用途,其中所述 DFMO 经口施用。

41. 根据权利要求 40 所述的用途,其中所述有效量的 DFMO 是 500mg/ 天。

42. 根据权利要求 39 所述的用途,其中所述 DFMO 静脉内施用。

43. 根据权利要求 42 所述的用途,其中所述有效量的 DFMO 是从大约 0.05 至大约 5.0g/m²/ 天。

44. 根据权利要求 39 所述的用途,其中所述 DFMO 和舒林酸被配制成为用于口服施用。

45. 根据权利要求 44 所述的用途,其中所述 DFMO 和舒林酸被配制成为硬或软胶囊或者片剂。

46. 根据权利要求 1-26 任一项所述的用途,其中所述 DFMO 和舒林酸每 12 小时施用一次。

47. 根据权利要求 1-26 任一项所述的用途,其中所述 DFMO 和舒林酸每 24 小时施用一次。

48. 根据权利要求 1-26 任一项所述的用途,其中所述有效量的舒林酸是从大约 10 至大约 1500mg/ 天。

49. 根据权利要求 48 所述的用途,其中所述有效量的舒林酸是从大约 10 至大约 400mg/ 天。

50. 根据权利要求 48 所述的用途,其中所述有效量的舒林酸是 150mg/ 天。

51. 根据权利要求 1-26 任一项所述的用途,其中 DFMO 在舒林酸之前施用。

52. 根据权利要求 1-26 任一项所述的用途,其中 DFMO 在舒林酸之后施用。

53. 根据权利要求 1-26 任一项所述的用途,其中 DFMO 在舒林酸之前和之后施用。

54. 根据权利要求 1-26 任一项所述的用途,其中 DFMO 与舒林酸并行施用。

55. 根据权利要求 1-26 任一项所述的用途,其中 DFMO 施用至少两次。

56. 根据权利要求 1-26 任一项所述的用途,其中舒林酸施用至少两次。

57. 根据权利要求 1-19 和 28-36 任意一项所述的用途,其中所述治疗预防所述患者中结直肠癌的形成。

58. 根据权利要求 1-19 和 28-36 任意一项所述的用途,其中所述治疗预防所述患者中

的耳毒性或其风险。

59. 根据权利要求 1-19 和 28-36 任意一项所述的用途,其中所述患者已经被鉴定为在结肠、直肠或盲肠中具有一个或多个腺瘤性息肉。

60. 根据权利要求 1-19 和 28-36 任意一项所述的用途,其中所述患者已经被诊断为具有家族性腺瘤性息肉病。

61. 根据权利要求 1-19 和 28-36 任意一项所述的用途,其中所述患者具有一个或多个结直肠腺瘤切除史。

62. 根据权利要求 1-19 和 28-36 任意一项所述的用途,其中所述患者是人。

基于 ODC1 基因型的癌诊断与治疗

[0001] 本申请要求于 2009 年 6 月 3 日提出的美国临时申请号 61/217682, 于 2009 年 6 月 3 日提出的美国临时申请号 61/217, 679 和于 2009 年 5 月 14 日提出的美国临时申请号 61/216, 216 的优先权, 每一文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0002] 本发明是在来自国立健康研究院 (the National Institute of Health) 的基金 CA72008 (EWG)、CA78134 (HAC)、CA78285 (HAC) 和 CA95060 (EWG), 来自国立癌症研究所 (the National Cancer Institute) 的合同 N01-PC-35136、N01-PC-35139 和 N01-PC-54404 以及来自疾病控制与预防中心 (the Centers for Disease Control and Prevention) 的协议 1U58DP00807-01 的政府支持下做出的。政府享有本发明中的某些权利。

技术领域

[0003] 本发明一般涉及癌症生物学和医学领域。更加具体而言, 其涉及用于诊断、预防和治疗癌及其风险因素的方法。

背景技术

[0004] 将癌症化学预防研究转化成临床实践的主要障碍是边缘试剂功效和超过获益的毒性 (Psaty 和 Potter, 2006 ;Lippman, 2006)。例如, 最近证明在结直肠腺瘤 (CRA) 患者当中进行长期的每日口服 D, L- α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO, 依氟鸟氨酸 (eflornithine)) 和舒林酸 (sulindac) 的多胺-抑制性组合具有明显的功效 (Meyskens 等人, 2008), 然而, 治疗伴随有适度的亚临床耳毒性 (McLaren 等人, 2008), 并且在具有高基线心血管风险的患者中出现更大数量的心血管事件 (Zell 等人, 2009)。对辨别患者对特定预防性或治疗性治疗方案的适合性的遗传特征的鉴定将具有较大益处。

[0005] 例如, 仍然需要用于治疗 and 预防结直肠癌和其它癌的有效且毒性小的方法。根据国立癌症研究所的估计, 2009 年美国大约有 147, 000 个新发病例并且 50, 000 人死于结直肠癌。当前的治疗方案, 特别是用于结肠癌和息肉的那些治疗方案包括肿瘤切除术、化学疗法和放射疗法。人 ODC1 基因内含子 -1 中的单核苷酸多态性 (SNP) 影响 ODC1 转录 (Guo 等人, 2000), 并且已经作为结直肠腺瘤 (CRA) 风险的遗传标记进行了研究 (Martinez 等人, 2003 ;Barry 等人, 2006 ;Hubner 等人, 2008)。所报导的次要 A- 等位基因频率为大约 25% 并且尽管在人种 / 种族之间存在差异, 但是在每一人种内 ODC1 基因型分布处于哈代-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium) 中 (O'Brien 等人, 2004 ;Zell 等人, 2009)。与具有主要 G- 等位基因的个体相比, ODC1 次要 A- 等位基因纯合个体的腺瘤复发风险降低 (Martinez 等人, 2003 ;Hubner 等人, 2008)。此外, ODC1A- 等位基因 (AA 或 GA 基因型, 但不是 GG 基因型) 和所报导的阿司匹林使用已经与降低的结肠息肉复发相关 (Martinez 等人, 2003 ;Barry 等人, 2006 ;Hubner 等人, 2008), 并且在统计学意义上降低晚期腺瘤风险达 50% (Barry 等人, 2006)。ODC1 基因型是否差异性地影响腺瘤复发、组织多胺反应、毒性特性以及它是如何用于确定预防性和治疗性治疗的适合性的将具有较大的优势。

发明内容

[0006] 因此,根据本发明,提供治疗、预防和 / 或诊断方法,涉及鉴定患者的至少一个 ODC1 启动子基因等位基因 +316 位置上的基因型。

[0007] 在一个方面中,提供了用于预防性或治疗性治疗患者中癌的方法,包含:

[0008] a) 从确定患者的至少一个 ODC1 启动子基因等位基因 +316 位置上的基因型的测试中得到结果;和

[0009] b) 如果结果表明患者的 ODC1 启动子基因的至少一个等位基因 +316 位置上的基因型是 G,则向患者施用有效量的包含下列的药物疗法:

[0010] (i) 抑制患者内鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 的第一试剂;和

[0011] (ii) 当与第一试剂组合时调节多胺途径以减少患者内总体多胺含量的第二试剂。

[0012] 在一些实施方案中,第二试剂还提高患者内亚精胺 / 精胺 N¹- 乙酰转移酶的表达。在一些实施方案中,结果通过接收包含所述基因型的报告或者获取显示结果的患者病史得到。在一些实施方案中,测试确定患者 ODC1 启动子基因的一个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。在一些实施方案中,测试确定患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。在一些实施方案中,结果表明患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GG。在一些实施方案中,结果表明患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GA。

[0013] 在一些实施方案中,如果在得到测试结果之前,患者正在用药物疗法但以较低的剂量进行治疗,则药物疗法还包含增加第一试剂或第二试剂的剂量。在一些实施方案中,如果在得到测试结果之前,患者正在用药物疗法但以较低的剂量进行治疗,则药物疗法还包含增加第一试剂和第二试剂的剂量。在一些实施方案中,第一试剂是 α - 二氟甲基鸟氨酸 (DFMO)。在一些实施方案中,第二试剂是包含非类固醇抗炎药 (NSAID) 的非阿司匹林。在一些实施方案中,包含 NSAID 的非阿司匹林是选择性 COX-2 抑制剂。在一些实施方案中,包含 NSAID 的非阿司匹林是舒林酸或塞来昔布 (celecoxib)。在一些实施方案中,包含 NSAID 的非阿司匹林是舒林酸。

[0014] 在另一方面中,提供了治疗患者中结直肠癌风险因素的方法,包含:

[0015] a) 从确定患者的至少一个 ODC1 启动子基因等位基因 +316 位置上的基因型的测试中得到结果;和

[0016] b) 如果结果表明患者的 ODC1 启动子基因的至少一个等位基因 +316 位置上的基因型是 G,则向患者施用有效量的包含下列的药物疗法:

[0017] (i) 抑制患者内鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 的第一试剂;和

[0018] (ii) 当与第一试剂组合时调节多胺途径以减少患者内总体多胺含量的第二试剂,

[0019] 其中所述方法预防患者内新的变异结肠腺窝病灶、新的腺瘤性息肉或者新的发育异常腺瘤的形成。

[0020] 在一些实施方案中,第二试剂也增加患者内亚精胺 / 精胺 N¹- 乙酰转移酶的表达。在一些实施方案中,方法预防患者中新的变异结肠腺窝病灶的形成。在一些实施方案中,方法预防患者中新的腺瘤性息肉的形成。在一些实施方案中,方法预防患者中新的发育异常腺瘤的形成。在一些实施方案中,结果通过接收包含所述基因型的报告或者获取显示结果的患者病史得到。在一些实施方案中,测试确定患者 ODC1 启动子基因的一个等位基因 +316

位置上的核苷酸碱基。在一些实施方案中,测试确定患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。在一些实施方案中,结果表明患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GG。在一些实施方案中,结果表明患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GA。

[0021] 在一些实施方案中,如果在得到测试结果之前,患者正在用药物疗法但以较低的剂量进行治疗,则药物疗法还包含增加第一试剂或第二试剂的剂量。在一些实施方案中,如果在得到测试结果之前,患者正在用药物疗法但以较低的剂量进行治疗,则药物疗法还包含增加第一试剂和第二试剂的剂量。在一些实施方案中,第一试剂是 α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO)。在一些实施方案中,第二试剂是包含非类固醇抗炎药 (NSAID) 的非阿司匹林。在一些实施方案中,包含 NSAID 的非阿司匹林是选择性 COX-2 抑制剂。在一些实施方案中,包含 NSAID 的非阿司匹林是舒林酸或塞来昔布。在一些实施方案中,包含 NSAID 的非阿司匹林是舒林酸。

[0022] 在另一方面中,提供了用于评价患者对预防性或治疗性治疗癌的适合性的方法,包含:

[0023] a) 从确定患者的至少一个 ODC1 启动子基因等位基因 +316 位置上的基因型的测试中得到结果;和

[0024] b) 如果结果表明患者的 ODC1 启动子基因的至少一个等位基因 +316 位置上的基因型是 G,则鉴定为患者适合通过药物疗法进行治疗,所述疗法包含组合有效量的抑制患者内鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 的第一试剂;和当与第一试剂组合时调节多胺途径以减少患者内总体多胺含量的第二试剂。

[0025] 在一些实施方案中,第二试剂还增加患者中亚精胺 / 精胺 N^1 -乙酰转移酶的表达。在一些实施方案中,结果通过接收包含所述基因型的报告或者获取显示结果的患者病史得到。在一些实施方案中,测试确定患者 ODC1 启动子基因的一个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。在一些实施方案中,测试确定患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。在一些实施方案中,结果表明患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GG。在一些实施方案中,结果表明患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GA。在一些实施方案中,如果在得到测试结果之前,患者正在用药物疗法但以较低的剂量进行治疗,则药物疗法还包含增加第一试剂或第二试剂的剂量。

[0026] 在一些实施方案中,如果在得到测试结果之前,患者正在用药物疗法但以较低的剂量进行治疗,则药物疗法还包含增加第一试剂和第二试剂的剂量。在一些实施方案中,第一试剂是 α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO)。在一些实施方案中,第二试剂是包含非类固醇抗炎药 (NSAID) 的非阿司匹林。在一些实施方案中,包含 NSAID 的非阿司匹林是选择性 COX-2 抑制剂。在一些实施方案中,包含 NSAID 的非阿司匹林是舒林酸或塞来昔布。在一些实施方案中,包含 NSAID 的非阿司匹林是舒林酸。

[0027] 在另一方面中,提供了使患者中的癌肿瘤可切除的方法,包含:

[0028] a) 从确定患者的至少一个 ODC1 启动子基因等位基因 +316 位置上的基因型的测试中得到结果;和

[0029] b) 如果结果表明患者的 ODC1 启动子基因的至少一个等位基因 +316 位置上的基因型是 G,则向患者施用有效量的包含下列的药物疗法:

[0030] (i) 抑制患者内鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 的第一试剂 ;和

[0031] (ii) 增加患者内亚精胺 / 精胺 N¹- 乙酰转移酶表达的第二试剂。

[0032] 在一些实施方案中,结果通过接收包含所述基因型的报告或者获取显示结果的患者病史得到。在一些实施方案中,测试确定患者 ODC1 启动子基因的一个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。在一些实施方案中,测试确定患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。在一些实施方案中,结果表明患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GG。在一些实施方案中,结果表明患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GA。

[0033] 在一些实施方案中,如果在得到测试结果之前,患者正在用药物疗法但以较低的剂量进行治疗,则药物疗法还包含增加第一试剂或第二试剂的剂量。在一些实施方案中,如果在得到测试结果之前,患者正在用药物疗法但以较低的剂量进行治疗,则药物疗法还包含增加第一试剂和第二试剂的剂量。

[0034] 在一些实施方案中,第一试剂是 α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO)。

[0035] 在一些实施方案中,第二试剂是包含非类固醇抗炎药 (NSAID) 的非阿司匹林。在一些实施方案中,包含 NSAID 的非阿司匹林是选择性 COX-2 抑制剂。在一些实施方案中,包含 NSAID 的非阿司匹林是舒林酸或塞来昔布。在一些实施方案中,包含 NSAID 的非阿司匹林是舒林酸。

[0036] 在另一方面中,提供了用于预防处于风险中的患者中癌发展或复发的方法,包含 :

[0037] a) 从确定患者的至少一个 ODC1 启动子基因等位基因 +316 位置上的基因型的测试中得到结果 ;和

[0038] b) 如果结果表明患者的 ODC1 启动子基因的至少一个等位基因 +316 位置上的基因型是 G,则向患者施用组合有效量的 α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 和包含非类固醇抗炎药 (NSAID) 的非阿司匹林。

[0039] 在一些实施方案中,结果通过接收包含所述基因型的报告或者获取显示结果的患者病史得到。在一些实施方案中,测试确定患者 ODC1 启动子基因的一个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。在一些实施方案中,测试确定患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。在一些实施方案中,结果表明患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GG。在一些实施方案中,结果表明患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GA。

[0040] 在另一方面中,提供了用于以 α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 和包含非类固醇抗炎药 (NSAID) 的非阿司匹林治疗处于癌发展或复发风险的患者的方法,包含向患者施用有效量的 α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 和包含非类固醇抗炎药 (NSAID) 的非阿司匹林,其中患者已经被鉴定为至少一个 ODC1 启动子基因等位基因 +316 位置上具有 G。

[0041] 在一些实施方案中,在患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上鉴定的基因型是 GG。在一些实施方案中,在患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上鉴定的基因型是 GA。

[0042] 在另一方面中,提供了用于治疗患者中癌的方法,包含 :

[0043] a) 从确定患者的至少一个 ODC1 启动子基因等位基因 +316 位置上的基因型的测试

中得到结果 ;和

[0044] b) 如果结果表明患者的 ODC1 启动子基因的至少一个等位基因 +316 位置上的基因型是 G, 则向患者施用组合有效量的 α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 和包含非类固醇抗炎药 (NSAID) 的非阿司匹林。

[0045] 在一些实施方案中, 结果通过接收包含所述基因型的报告或者获取显示结果的患者病史得到。在一些实施方案中, 测试确定患者 ODC1 启动子基因的一个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。在一些实施方案中, 测试确定患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的核苷酸碱基。在一些实施方案中, 结果表明患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GG。在一些实施方案中, 结果表明患者 ODC1 启动子基因的两个等位基因 +316 位置上的基因型是 GA。

[0046] 在任何上述实施方案的变异实施方案中, 包含 NSAID 的非阿司匹林是选择性 COX-2 抑制剂。在一些实施方案中, 包含 NSAID 的非阿司匹林是舒林酸或塞来昔布。在一些实施方案中, 包含 NSAID 的非阿司匹林是舒林酸。在一些实施方案中, DFMO 和舒林酸全身性施用。在一些实施方案中, DFMO 和舒林酸通过不同的途径施用。在一些实施方案中, DFMO 或包含 NSAID 的非阿司匹林经口、动脉内或静脉内施用。在一些实施方案中, DFMO 经口施用。在一些实施方案中, 有效量的 DFMO 是 500mg/ 天。在一些实施方案中, DFMO 静脉内施用。在一些实施方案中, 有效量的 DFMO 是从大约 0.05 至大约 5.0g/m²/ 天。在一些实施方案中, DFMO 和包含 NSAID 的非阿司匹林被配制成为用于口服施用。在一些实施方案中, DFMO 和包含 NSAID 的非阿司匹林被配制成为硬或软胶囊或者片剂。在一些实施方案中, DFMO 和包含 NSAID 的非阿司匹林每 12 小时施用一次。在一些实施方案中, DFMO 和包含 NSAID 的非阿司匹林每 24 小时施用一次。在一些实施方案中, 有效量的舒林酸是从大约 10 至大约 1500mg/ 天。在一些实施方案中, 有效量的舒林酸是从大约 10 至大约 400mg/ 天。在一些实施方案中, 有效量的舒林酸是 150mg/ 天。在一些实施方案中, DFMO 在舒林酸之前施用。在一些实施方案中, DFMO 在舒林酸之后施用。在一些实施方案中, DFMO 在舒林酸之前和之后施用。在一些实施方案中, DFMO 与舒林酸并行施用。在一些实施方案中, DFMO 施用至少两次。在一些实施方案中, 舒林酸施用至少两次。

[0047] 在任何上述实施方案的变异实施方案中, 患者具有实体肿瘤, 并且所述方法还包含所述实体肿瘤的切除。在一些实施方案中, DFMO 和舒林酸在所述切除之前施用。在一些实施方案中, DFMO 和舒林酸在所述切除之后施用。

[0048] 在任何上述实施方案的变异实施方案中, 癌是结直肠癌、乳腺癌、胰腺癌、脑癌、肺癌、胃癌、血癌、皮肤癌、睾丸癌、前列腺癌、卵巢癌、肝癌或食管癌、宫颈癌、头颈癌、非黑素瘤皮肤癌、神经母细胞瘤和成胶质细胞瘤。在一些实施方案中, 癌是结直肠癌。在一些实施方案中, 结直肠癌是 I 期。在一些实施方案中, 结直肠癌是 II 期。在一些实施方案中, 结直肠癌是 III 期。在一些实施方案中, 结直肠癌是 IV 期。

[0049] 在任何上述实施方案的变异实施方案中, 方法预防患者中新的晚期结直肠肿瘤的形成。在一些实施方案中, 方法预防患者中的耳毒性或其风险。在一些实施方案中, 方法预防新的右侧晚期结直肠肿瘤的形成。在一些实施方案中, 方法预防新的左侧晚期结直肠肿瘤的形成。

[0050] 在任何上述实施方案的变异实施方案中, 患者已经被鉴定为在结肠、直肠或盲肠

中具有一个或更多个腺瘤性息肉。在一些实施方案中,患者已经被鉴定为具有一个或更多个晚期结直肠肿瘤。在一些实施方案中,患者已经被鉴定为具有一个或更多个左侧晚期结直肠肿瘤。在一些实施方案中,患者已经被鉴定为具有一个或更多个右侧晚期结直肠肿瘤。在一些实施方案中,患者已经被诊断为具有家族性腺瘤性息肉病。在一些实施方案中,患者已经被诊断为具有林奇综合征(Lynch syndrome)。在一些实施方案中,患者已经被诊断为具有家族性X型结直肠癌。在一些实施方案中,患者满足阿姆斯特丹标准或者阿姆斯特丹标准II。在一些实施方案中,患者具有一个或更多个结直肠腺瘤切除史。在一些实施方案中,患者具有与ODC活动过度相关的上皮内瘤变或者癌前病变。在一些实施方案中,患者具有上皮内瘤变或者癌前病变和升高的细胞多胺水平。

[0051] 在任何上述实施方案的变异实施方案中,患者是人。

[0052] 当词语“一”在权利要求书和/或说明书中与术语“包含”一起使用时意思是指“一个”,但是它还具有“一个或更多个”、“至少一个”和“一个或多于一个”的含义。

[0053] 在本申请的通篇中,术语“大约”用于指数值包含用来确定数值的设备和方法的固有误差变异,或者所研究受试者当中存在的变异。

[0054] 术语“包含”、“具有”和“包括”是开放性的系动词。一个或更多个这些动词的任何形式或时态,例如“包含”、“包含有”、“具有”、“具有着”、“包括”和“包括有”也是开放性的。例如,“包含”、“具有”或“包括”一个或更多个步骤的任何方法不限于仅拥有这些一个或更多个步骤,并且还涵盖其它未列出的步骤。

[0055] 如在说明书和/或权利要求书中所使用,术语“有效的”意思是指足以实现渴望的、期望的或者预期的结果。

[0056] 如本文所使用,术语“IC₅₀”指得到最大反应的50%的抑制性剂量。

[0057] 如本文所使用,术语“患者”或者“受试者”指活的哺乳动物有机体,例如人、猴、奶牛、绵羊、山羊、狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠或其转基因种。在某些实施方案中,患者或受试者是灵长类。人受试者的非限定性实例是成人、少年、婴儿和胎儿。

[0058] “药学上可接受”意思是指可用于制备通常安全的、无毒的且在生物学和其它方面都不会不合需要的药物组合物,包括可接受用于兽医用途以及人药物用途的那些药物组合物。

[0059] “预防”包括(1)抑制处于可能疾病风险中和/或易患疾病但尚未经历或者表现出任何或全部的疾病病理或症状的受试者或者患者中的疾病发作,和/或(2)减慢可能处于疾病风险中和/或易患疾病的但尚未经历或者表现出任何或全部的疾病病理或症状的受试者或者患者中的疾病病理或症状发作。

[0060] “有效量”、“治疗有效量”或者“药物有效量”意思是指当向受试者或者患者施用以治疗疾病时,足以实现对疾病的所述治疗的量。

[0061] “治疗”包括(1)抑制经历着或者表现出疾病病理或症状的受试者或者患者中的疾病(例如阻止病理和/或症状进一步发展), (2)改善经历着或者表现出疾病病理或症状的受试者或者患者中的疾病(例如逆转病理和/或症状), 和/或(3)实现经历着或者表现出疾病病理或症状的受试者或者患者中疾病的任何可测量的下降。

[0062] 上述定义代替以引用的方式并入本文的任何参考文献中的任何有冲突的定义。然而,某些术语被定义的事实不应该认为预示着未定义的任何术语是不明确的。而是,所使用

的所有术语被认为是清楚地描述本发明以致于普通技术人员可理解本发明的范围和实施本发明。

[0063] 根据下面的详细描述,本公开书的其它目的、特征和优势将变得显而易见。然而,应当理解,详细描述和特定的实施例在表明本发明特定实施方案的同时,仅以例证形式给出,因为根据所述详细描述,处于本发明精神和范围内的诸多改变和修饰对本领域技术人员而言将变得显而易见。请注意,特定化合物归于一个特定通式并不意味着它不能够属于另一通式。

附图说明

[0064] 下列附图构成本说明书的部分,并且被包含在内以用于进一步例证本公开书的某些方面。通过参考这些附图之一并结合本文所呈现的特定实施方案的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0065] 图 1-MAD1 和 c-MYC 对多胺调节的不同作用。方案描述所提出的 MAD1 和 c-MYC 在 ODC1+316 次要 A- 等位基因上对多胺调节的不同作用。还显示了 ODC 抑制剂 DFM0(二氟甲基鸟氨酸)的作用。

[0066] 图 2- 结直肠癌特异性存活率估计。该图显示 III 期结直肠癌病例的 Kaplan-Meier 结直肠癌特异性存活率估计,所述结直肠癌病例由 ODC1+316 基因型层化。包含了来自加利福尼亚大学欧文分校的家族性结直肠癌基因-环境研究的在 1994-1996 期间确诊并且随访至 2008 年 3 月的病例:ODC1 GG(64 例,15 例结直肠癌特异性死亡),ODC1 GA/AA(62 例,25 例结直肠癌特异性死亡)。

[0067] 图 3A 和 B-ODC1 启动子 SNP 的定位和分析。图 A 显示 ODC1 启动子 SNP 的定位。在此项研究中研究的 SNP 是 ODC1 转录起始位点 3' 的 316 位的核苷酸(*)。该 SNP 位于由加下划线序列所示的两个共有序列 E- 盒之间,并且影响 PstI 限制性位点(盒)(SEQ ID NO: 5)。图 3B 显示 ODC1SNP 的限制性片段长度多态性分析。从两种细胞类型中得到 DNA,并且将 ODC1 SNP 位点周围的区域测序。发现在 ODC1 SNP 基因座上,结肠来源的 HT29 细胞是杂合的 GA,而 HCT116 细胞是纯合的 GG。从每一细胞类型得到该区域的 350-bp PCR 产物并用 PstI 消化。通过 < 350bp 的限制性产物表明存在 A- 等位基因的证据。

[0068] 图 4A 和 B-E- 盒表达和免疫沉淀分析。ODC1 启动子 SNP 的定位。图 4A 显示结肠来源的细胞中的 E- 盒蛋白质表达。待评价与 +316ODC1SNP 的结合的蛋白质的表达通过 Western 印迹分析来评价。使用 HT29 和 HCT116 两种细胞的提取物评价 c-MYC、MAD1 和 MAD4; β -肌动蛋白用作上样对照。图 4B 显示通过染色质免疫沉淀分析获得的关于等位基因特异性转录因子结合的资料,所述染色质免疫沉淀分析如下面实施例部分所述进行。HT29 细胞是 ODC1A- 等位基因的来源,因为这些细胞的该位点是杂合的 GA。HCT116 细胞用作 ODC1G- 等位基因的来源。

[0069] 图 5A 和 B-c-MYC 和 MAD1 表达对 ODC1 活性的影响。图 5A 显示 HT29 结肠来源的细胞中 c-MYC 表达对 ODC1 等位基因特异性启动子活性的影响。在以 ODC1 启动子报告基因质粒与 pcDNA 3.0 质粒或者 CMV-MYC 表达载体共转染后测量启动子活性。启动子构建体的差别在于位于 -485 至 -480bp 内的第一个 E- 盒元件的存在(对于野生型序列为“wt E- 盒 1”或者对于突变体序列为“mut E- 盒 1”)。构建体不同之处还在于 ODC1+316SNP(“+316G”

或者“+316A”)。*, 对于与使用 pcDNA 3.0 共转染的启动子活性进行的 4 种比较中每一种比较 $P \leq 0.013$ 。图 5B 显示 HT29 结肠肿瘤来源细胞中 MAD1 表达对 ODC1 等位基因特异性启动子活性的影响。在用 ODC1 启动子报告基因质粒与 pcDNA 3.1 质粒或者与 pcDNA-MAD1 质粒共转染后测量启动子活性。所使用的启动子构建体描述在该图 A 组的图例中。*, $P = 0.027$, 与使用 pcDNA 3.1 共转染的启动子活性相比具有统计学显著性。

[0070] 图 6- 腺瘤性息肉的减少. 该图显示与用安慰剂治疗相比, 用 DFM0 和舒林酸治疗的患者的腺瘤性息肉复发百分比。在总的腺瘤中减少 70%, 在晚期腺瘤中减少 92%, 并且在多发性腺瘤中减少 95%。

[0071] 图 7- 基于 +3160DC1 基因型的药物基因组学收益 / 风险分析. 该图比较了 3 年结束时相对于安慰剂的腺瘤复发百分比的减少, 与治疗组和安慰剂组的耳毒性百分比, 它们作为患者 +3160DC1 基因型的函数。使用听力测试试验确定耳毒性。

[0072] 图 8A-C- 基于 +3160DC1 基因型的药物基因组学收益 / 风险分析. 该图比较了治疗组与安慰剂组的收益, 即 3 年结束时腺瘤复发百分比的减少, 和风险, 即耳毒性百分比, 它们作为患者 +3160DC1 基因型的函数。使用听力测试试验确定耳毒性。

[0073] 图 9-Min/+ 小鼠结肠中通过大小区分的肿瘤平均数量. 该图显示与未治疗对照相比, 三个治疗组的结肠中通过大小区分的肿瘤平均数量。购自 Jackson 实验室 (Bar Harbor, Me.) 的小鼠通过 C57BL/6J-Apc^{Min/+}雄鼠和 C57/BL6 雌鼠杂交繁育。杂合子 Min 小鼠 (Apc^{Min}/Apc⁺): (对于 Apc 密码子 850 上的无义突变为杂合的) 通过使用尾尖 DNA 的等位基因特异性 PCR 测定的断奶期基因分型鉴定。纯合的 (Apc⁺/Apc⁺) 的一窝雄鼠用作对照。一种治疗是由在研究的第 8 天向饮用水添加 2% DFM0 (Merrell Dow Research Inst.) 组成。在另一治疗中, 在研究的第 21 天向 AIN-93G 小鼠食物中加入 167ppm 的舒林酸 (Harlen Teklad)。第三种治疗是 DFM0 和舒林酸的组合。在 114 天后, 通过 CO₂ 窒息处死小鼠。从小鼠中取出小肠和结肠段并且纵向切开、放置并在 70% 乙醇中固定, 并置于 4°C 用于肿瘤评分。还获取代表性的组织用于组织病理学评价。

[0074] 图 10-Min/+ 小鼠小肠中通过大小区分的肿瘤平均数量. 该图显示与未治疗对照相比, 三个治疗组的小肠中通过大小区分的肿瘤平均数量。对于实验细节参见上面的图 9 描述。

[0075] 图 11-Min/+ 小鼠中作为治疗函数的高分级腺瘤的数量. 该图显示高分级腺瘤数量如何取决于治疗类型而变化。对于实验细节参见上面的图 9 描述。

具体实施方式

[0076] 在数个方面中, 提供了包含至少部分基于患者 ODC1 启动子基因型, 预测包含鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 抑制剂和亚精胺 / 精胺 N¹- 乙酰转移酶表达激动剂的抗癌组合治疗的适合性、功效、毒性和 / 或剂量的方法。

[0077] 本发明还包含向表现出癌前症状的个体递送治疗化合物以预防癌症的发作和 / 或预防癌症风险因素的发作, 例如新的变异结肠腺窝病灶的形成, 新的腺瘤性息肉或新的发育异常腺瘤的形成。该类别单元包括息肉和其它癌前病变、初癌、肿瘤发生前或者表明可能进展成癌状态的其它异常表型, 至少部分地基于患者的 ODC1 启动子基因型。

[0078] I. 多胺代谢

[0079] 过量的多胺形成长期涉及到上皮癌发生,特别是结直肠癌发生。多胺是参与多种过程的小的遍在分子,包括转录、RNA 稳定、离子通道闸门和其它 (Wallace,2000)。鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 是多胺合成中的第一个酶,其对于哺乳动物的正常发育和组织修复是必需的,但是在大多数成年组织中下调 (Gerner 和 Meyskens,2004)。对多胺代谢和运输的控制的多重异常导致多胺水平提高,这会促进多种组织内的肿瘤形成 (Thomas 和 Thomas,2003)。

[0080] 在患有家族性腺瘤性息肉病 (FAP) 的人的肠上皮组织中多胺代谢被上调 (Giardiello 等人,1997),FAP 是一种与结肠癌和其它癌症高风险有关的综合征。

[0081] FAP 可以由腺瘤性结肠息肉病 (APC) 肿瘤抑制基因中的突变引起,并且已经证明在两种人细胞 (Fultz 和 Gerner,2002) 和 FAP 小鼠模型 (Erdman 等人,1999) 中 APC 信号可调节 ODC 表达。

[0082] 野生型 APC 表达导致 ODC 表达降低,而突变体 APC 导致 ODC 表达增加。ODC 的 APC- 依赖性调节机制涉及 E- 盒转录因子,包括转录激活剂 c-MYC 和转录阻抑物 MAD1 (Fultz 和 Gerner,2002 ;Martinez 等人,2003)。他人已经证明 c-MYC 调节 ODC 转录 (Bellofernandez 等人,1993)。多胺代谢中涉及的数个基因是大多数生物最佳生长所必需的基因,并且在非增殖的和 / 或成体细胞和组织中被下调 (Gerner 和 Meyskens,2004)。多胺部分地通过影响基因表达模式而影响特异性的细胞表型,如别处所综述 (Childs 等人,2003)。

[0083] 如下面所述,已经证明,包括抑制 ODC 活性 (即多胺合成的限速酶) 和 / 或降低细胞多胺水平的策略在预防人结直肠息肉复发中具有惊人的功效。来自此项研究的流行病学和实验结果证明多胺稳态由 ODC 中的遗传多态性进行条件性调节,并且提出了 +3160DC SNP 会对结肠腺瘤复发具有保护性并且对结肠癌诊断后的存活有害的模式。该信息可用于确定结肠癌预后。通过鉴定癌症进展 / 复发风险提高的患者,可创立三级预防管理策略的早期实现。此外,此项研究可用于鉴定具有高风险但在其它方面经历最佳治疗的局部结直肠癌的患者,这些患者将从三级癌症预防治疗中受益。

[0084] 取决于患者的饮食,过量的多胺问题难以解决,因为多胺,例如腐胺存在于许多普通食物中,例如橙汁中,其包含大约 400ppm 的腐胺。在这一点上,禁忌高多胺饮食,并且对于本文提供的实施方案中的一些实施方案,避免此类饮食。参见由 Kavitha P. Raj、Jason A. Zell、Christine E. McLaren、Eugene W. Gerner、Frank L. Meyskens 和 Jeffrey Jacob 于 2010 年 5 月 14 日提出的,题目为“基于饮食多胺含量的癌症预防与治疗方法 (Cancer Prevention and Treatment Methods Based on Dietary Polyamine Content)”的美国临时专利申请,其全文以引用的方式并入本文。

[0085] II. 家族性腺瘤性息肉病

[0086] 家族性腺瘤性息肉病 (FAP) 是一种遗传性息肉病综合征,它是腺瘤性结肠息肉病 (APC) 肿瘤抑制基因的种系突变的结果 (Su 等人,1992)。这种表达变异的常染色体显性病与许许多多结肠腺瘤的发展有关,结肠腺瘤一致性地到 40 岁时进展成腺癌,这比散发性结肠癌的平均诊断年龄早 20 年 (Bussey,1990)。在先前对具有 FAP 的症状发生前个体的研究中,在表观正常结直肠活检中已经检测到与正常家族成员对照相比,多胺亚精胺和精胺以及它们的二胺前体腐胺水平增加 (Giardiello 等人,1997)。哺乳动物多胺合成中的第一个

且为限速的酶鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 的活性在来自 FAP 患者的表观正常的结肠粘膜活检中也提高 (Giardiello 等人, 1997 ;Luk 和 Baylin, 1984)。这些发现很受人关注, 因为多胺是最佳的细胞增殖所必需的 (Pegg, 1986)。此外, 使用酶激活的不可逆性抑制剂 DFMO 抑制 ODC 活性则抑制致癌剂处理的啮齿类动物中的结肠癌发生 (Kingsnorth 等人, 1983 ;Tempero 等人, 1989)。

[0087] 如下面更加详细地讨论, 与 FAP 共有突变的 APC/apc 基因型的 Min (多发性肠瘤形成) 小鼠充当人 FAP 患者的有用的实验动物模型 (Lipkin, 1997)。Min 小鼠在 120 天的生命中在整个胃肠道中可发生多于 100 个胃肠道腺瘤 / 腺癌, 这导致 GI 出血、梗阻和死亡。DFMO 和舒林酸的组合治疗显示在减少这些小鼠中的腺瘤方面是有效的 (美国专利号 6, 258, 845 ;Gerner 和 Meyskens, 2004)。用单独的 DFMO、单独的舒林酸或者 DFMO 和舒林酸的组合治疗 Min 小鼠后结肠或者小肠中的肿瘤形成结果示于图 9-11 中。

[0088] III. 鸟氨酸脱羧酶 -1 多态性

[0089] 多胺合成中的第一个酶鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 的活性是正常生长所必需的, 并且在许多癌症中, 包括结直肠癌中提高。鉴于此, 检查了结直肠癌病例当中 +3160DC 单核苷酸多态性 (SNP) 与结直肠癌 (CRC) 特异性存活之间的关联, 并且研究了其在结肠癌细胞中的功能意义。

[0090] 人 ODC1 基因内含子 -1 中的单核苷酸多态性 (SNP) 影响 ODC1 转录 (Guo 等人, 2000), 并且已经作为结直肠腺瘤 (CRA) 风险的遗传标记进行了研究 (Martinez 等人, 2003 ; Barry 等人, 2006 ;Hubner 等人, 2008)。所报导的次要 A- 等位基因频率大约为 25%, 并且尽管在人种 / 种族之间存在差异, 但是在每一人种内 ODC1 基因型分布处于哈代 - 温伯格平衡中 (O'Brien 等人, 2004 ;Zell 等人, 2009)。与带有主要 G- 等位基因的个体相比, ODC1 次要 A- 等位基因纯合的个体腺瘤复发的风险降低 (Martinez 等人, 2003 ;Hubner 等人, 2008)。此外, ODC1 A- 等位基因 (AA 或 GA 基因型, 但不是 GG 基因型) 和所报导的阿司匹林使用已经与降低的结肠息肉复发相关 (Martinez 等人, 2003 ;Barry 等人, 2006 ;Hubner 等人, 2008), 并且在统计学意义上降低晚期腺瘤风险达 50% (Barry 等人, 2006)。

[0091] 研究了 E- 盒转录因子对 ODC 等位基因的特异性结合, 并且评价了位于两个 E- 盒之间的 +3160DC SNP 的功能意义 (E- 盒 2 和 3, 如图 2A 中所述)。每一细胞系基因型影响该区域内的共有序列 PstI 限制性位点。图 2B 显示从人结肠 HT29 细胞产生的聚合酶链式反应 (PCR) 产物对 PstI 切割部分地敏感, 表明这些细胞包含至少一个 ODC A- 等位基因。使用相同的引物从人结肠 HCT116 细胞产生的 PCR 产物对 PstI 作用不敏感, 暗示着这些细胞仅包含 ODC G- 等位基因。该结果通过直接的 DNA 测序得到证实。

[0092] 通过 Western 印迹确立了 HT29 和 HCT116 细胞中特异性 E- 盒结合蛋白, 包括转录激活剂 c-MYC 和数个转录阻抑物 (例如 MAD1 和 MAD4) 的表达 (图 3A)。使用针对这些蛋白质的抗体进行了 ODC 启动子 +316 周围区域的染色质免疫沉淀 (CHIP) 分析。如图 3B 中所示, 从使用针对 c-MYC、MAD1 或 MAD4 的抗体进行染色质免疫沉淀后得到的 HT29DNA 合成 ODC 启动子特异性 PCR 产物。与从 HT29DNA 合成的那些 PCR 产物相比, 从相似染色质免疫沉淀后的 HCT116DNA 合成的 PCR 产物相当大地减少。这些结果量化后表明, 与仅包含 ODC-G 等位基因的 HCT116 细胞相比, 在包含一个 ODC-A 等位基因的 HT29 细胞中, 结合至 ODC SNP 区的 c-MYC、MAD1 和 MAD4 多 4-14 倍。

[0093] 评价了 ODC 等位基因特异性启动子活性。如下测试了 +316ODC SNP 以依赖于 E- 盒激活剂和阻抑物表达的方式影响 ODC 表达的假设。用 ODC 等位基因特异性启动子构建体与表达转录激活剂 c-MYC 或者阻抑物 MAD1 的载体相组合实现对结肠癌来源 HT29 细胞的瞬时共转染 (图 4A 和 B)。所示的标准误差线反映出已经重复实验的一个代表性实验内的三个测量值的差异性。在包括所有三个 E- 盒的这些实验中使用的等位基因特异性启动子报告基因示于图 2A 中。如图 4A 中所示, c-MYC 表达对包含三个共有序列 E- 盒和 ODC-A 等位基因的启动子具有最大的刺激性作用 (wtE- 盒 1+316A, $P = 0.0014$)。上游 E- 盒缺失使启动子活性降低, 但是 c-MYC 表达持续刺激该活性 (mut E- 盒 1+316A, $P = 0.0013$)。+316SNP 位置由 G 替代 A 降低了 c-MYC 刺激启动子活性的能力, 甚至是使用完整的 5' 侧翼共有序列 E- 盒时也如此。5' 侧翼共有序列 E- 盒的突变与 ODC-G 等位基因组合进一步降低了启动子活性。

[0094] 当 MAD1, 而不是 c-MYC, 与 ODC 等位基因特异性启动子报告基因共转染时 (图 4B), 阻抑物仅能够降低包含所有三个 E- 盒和野生型 +316A- 等位基因的 ODC 启动子的活性 ($P = 0.027$)。上游 E- 盒缺失 (mutE- 盒 1+316A) 显著降低 MAD1 对 ODC 启动子活性的影响。+316 位置由 G 取代 A 使得包含两个或者三个 E- 盒的启动子对 MAD1 阻抑无反应。

[0095] IV. 二氟甲基鸟氨酸 (DFMO)

[0096] DFMO 也称作依氟鸟氨酸, 具有以下化学名称: 2-(二氟甲基)-dl- 鸟氨酸。它是多胺生物合成途径限速酶鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 的酶激活不可逆性抑制剂。作为该种多胺合成抑制的结果, 所述化合物有效地预防了许多器官系统内的癌症形成、抑制了癌症生长并且缩小了肿瘤大小。它还与其它抗肿瘤药具有协同作用。

[0097] 已经证明 DFMO 降低小鼠中的 APC- 依赖性的肠肿瘤发生 (Erdman 等人, 1999)。人每日口服施用 DFMO 可抑制许多上皮组织内的 ODC 酶活性和多胺含量 (Love 等人, 1993; Gerner 等人, 1994; Meyskens 等人, 1994; Meyskens 等人, 1998; Simoneau 等人, 2001; Simoneau 等人, 2008)。最近, 发明人报导了, 与随机临床试验中的安慰剂相比, DFMO 与非类固醇抗炎药 (NSAID) 舒林酸组合明显降低了具有结肠腺瘤个体当中的腺瘤复发率 (Meyskens 等人, 2008)。

[0098] DFMO 最初由斯特拉斯堡的 Centre de Recherche Merrell 合成; 当前 FDA 的批准包括

[0099] ● 非洲昏睡病。高剂量的全身性 IV 剂型—未投放市场 (Sanofi/WHO)

[0100] ● 多毛症 (雄激素诱导的毛发生长过度) 局部剂型

[0101] 当前没有批准口服制剂。

[0102] DFMO 及其在治疗良性前列腺肥大中的用途描述于美国专利号 4, 413, 141 和 4, 330, 559 两个专利中。美国专利号 4, 413, 141 描述了 DFMO 作为 ODC 的体外和体内强效抑制剂。施用 DFMO 引起其中通常活跃产生腐胺和亚精胺的细胞内这些多胺浓度降低。此外, 当在标准肿瘤模型中测试时显示 DFMO 能够减慢肿瘤细胞的增殖。美国专利号 4, 330, 559 描述了 DFMO 和 DFMO 衍生物用于治疗良性前列腺肥大的用途。良性前列腺肥大与许多以快速细胞增殖为特征的疾病状态一样, 伴随着多胺浓度的异常升高。在该文献中描述的治疗剂可以经口或者肠胃外向患者施用。

[0103] DFMO 可以连续施用而具有明显的抗肿瘤作用。该药物在 $0.4\text{g}/\text{m}^2/\text{天}$ 的低剂量下对

人相对无毒,与此同时产生对肿瘤内腐胺合成的抑制。在大鼠肿瘤模型中的研究证明 DFMO 输注可引起肿瘤腐胺水平降低 90%,而没有抑制外周血小板计数。

[0104] 使用 DFMO 观察到的副作用包括在 $4\text{g}/\text{m}^2/\text{天}$ 的高剂量时对听觉的影响,当停药后影响消退。当以 $0.4\text{g}/\text{m}^2/\text{天}$ 的较低剂量施用长达一年时没有观察到这种对听觉的影响 (Meyskens 等人,1994)。此外观察到头昏/眩晕的少数病例,但当停药时头昏/眩晕消失。主要在使用高“治疗”剂量 DFMO ($> 1.0\text{g}/\text{m}^2/\text{天}$) 的研究中报导了血小板减少症,并且主要在先前进行化学治疗的癌症患者中或者骨髓免疫力缺乏的患者中进行了报导。虽然 DFMO 治疗伴随的毒性通常不如其它类型化学疗法严重,但是还是在有限的临床试验中发现其促进剂量相关性血小板减少症。此外,在大鼠中的研究表明,与对照相比,连续输注 DFMO 12 天明显减少血小板计数。其它研究得到相似的观察结果,其中血小板减少症是连续静脉内 DFMO 治疗的主要毒性。这些发现表明,DFMO 将显著抑制骨髓巨核细胞前体的 ODC 活性。DFMO 会抑制增殖修复过程,例如上皮伤口愈合。

[0105] 在 III 期临床试验中,评价用二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 加舒林酸或者配对安慰剂治疗 36 个月后腺瘤性息肉的复发。暂时性耳聋是用 DFMO 治疗的已知的毒性,因此开发综合方法以分析系列的气导听力图。广义估计方程方法估计治疗组之间关于气导纯音阈值变化的平均差异,同时解释由于各种频率下重复测量所引起的受试者内相关性。基于 290 个受试者,在对于基线数值、年龄和频率调整后,与用安慰剂治疗的那些受试者相比,用 DFMO 加舒林酸治疗的受试者之间具有 0.50dB 的平均差异 (95% 置信区间, -0.64 至 1.63dB ; $P = 0.39$)。在 500 至 3,000Hz 的正常语音范围内,检测到 0.99dB 的估计差异 (-0.17 至 2.14dB ; $P = 0.09$)。剂量强度对模型没有增加信息。在 DFMO 加舒林酸组中的 151 个中有 14 个 (9.3%) 并且在安慰剂组中的 139 个中有 4 个 (2.9%) 经历了在所测试的整个范围内的 2 个或更多个连续频率中听力从基线值降低至少 15dB ($P = 0.02$)。在治疗结束后进行的至少 6 个月的随访气导测试显示,在治疗组之间的听力阈值的校正平均差异为 1.08dB (-0.81 至 2.96dB ; $P = 0.26$)。与安慰剂组相比,DFMO 加舒林酸组中经历临床上明显耳聋的受试者比例没有显著差异。来自接触药物的估计的耳毒性归因风险是 8.4% (95% 置信区间, -2.0% 至 18.8% ; $P = 0.12$)。与使用安慰剂治疗的患者相比,使用 DFMO 加舒林酸治疗的患者的平均阈值差异是 $< 2\text{dB}$ 。此项研究的结果在 McLaren 等人,2008 中更详细地讨论,该文献的全文以引用的方式并入本文。本文提供降低和/或预防用试剂如 DFMO 和舒林酸治疗的患者中的耳毒性的方法。

[0106] V. NSAID

[0107] NSAID 是非类固醇的抗炎剂。它们除了具有抗炎作用外,还具有镇痛、解热和血小板抑制性作用。它们主要用于治疗慢性关节炎和与疼痛和炎症有关的某些软组织病。它们通过抑制环加氧酶从而阻断前列腺素的合成而起作用,其中环加氧酶将花生四烯酸转变成环状的内过氧化物,即前列腺素的前体。对前列腺素合成的抑制解释了它们的镇痛、解热和血小板抑制性作用;其它机制将促成它们的抗炎作用。某些 NSAID 还可抑制脂氧合酶或者磷脂酶 C 或者可以调节 T 细胞功能 (AMA Drug Evaluations Annual,1814-5,1994)。

[0108] 包括阿司匹林、布洛芬 (ibuprofen)、吡罗昔康 (piroxicam) (Reddy 等人,1990 ; Singh 等人,1994)、吲哚美辛 (indomethacin) (Narisawa,1981) 和舒林酸 (Piazza 等人,1997 ; Rao 等人,1995) 在内的非类固醇抗炎药 (NSAID) 有效地抑制 AOM- 处理大鼠模型中的

结肠癌发生。NSAID 还抑制包含活化的 Ki-ras 的肿瘤的发展 (Singh 和 Reddy, 1995)。NSAID 似乎通过诱导肿瘤细胞的凋亡而抑制癌发生 (Bedi 等人, 1995 ;Lupulescu, 1996 ;Piazza 等人, 1995 ;Piazza 等人, 1997b)。大量研究表明, NSAID 的化学预防特性, 包括诱导凋亡, 是它们具有抑制前列腺素合成的能力的作用 (综述于 DuBois 等人, 1996 ;Lupulescu, 1996 ;Vane 和 Botting, 1997 中)。然而, 研究表明 NSAID 可通过前列腺素依赖性和前列腺素不依赖性两种机制起作用 (Alberts 等人, 1995 ;Piazza 等人, 1997a ;Thompson 等人, 1995 ;Hanif, 1996)。舒林砒 (sulindac sulfone) 是 NSAID 舒林酸的代谢物, 它缺乏 COX- 抑制活性, 但诱导肿瘤细胞的凋亡 (Piazza 等人, 1995 ;Piazza 等人, 1997b) 并且在癌发生的数个啮齿动物模型中抑制肿瘤发展 (Thompson 等人, 1995 ;Piazza 等人, 1995, 1997a)。

[0109] 已经检查了数个 NSAID 在人临床试验中的作用。完成了布洛芬的 IIa 期试验 (一个月), 并且甚至在 300mg/ 天的剂量下, 观察到扁平粘膜中前列腺素 E₂ (PGE₂) 水平显著降低。300mg 的布洛芬剂量是非常低的 (治疗剂量范围为 1200-3000mg/ 天或者更高), 并且不太可能观察到毒性, 甚至长期使用也是如此。然而, 在动物的化学预防模型中, 布洛芬比其它的 NSAID 效果差。

[0110] A. 舒林酸及其主要代谢物, 舒林砒和硫化舒林酸

[0111] 舒林酸是非类固醇的抗炎症的茛萜生物, 具有下列化学名称 ;(Z)-5- 氟 -2- 甲基 -1-((4(甲基亚硫酰基) 苯基) 亚甲基) 1H- 茛 -3- 乙酸 (Physician's Desk Reference, 1999)。亚硫酰基部分在体内通过可逆性还原作用被转变成硫化物代谢物并且通过不可逆的氧化作用转变成砒代谢物 (依昔舒林 (exisulind))。参见美国专利 6, 258, 845, 其全文以引用的方式并入本文。还抑制 Ki-ras 活化的舒林酸被代谢成两种不同的分子, 它们抑制 COX 的能力不同, 但是两者均能够通过诱导凋亡施加化学预防作用。舒林砒缺乏 COX- 抑制性活性, 并且最有可能以前列腺素合成不依赖方式促进凋亡的诱导。可用的证据表明, 硫化物衍生物是生物活性化合物中的至少一个。基于此, 舒林酸可以认为是前药。

[0112] 舒林酸 (Clinoril®) 是可以获得的, 例如作为 150mg 和 200mg 的片剂。对于成年人最常用的剂量是 150 至 200mg, 每天两次, 其中最大日剂量是 400mg。在口服施用后, 大约 90% 的药物被吸收。峰值血浆水平在禁食患者中在大约 2 小时内达到, 当与食物一起施用时在 3 至 4 小时达到。舒林酸的平均半衰期是 7.8 小时 ;硫化物代谢物的平均半衰期是 16.4 小时。美国专利号 3, 647, 858 和 3, 654, 349 保护舒林酸制剂, 两篇文献的全文以引用的方式并入本文。

[0113] 舒林酸主治骨性关节炎、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、急性痛风和急性痛肩体征和症状的急性和长期缓解。舒林酸 (每天 400mg) 的镇痛和抗炎症效果与阿司匹林 (每天 4g)、布洛芬 (每天 1200mg)、吲哚美辛 (每天 125mg) 和苯基保泰松 (phenylbutazone) (每天 400 至 600mg) 所实现的镇痛和抗炎症效果具有可比性。舒林酸的副作用包括在近 20% 的患者中的轻微胃肠道影响, 其中腹痛和恶心是最常见的主诉。在高达 10% 的患者中观察到 CNS 副作用, 其中最常见的报告是嗜睡、头痛和神经过敏。在 5% 的患者中出现皮疹和瘙痒。使用舒林酸进行慢性治疗会产生严重的胃肠道毒性, 例如出血、溃疡和穿孔。

[0114] 已经深入研究了舒林酸用于癌症, 并且特别是结直肠息肉的化学预防的潜在用途。两个最新的美国专利号 5, 814, 625 和 5, 843, 929 详述了舒林酸在人中的潜在化学预防用途。两个专利的全文以引用的方式并入本文。美国专利号 5, 814, 625 中要求保护的舒林

酸的剂量范围为每天从 10mg 至 1500mg, 其中优选的剂量为每天 50mg 至 500mg。然而, 在更高剂量时, 使用舒林酸作为化学预防的单一试剂的最大的问题是其众所周知的毒性和适度高的不耐性风险。老人似乎特别容易受伤, 因为在超过 60 岁的人中副作用的发病率更高。值得注意的是, 该年龄组最有可能发生结直肠癌, 并且因此最有可能从化学预防中受益。

[0115] 在临床上已经测试并持续测试舒林酸及其砒代谢物依昔舒林用于预防和治疗数种癌症类型。美国国立卫生研究院数据库 Clinical Trials.gov 提供下列截至 2010 年 5 月 10 日的综述。

[0116]

状态	临床试验
招募中	舒林酸在口腔癌前病变中的随机研究 病症: 口腔白斑; 良性肿瘤 干预: 药物: 舒林酸; 药物: 安慰剂 发起人: 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) 分期: 未列出
招募中	舒林酸预防具有黑素瘤增加风险的健康参加者中的黑素瘤 病症: 癌前病症 干预: 药物: 舒林酸; 其它: 安慰剂 发起人: University of Arizona; National Cancer Institute(NCI) 分期: II 期
停止招募, 但试验在进行中	依氟鸟氨酸和舒林酸预防具有结肠息肉患者中的结直肠癌 病症: 结直肠癌; 癌前/非恶性病症 干预: 药物: 依氟鸟氨酸加舒林酸 发起人: University of California, Irvine; Chao Family Comprehensive Cancer Center; National Cancer Institute(NCI) 分期: III 期
完成	舒林酸预防处于乳腺癌高风险的妇女中的乳腺癌 病症: 乳腺癌 干预: 药物: 舒林酸; 其它: 实验室生物标志分析 发起人: University of Arizona; National Cancer Institute(NCI) 分期: I 期
完成	舒林酸胶囊与舒林酸片剂在健康志愿者中的比较 病症: 未分类成体实体瘤, 方案特异性的 干预: 药物: 舒林酸; 其它: 药理学研究 发起人: Mayo Clinic; National Cancer Institute(NCI)

[0117]

	分期:
停止招募, 但试验在进行中	依氟鸟氨酸加舒林酸预防具有良性结直肠息肉患者中的结直肠癌 病症: 结直肠癌 干预: 药物: 依氟鸟氨酸加舒林酸 发起人: University of California, Irvine; Chao Family Comprehensive Cancer Center; National Cancer Institute(NCI) 分期: II 期
停止招募, 但试验在进行中	贝伐单抗(Bevacizumab)/特罗凯(Tarceva)和特罗凯/舒林酸用于头颈鳞状上皮细胞癌 病症: 头颈鳞状上皮细胞癌(SCCHN) 干预: 药物: 贝伐单抗; 药物: 埃罗替尼(erlotinib); 药物: 舒林酸 发起人: Massachusetts General Hospital; Dana-Farber Cancer Institute; Emory University; University of North Carolina, Chapel Hill; Genentech; OSI Pharmaceuticals 分期: II 期
停止招募, 但试验在进行中	舒林酸预防具有支气管发育异常的当前或者先前吸烟者中的肺癌 病症: 肺癌; 癌前病症; 烟草使用障碍 干预: 药物: 舒林酸; 其它: 安慰剂 发起人: Mayo Clinic; National Cancer Institute(NCI) 分期: II 期
完成	舒林酸和他莫昔芬(Tamoxifen)治疗具有韧带样瘤的患者 病症: 韧带样瘤 干预: 药物: 舒林酸; 药物: 柠檬酸他莫昔芬 发起人: Children's Oncology Group; National Cancer Institute(NCI) 分期: II 期
招募中	舒林酸和表阿霉素(Epirubicin)治疗具有转移的恶性黑素瘤的患者 病症: 黑素瘤(皮肤) 干预: 药物: 盐酸表阿霉素; 药物: 舒林酸; 其它: 免疫学技术 发起人: All Ireland Cooperative Oncology Research Group

[0118]

	分期: II 期
完成	托伐他汀(Atorvastatin)、富含低聚果糖的菊糖或者舒林酸预防处于发展成结肠癌形成增加风险的患者中的癌症 病症: 结直肠癌; 癌前病症 干预: 饮食添加: 富含低聚果糖的菊糖; 药物: 托伐他汀钙; 药物: 舒林酸; 其它: 安慰剂 发起人: Mayo Clinic; National Cancer Institute(NCI) 分期: II 期
暂停	舒林酸和植物化合物预防结肠癌 病症: 结直肠癌 干预: 饮食添加: 姜黄色素; 饮食添加: 芦丁; 药物: 槲皮素; 药物: 舒林酸 发起人: Rockefeller University 分期:
停止招募, 但试验在进行中	舒林酸、阿司匹林和熊去氧胆酸预防结直肠癌的比较 病症: 结直肠癌 干预: 药物: 乙酰基水杨酸; 药物: 舒林酸; 药物: 熊去氧胆酸(Ursodiol) 发起人: M.D. Anderson Cancer Center; National Cancer Institute(NCI) 分期: II 期
完成	舒林酸和多西他塞(Docetaxel)治疗具有转移或复发乳腺癌的妇女 病症: 乳腺癌 干预: 药物: 多西他塞; 药物: 舒林酸 发起人: Fox Chase Cancer Center; National Cancer Institute(NCI) 分期: II 期
招募中	舒林酸和益生菌对具有家族性腺瘤性息肉病患者中腺瘤发展的影响 病症: 腺瘤性结肠息肉病 干预: 药物: 舒林酸(药物); 药物: VSL#3(益生菌); 药物: Inulin(益生菌) 发起人: Radboud University; Dutch Cancer Society 分期: II 期

[0119]

终止	姜黄素类对人结肠中变异结肠腺窝病灶的作用 病症: 变异结肠腺窝病灶 干预: 药物: 舒林酸; 药物: 姜黄色素 发起人: University of Medicine and Dentistry New Jersey 分期:
招募中	姜黄色素用于治疗家族性腺瘤性息肉病(FAP)中肠腺瘤的用途 病症: 具有 FAP 患者中的肠道后段息肉; 具有 FAP 患者中的肠道上段息肉 干预: 药物: Calcumin(姜黄色素); 其它: 风险因素调查表; 其它: 血液样品; 其它: 活检(乙状结肠镜检查); 其它: 活检(胃肠内镜检查) 发起人: University of Puerto Rico 分期:
停止招募, 但试验在进行中	延长间歇性雄激素阻抑的治疗结束后的持续时间 病症: 前列腺癌 干预: 药物: 氟他胺(Flutamide); 药物: 乙酸利普安(Leuprolide Acetate); 药物: 依昔舒林 发起人: University of Washington; OSI Pharmaceuticals 分期: II 期
完成	卡培他滨(Capecitabine)和依昔舒林在转移的乳腺癌患者中的安全性、有效性和药物代谢动力学 病症: 乳腺肿瘤; 转移癌, 肿瘤 干预: 药物: 卡培他滨; 药物: 依昔舒林 发起人: M.D. Anderson Cancer Center; Cell Pathways 分期: I 期/II 期
完成	<u>新辅助依昔舒林治疗治疗处于针对 II 期或 III 期前列腺癌的根治性前列腺切除术的患者</u> 病症: 前列腺癌 干预: 药物: 依昔舒林; 过程: 常规手术; 过程: 新辅助治疗 发起人: Mayo Clinic; National Cancer Institute(NCI) 分期: II 期

[0120]

完成	<u>组合化学疗法治疗具有晚期非小细胞肺癌患者</u> 病症: 肺癌 干预: 药物: 碳铂(carboplatin); 药物: 依昔舒林; 药物: 盐酸吉西他滨(gemcitabine hydrochloride) 发起人: Eastern Cooperative Oncology Group; National Cancer Institute(NCI) 分期: II 期
完成	<u>多西他赛与依昔舒林组合在非小细胞肺癌(NSCLC)患者中的 II 期研究</u> 病症: NSCLC 干预: 药物: 依昔舒林 发起人: OSI Pharmaceuticals 分期: I 期/II 期
完成	<u>多西他赛/Aptosyn 对多西他赛/安慰剂在非小细胞肺癌患者中有效性的 III 期研究</u> 病症: 非小细胞肺癌 干预: 药物: 依昔舒林 发起人: OSI Pharmaceuticals 分期: III 期
完成	<u>前列腺手术切除后的依昔舒林对安慰剂</u> 病症: 前列腺肿瘤 干预: 药物: 依昔舒林 发起人: Mayo Clinic; OSI Pharmaceuticals 分期: II 期
完成	<u>多西他塞、雌莫司汀(Estramustine)和依昔舒林治疗具有对激素治疗不再有反应的转移前列腺癌的患者</u> 病症: 前列腺癌 干预: 药物: 多西他塞; 药物: 雌莫司汀磷酸钠; 药物: 依昔舒林 发起人: Cancer and Leukemia Group B; National Cancer Institute(NCI) 分期: II 期
完成	<u>化学疗法和依昔舒林组合治疗具有扩散期小细胞肺癌的患者</u>

[0121]

	病症: 肺癌 干预: 药物: 碳铂; 药物: 依托泊甙(etoposide); 药物: 依昔舒林 发起人: Cancer and Leukemia Group B; National Cancer Institute(NCI) 分期: II 期
停止招募, 但试验在进行中	<u>依昔舒林预防具有家族性腺瘤性息肉病的患者中的息肉</u> 病症: 结直肠癌; 小肠癌 发起人: University of Utah 分期: II 期/III 期
完成	<u>根治性前列腺切除术前的依昔舒林</u> 病症: 前列腺肿瘤 干预: 药物: 依昔舒林治疗 发起人: Mayo Clinic; National Cancer Institute(NCI) 分期: II 期

[0122] B. 吡罗昔康

[0123] 完全确定了用于治疗类风湿性关节炎和骨性关节炎的非类固醇抗炎剂, 具有如下化学名称: 4-羟基-2-甲基-N-2-吡啶基-2H-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺 1,1-二氧化物。还证明其可用于治疗肌肉骨骼病症、痛经和手术后疼痛。其具有长的半衰期, 使得可以每天施用一次。已经证明, 经直肠施用是有效的。胃肠道主诉是最经常报告的副作用。

[0124] 在动物模型中已经证明吡罗昔康是有效的化学预防剂 (Pollard 和 Luckert, 1989; Reddy 等人, 1987), 虽然在最近的 IIb 试验中证明有副作用。对 NSAID 副作用的大规模统计分析也表明吡罗昔康比其它 NSAID 的副作用更大 (Lanza 等人, 1995)。已经证明舒林酸使家族性腺瘤性息肉病 (FAP) 患者中的腺瘤退化 (Muscat 等人, 1994), 尽管散发腺瘤中的至少一项研究已经表明没有此类作用 (Ladenheim 等人, 1995)。

[0125] 已经证明在结肠癌发生的 AOM- 处理的大鼠模型中 DFMO 和吡罗昔康组合具有协同的化学预防作用 (Reddy 等人, 1990), 尽管当 DFMO 或吡罗昔康每一种试剂单独施用时, DFMO 比吡罗昔康对 Ki-ras 突变和肿瘤生成具有更大的抑制作用 (Reddy 等人, 1990)。在一项研究中, 向 AOM- 处理的大鼠施用 DFMO 或吡罗昔康降低携带 Ki-ras 突变的肿瘤数量从 90% 分别至 36% 和 25% (Singh 等人, 1994)。两种试剂还降低存在的肿瘤中有生物化学活性的 p21ras 的数量。

[0126] C. NSAID 组合

[0127] 还使用多种 NSAID 组合用于多种目的。通过使用较低剂量的两种或更多种 NSAID, 可以降低与更高剂量的各个 NSAID 相关的副作用或毒性。例如, 在一些实施方案中, 舒林酸可以与塞来昔布一起使用。在一些实施方案中, 一个或两个 NSAID 是选择性 COX-2 抑制剂。后面单独或者组合使用的 NSAID 实例包括, 但不限于下列: 布洛芬、萘普生 (naproxen)、非诺洛芬 (fenoprofen)、酮洛芬 (ketoprofen)、氟比洛芬 (flurbiprofen)、奥

沙普嗪 (oxaprozin)、吲哚美辛、舒林酸、依托度酸 (etodolac)、双氯芬酸 (diclofenac)、吡罗昔康、美洛昔康 (meloxicam)、替诺昔康 (tenoxicam)、屈恶昔康 (droxicam)、氯诺昔康 (lornoxicam)、伊索昔康 (isoxicam)、甲芬那酸 (mefenamic acid)、甲氯芬那酸 (meclofenamic acid)、氟芬那酸 (flufenamic acid)、托芬那酸 (tolfenamic acid)、塞来昔布、罗非昔布 (rofecoxib)、伐地考昔 (valdecoxib)、帕瑞昔布 (parecoxib)、罗美昔布 (lumiracoxib) 或者依托考昔 (etoricoxib)。

[0128] VI. 依氟鸟氨酸 / 舒林酸组合治疗

[0129] 化学预防药物以低剂量组合给药的临床前试验表明在预防腺瘤方面具有惊人的功效,并具有很少的额外毒性,证明是用于预防复发腺瘤的改善风险与收益比的策略。

[0130] 如上面所提到,与 FAP 共有突变 APC/apc 基因型的 Min (多发性肠瘤形成) 小鼠充当人 FAP 患者的有用的实验动物模型 (Lipkin, 1997)。Min 小鼠在 120 天的生命当中在整个胃肠道中产生超过 100 个胃肠道腺瘤 / 腺癌,导致 GI 出血、梗阻和死亡。DFMO 和舒林酸组合治疗证明在减少这些小鼠中的腺瘤方面是有效的 (美国专利号 6, 258, 845 ;Gerner 和 Meyskens, 2004)。用单独的 DFMO、单独的舒林酸或者 DFMO 和舒林酸的组合治疗 Min 小鼠中结肠或者小肠内肿瘤形成的结果示于图 9 和 10。图 9 显示与未治疗对照相比,三个治疗组的结肠中通过大小区分的肿瘤平均数量。图 10 显示与未治疗对照相比,三个治疗组的小肠中通过大小区分的肿瘤平均数量。图 11 显示高分级腺瘤数量如何取决于治疗类型,单一或组合而变化。

[0131] VII. 基于患者情况的多胺 - 抑制性治疗的功效

[0132] 已经证明长期每日口服 D,L- α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO, 依氟鸟氨酸) 和舒林酸的多胺 - 抑制性组合在 CRA 患者中具有功效 (Meyskens 等人, 2008), 然而, 治疗具有适度的亚临床的耳毒性 (McLaren 等人, 2008), 并且在具有高基线心血管风险的患者当中出现更大数量的心血管事件 (Zell 等人, 2009)。发明人现在已经研究确定了, 与安慰剂相比, 在依氟鸟氨酸和舒林酸治疗后, ODC1 基因型差异性地影响腺瘤复发、组织多胺反应或者毒性特性。

[0133] 具有腺瘤切除史 ($>$ 或者 $=$ 3mm) 的 375 名患者被随机指定接受每日一次口服二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 500mg 和舒林酸 150mg 或者配对的安慰剂达 36 个月, 在基线和临床地点通过使用低剂量阿司匹林 (81mg) 层化。在随机化或者研究结束后 3 年内进行随访结肠镜检查。使用对数二项回归比较了各组当中的结直肠腺瘤复发。比较接受安慰剂的患者结果与接受积极干预的患者结果, (a) 一个或更多个腺瘤复发为 41.1% 和 12.3% (风险比, 0.30 ; 95% 置信区间, 0.18-0.49 ; $P < 0.001$) ; (b) 8.5% 具有一个或更多个晚期腺瘤, 与 0.7% 的患者相比 (风险比, 0.085 ; 95% 置信区间, 0.011-0.65 ; $P < 0.001$) ; 和 (c) 17 名 (13.2%) 患者在最终结肠镜检查时具有多个腺瘤 (> 1), 与 1 个相比 (0.7% ; 风险比, 0.055 ; 0.0074-0.41 ; $P < 0.001$)。在安慰剂组中 8.2% 的患者出现严重的不良事件 (级别 $>$ 或者 $=$ 3), 与此相比在积极干预组中为 11% ($P = 0.35$)。报告听力从基线发生改变的患者比例不存在显著性差异。通过组合低口服剂量的 DFMO 和舒林酸可显著减少腺瘤性息肉复发, 并且副作用很少。对于此项研究的细节在下面和 Meyskens 等人, 2008 中更详细地讨论, 该文献的全文以引用的方式并入本文。

[0134] 在 267 名患者完成研究结束时的结肠镜检查后, 该项研究被数据安全监控委员会 (Data Safety Monitoring Board, DSMB) 停止 (由于研究达到了其功效终点)。DSMB 监测

所有安全性和功效终点。如在实施例部分中更详细的讨论,此项研究包含分析来自多中心 III 期结肠腺瘤预防试验的患者数据。还可见 (Meyskens 等人,2008),其全文以引用的方式并入本文。

[0135] A. ODC1 基因型分布

[0136] 从 UC Irvine 的 CRC 基因-环境研究中鉴定的总共 440 个结直肠癌 (CRC) 病例用于单纯病例分析中。中位随访期限是 11 年。有 270 (61%) 个结肠癌病例,162 (37%) 个直肠癌病例,和 8 (2%) 个位置未指明的 CRC 病例。对于结肠和直肠癌的临床病理学资料示于表 1 中。在所有的 CRC 病例中 ODC+316 基因型分布是 53% GG,41% GA,和 7% AA。在具有和不具有家族史的 CRC 病例当中 ODC+316 基因型分布相似。ODC 基因型分布在年龄 ($P = 0.38$)、性别 ($P = 0.56$)、家族史 ($P = 0.94$)、结直肠内的部位 ($P = 0.55$)、组织学 ($P = 0.46$) 或者肿瘤分级 ($P = 0.73$) 之间没有显著性差异。ODC 基因型分布在诊断时分期之间没有显著性差异:I 期 (49% GG,42% GA,8% AA),II 期 (56% GG,38% GA,6% AA),III 期 (51% GG,43% GA,6% AA),IV 期 (59% GG,37% GA,4% AA) ($P = 0.87$)。ODC 基因型分布在种族间表现出显著的差异:白种人 (382 个病例:53% GG,41% GA,6% AA,次要-A 等位基因频率=26%),非裔美国人 (7 个病例:71% GG,29% GA,0% AA,次要-A 等位基因频率=15%),西班牙裔美国人 (21 个病例:57% GG,43% GA,0% AA,次要-A 等位基因频率=21%),和亚洲人 (27 个病例:33% GG,41% GA,26% AA,次要-A 等位基因频率=46%) ($P = 0.009$)。然而,在每一人种内 ODC 基因型分布处于哈代-温伯格平衡中(白种人 $P = 0.36$,非裔美国人 $P = 0.66$,西班牙裔美国人 $P = 0.21$,亚洲人 $P = 0.35$)。

[0137] B. 腺瘤复发

[0138] ODC1 基因型分布是:126GG (55%),87GA (38%),和 15AA (7%)。基线临床特征显示出差异,如表 1 中所示。在使用年龄、性别、人种、阿司匹林使用、治疗、ODC1 基因型和治疗等预测因子的回归模型中,治疗是唯一与腺瘤复发、组织多胺反应和耳毒性差异有关的因素。对于腺瘤复发全部模型中的 ODC1 基因型和治疗检测到统计学显著性的相互作用 ($P = 0.021$),以致于在安慰剂患者当中腺瘤复发模式为:GG-50%,GA-35%,AA-29%,与此相比依氟鸟氨酸/舒林酸患者为:GG-11%,GA-14%,AA-57%。

[0139] 在该模型中的 ODC1 基因型和治疗之间检测到统计学显著性的相互作用 ($P = 0.038$)。在全部的回归模型中,ODC1 基因型与组织腐胺反应或者亚精胺:精胺比率反应没有显著相关性(数据未显示)。在全部的回归模型中,与调节后治疗有关的腺瘤复发相对风险 (RR) 是 0.39 (95% CI 0.24-0.66)。对于心血管或者胃肠道不良事件在治疗和 ODC1 基因型组之间没有显著的相关性(表 3 和 4)。

[0140] 本文中观察到,依氟鸟氨酸和舒林酸在具有主要 G 纯合 ODC1 基因型的患者当中的腺瘤抑制性作用更大,这与先前的报导不同,先前报导显示在接受阿司匹林的具有至少一个 A- 等位基因的 CRA 患者当中腺瘤复发风险减小 (Martinez 等人,2003;Barry 等人,2006;Hubner 等人,2008)。ODC1 基因型分布与先前基于阿司匹林的试验中所报导的相似 (Martinez 等人,2003;Barry 等人,2006;Hubner 等人,2008),并且 A- 等位基因与安慰剂组中非显著性更低的腺瘤复发风险有关,这与先前报导一致 (Martinez 等人,2003;Hubner 等人,2008)。这些结果证明,ODC1A- 等位基因携带者与 GG 基因型患者相比,对延长接触依氟鸟氨酸和舒林酸的反应不同,A- 等位基因携带者在腺瘤复发方面经历的益处较少,并且潜

在地提高了产生耳毒性的风险,尤其是在 AA 纯合子当中。

[0141] C. 存活分析

[0142] 在 440 个 CRC 病例当中,138(31%) 个病例在分析时已经去世。在携带 GG 基因型的病例中发生 64(46%) 例死亡,与之相比,在具有 AA/AG 基因型的病例中有 74(54%) 例死亡。在 138 个死亡 CRC 病例中有 120 个知道死亡原因。85(83%) 个 CRC 病例死于 CRC。与具有至少一个 A- 等位基因 (ODC GA/AA) 的病例 (10 年存活 = 76%; $P = 0.031$) 相比,在 ODC G- 等位基因纯合的所有 CRC 病例中观察到 CRC- 特异性存活具有统计学显著的改善 (10 年存活 = 84%)。通过分期进行的 CRC- 特异性存活分析显示,对于 AJCCI 期 ($P = 0.055$)、II 期 ($P = 0.61$) 或者 IV 期 ($P = 0.65$) CRC 没有观察到显著不同的存活差异。然而,在 III 期 CRC 当中,ODC GG 基因型与改善的 10 年 CRC- 特异性存活有关:75%,与之相比对于 ODC GA/AA 基因型病例为 60%; $P = 0.024$ (图 1)。在结肠癌病例当中,对于具有 ODC GG 基因型的病例与 ODC GA/AA 基因型病例相比观察到统计学显著的 CRC- 特异性存活收益 (10 年存活率 = 87% 对 79%; $P = 0.029$);这在直肠癌病例中没有观察到 (ODCGG 病例的 10 年存活 = 78%, ODC GA/AA 病例的 10 年存活 = 72%; $P = 0.42$)。

[0143] 在所有的 CRC 病例当中,在对于年龄 (岁)、性别、种族、CRC 家族史、诊断时的 TNM 分期、结肠内肿瘤部位、组织学亚型、手术治疗、放射治疗和化学治疗调整后基于 ODC 基因型的 CRC- 特异性存活估计如下:ODCGG 风险比 (HR) = 1.00 (参照物),ODC GA HR = 1.73, 和 ODC AA 基因型 HR = 1.73 (P - 倾向 = 0.0283)。仅仅在结肠病例当中,CRC- 特异性存活分析显示,在对于上述的临床变量调整后 ODC+316SNP 是 CRC- 特异性存活的独立的预测因子。与 ODC GG 结肠癌病例相比,CRC- 特异性的死亡风险 (HR) 对于 ODC GA 基因型是 2.31 (1.15-4.64) 并且对于 ODC AA 基因型是 3.73 (0.93-14.99) (P - 倾向 = 0.006) (表 2)。对这些结肠癌病例的总体存活分析与 CRC- 特异性存活分析一致 (表 2)。在直肠癌病例当中,CRC- 特异性存活分析显示,在对于上述临床变量调整后 ODC+316SNP 不是 CRC- 特异性存活的独立预测因子。与 ODC GG 直肠癌病例 (HR = 1.00, 参照物) 相比,CRC- 特异性死亡风险 (HR) 对于 ODC GA 杂合体是 1.72 (0.83-3.57) 并且对于 ODC AA 纯合体是 1.93 (0.56-6.67) (P - 倾向 = 0.12)。

[0144] 如上面所描述,ODC+316 基因型分布在种族之间存在差异。所观察到的除去偶然以外的死亡率风险可能反映出基于 ODC 基因型的差异,然而风险可能局限于特定的种族群组中。因此在白种人结肠癌病例当中进行多元统计分析,以评价该单一族群组内的基因型-特异性死亡率风险。在 234 个白种人结肠癌病例当中,有 37 个为 CRC- 相关性死亡。多变量 CRC- 特异性存活分析证明,在对于上述相关临床变量调整后,ODC+316SNP 是白种人结肠癌病例当中 CRC- 特异性存活的独立预测因子。与具有 ODCGG 基因型的病例 (HR = 1.00, 参照物) 相比,CRC- 特异性死亡风险 (HR) 对于 ODC GA 基因型是 2.67 (1.22-5.82) 并且对于 ODC AA 基因型是 6.28 (1.46-26.95) (P - 倾向 = 0.0018)。

[0145] 在 CRC 病例当中的基因型-特异性存活差异局限于结肠癌病例中:与 ODC GG 基因型病例 (HR = 1.00, 参照物) 相比,调整的 CRC-SS 风险比 (HR) 对于 ODC GA 病例是 2.31 (1.15-4.64) 并且对于 ODC AA 病例是 3.73 (0.93-14.99) (P - 倾向 = 0.006)。在结肠癌细胞中,侧翼为两个 E- 盒的 ODC+316SNP 预示着 ODC 启动子活性。在培养的细胞中,与主要的 G- 等位基因相比,E- 盒激活剂 c-MYC 和阻抑物 MAD1 和 MAD4 优先结合至次要 A- 等位

基因。

[0146] 基于这种对具有 11 年随访期限的结直肠癌病例的基于种群的分析,观察到,在结肠癌病例当中 +316ODC SNP 与结直肠癌特异性存活有关。在结肠癌病例当中,在对于年龄、性别、种族、肿瘤分期、CRC 家族史、肿瘤部位、组织学、手术治疗、放射治疗和化学治疗调整后,随着每一个额外的 ODC A- 等位基因,即从 ODC GG 至 GA 再至 AA 观察到统计学显著性的 CRC- 特异性死亡率风险增加 (P - 倾向 = 0.006)。

[0147] D. 转录因子的等位基因特异性调节

[0148] 本文提供的实验数据可以洞察我们的临床观察背后可能的生物学机制。我们已经证明,在结肠癌上皮细胞中,ODC+316SNP 具有功能性意义,如通过与包含 G- 等位基因的启动子元件相比,E- 盒转录因子与包含 A- 等位基因的启动子元件的结合增加所证明。激活剂 c-MYC 和阻抑物 MAD1 均表现出,相对于 G- 等位基因而言,对包含 A 等位基因的报告基因元件中的启动子活性的作用更大。这些结果表明,E- 盒转录因子对 ODC 进行等位基因-特异性调节。ODC 蛋白质的酶活性没有受 ODC+316SNP 基因型明显影响,但是我们相信 ODC+316SNP 基因型影响 ODC 转录。

[0149] 在结肠细胞中,已经证明,正常结肠粘膜内表达的野生型 APC 基因的条件性表达抑制 c-MYC 表达并且增加 MAD1 的表达 (Fultz 和 Gerner,2002)。此外,已经报导野生型 APC 可以依赖于 +316SNP 的方式调节 ODC 启动子活性 (Martinez 等人,2003)。野生型 APC 表达于没有罹患 FAP 的个体的表现正常结肠粘膜中,而大多数的散发结肠腺瘤表现出具有突变的或者缺失的 APC (Iwamoto 等人,2000)。MYC 以低水平表达于正常肠粘膜中,但是在 APC^{Min/+}小鼠肠腺瘤中增加。肠上皮 MYC 表达的条件性敲除抑制 APC^{Min/+}小鼠中的肠肿瘤形成 (Ignatenko 等人,2006)。如上所述,我们研究组 (Martinez 等人,2003) 和其它人 (Hubner 等人,2008) 的先前工作证明,在临床预防试验中 ODC A- 等位基因对结肠息肉复发具有保护性作用,尤其是在阿司匹林使用者中。然而,在本文提供的基于群体的研究中,ODCA- 等位基因与差的存活有关。这种表面上的矛盾可通过本文所示的结果解释,这表明两个 E- 盒激活剂和阻抑物选择性地结合 ODC A- 等位基因。发明人推测,在具有 ODC A- 等位基因的个体中,从表达 E- 盒阻抑物的正常上皮向肿瘤上皮的转变被延缓。该作用可能源于多胺合成的抑制。然而,如果转化后的上皮开始表达 E- 盒激活剂 (例如 c-MYC),则癌症进展更有可能在具有 ODC A 基因型的个体中发生。我们得出的结肠癌-特异性死亡率风险的结果与其它人的结果一致,他们的结果表明,由于基因环境相互作用的结果,在特定的个体当中,前列腺癌风险与 ODC A- 等位基因有关 (O'Brien 等人,2004;Visvanathan 等人,2004)。此种结肠癌进展可以归因于多胺合成的增加,这在前列腺癌中已经得到证明 (Simoneau 等人,2008)。

[0150] 例如 ODC SNP 等因素会对癌发生具有促进和抑制两方面作用的这种发现不是唯一的。例如,转化生长因子- β (TGF- β) 在癌发生和癌症进展中具有多方面的作用 (Derynck 等人,2001;Pardali 和 Moustakas,2007;Roberts 和 Wakefield,2003)。在未转化的细胞中 TGF- β 抑制细胞增殖并且诱导凋亡。然而,其在所有人肿瘤中过表达并且与晚期癌进展,特别是肿瘤侵袭和转移有关。报告人结直肠肿瘤中 ODC 活性的单一研究证明,高水平的 ODC 表达与改善的存活明显有关 (Matsubara 等人,1995)。这表明,尽管 ODC 过表达促进人结直肠腺瘤的形成,但是在确定的损害中,ODC 过表达可能导致增殖增加并且与对于抗增殖治疗

的响应改善有关。然而,此项研究没有包含通过 ODC 基因型的层化,因此不知道这些作用是否是 ODC 基因型独立性的。

[0151] 所观察到的 ODC+316SNP 与 CRC- 特异性死亡率之间的相关性局限于结肠癌病例。在结肠癌病例当中,在白种人中观察到特别强的作用。与其它报导相类似,ODC+316SNP 等位基因频率在种族之间具有相当大的差异 (O' Brien 等人,2004)。当发明人限定仅仅对白种人进行存活分析时 (即对于此类分析具有充足能力的唯一种族群体),ODC+316SNP 的相关性是显著性的,并且比对于整个同期组群所观察到的估计值的量值更大。

[0152] 流行病学研究与其它基于群体的分析具有共同的局限性,包括缺乏并存疾病、表现状态和所采用的特定化学治疗方案的资料。此外,从 UC Irvine 的家族性结直肠癌基因-环境研究的参加者得到的组织活检样品是石蜡包埋样品,因此不能用于通过高效液相色谱 (HPLC) 精确评价组织多胺的定量。还存在有利于相对健康组 CRC 存活者的选择偏好的可能性,因为从 CRC 诊断直到研究登记时存在中位值 16 个月的延缓。在本研究中没有说明的影响多胺代谢的其它因素可以解释我们的观察结果。例如,阿司匹林活化多胺乙酰化作用和输出,并且与 ODC A- 等位基因一起作用以降低细胞和组织的多胺含量 (Gerner 等人,2004 ;Martinez 等人,2003 ;Babbar 等人,2006)。

[0153] 总的来说,发明人已经在结肠癌病例中观察到 ODC+316SNP 对 CRC- 特异性死亡率的临床后果。另外,发明人还进一步确立了 ODC+316SNP 对于所述基因在人结肠癌细胞中的 c-MYC- 和 MAD1- 依赖性转录的功能性意义。加在一起,这些实验发现和流行病学发现证明了 ODC+316SNP 在结肠癌进展中的作用,这不同于先前报导的其在结肠腺瘤进展中的作用。这些发现可以用于评价结肠癌进展风险并且可以用于指导患者-特异性药物遗传学管理、监督监测和告知新的二级和三级结肠癌预防的定向方法。

[0154] E. 总结

[0155] 在腺瘤复发的全部模型中对于 ODC1 基因型和治疗检测到统计学显著性的相互作用 ($P = 0.021$),以致于在安慰剂患者当中腺瘤复发模式为:GG-50%,GA-35%,AA-29%,与此相比,依氟鸟氨酸/舒林酸患者中为:GG-11%,GA-14%,AA-57%。在本文中观察到,依氟鸟氨酸和舒林酸在主要 G 纯合 ODC1 基因型患者当中的腺瘤抑制性作用更大,这与先前的报导不同,先前报导表明在携带至少一个 A- 等位基因的接受阿司匹林的 CRA 患者当中腺瘤复发风险降低 (Martinez 等人,2003 ;Barry 等人,2006 ;Hubner 等人,2008)。这些结果证明,ODC1A- 等位基因携带者与 GG 基因型患者相比,对延长接触依氟鸟氨酸和舒林酸的反应不同,A- 等位基因携带者在腺瘤复发方面经历的益处较少,并且潜在地提高了产生耳毒性的风险,尤其是在 AA 纯合子当中。

[0156] VIII. 多态性分析

[0157] 可以使用下面提供的方法,包括在实施例部分描述的特定方法,确定患者 ODC1 启动子基因 +316 位置上的基因型。这些方法可以使用本领域技术人员所采用的分子生物学原理与技术进行进一步的修改和优化。此类原理与技术教导于例如 Small 等人,(2002) 中,该参考文献以引用的方式并入本文。用来鉴定单核苷酸多态性 (SNP) 的一般方法在下面提供。参考文献 Kwok 和 Chen (2003) 以及 Kwok (2001) 提供了对这些方法中的一些方法的概述;这两篇参考文献明确地以引用的方式并入本文。

[0158] 关于 ODC1 的 SNP 可以通过使用这些方法中的任何方法或者其适宜的修改方法表

征。此类方法包括位点的直接或间接测序,使用其中位点的各个等位基因产生或者破坏限制性位点的限制性酶,使用等位基因-特异性杂交探针,使用对多态性的不同等位基因所编码的蛋白质具有特异性的抗体,或者任何其它生物化学判别法。

[0159] A. DNA 测序

[0160] 表征多态性的常用方法是对多态性侧翼和包含多态性的遗传基因座进行直接的 DNA 测序。此种分析可以使用“双脱氧介导的链终止方法”,也称作“Sanger 法”(Sanger 等人,1975)或者“化学降解法”,也称作“Maxam-Gilbert 法”(Maxam 等人,1977)实现。可以采用测序与基因组序列特异性扩增技术,例如聚合酶链式反应的组合,以帮助回收想要的基因(Mullis 等人,1986;欧洲专利申请 50,424;欧洲专利申请 84,796,欧洲专利申请 258,017,欧洲专利申请 237,362;欧洲专利申请 201,184;美国专利 4,683,202;4,582,788;和 4,683,194),上述所有参考文献以引用的方式并入本文。

[0161] B. 核酸外切酶抵抗

[0162] 可以用来确定多态性位点上存在的核苷酸的其它方法采用专门的抗核酸外切酶的核苷酸衍生物(美国专利 4,656,127)。3' 与多态性位点紧邻的等位基因序列的互补性引物与所研究的 DNA 杂交。如果 DNA 上的多态性位点包含与所存在的特定抗核酸外切酶核苷酸衍生物互补的核苷酸,则衍生物将被聚合酶掺入到杂交引物的末端上。此类掺入使得引物抵抗核酸外切酶的切割,并且由此可以检测。由于抗核酸外切酶核苷酸衍生物的身份是已知的,所以人们可以确定 DNA 多态性位点上存在的特定核苷酸。

[0163] C. 微量测序方法

[0164] 已经描述了用于测定 DNA 中多态性位点的数个其它的引物引导的核苷酸掺入方法(Komher 等人,1989;Sokolov,1990;Syvanen 1990;Kuppuswamy 等人,1991;Prezant 等人,1992;Ugozzoli 等人,1992;Nyren 等人,1993)。这些方法依赖于标记的脱氧核苷酸的掺入以辨别多态性位点上的碱基。由于信号与掺入的脱氧核苷酸的量成比例,在队列中出现相同核苷酸的多态性导致出现与队列长度成比例的信号(Syvanen 等人,1990)。

[0165] D. 溶液中延长

[0166] 法国专利 2,650,840 和 PCT 申请 W091/02087 讨论了基于溶液的确定多态性位点的核苷酸的方法。根据这些方法,使用 3' 与多态性位点紧邻的等位基因序列的互补引物。使用标记的双脱氧核苷酸衍生物确定该位点的核苷酸的身份,如果双脱氧核苷酸衍生物与多态性位点的核苷酸互补,则双脱氧核苷酸衍生物掺入到引物的末端。

[0167] E. 遗传单位分析或者固相延长

[0168] PCT 申请 W092/15712 描述了使用标记终止物混合物和 3' 与多态性位点紧邻的序列的互补引物的方法。已经掺入的标记的终止物与正在评价的靶分子的多态性位点上存在的核苷酸互补并且因此可以被鉴定。在这里引物或者靶分子被固定至固相上。

[0169] F. 寡核苷酸连接测定 (OLA)

[0170] 这是使用不同方法学的另一个固相方法(Landegren 等人,1988)。使用能够与靶 DNA 单链相邻序列杂交的两个寡核苷酸。这些寡核苷酸之一被生物素化而另一个进行可检测性标记。如果在靶分子中存在精确互补的序列,则寡核苷酸将杂交,以致于它们的末端邻接并产生连接底物。连接作用使得可以通过使用抗生物素蛋白回收标记的寡核苷酸。也已经描述了基于该方法的与 PCR 结合的有关核酸检测测定法(Nickerson 等人,1990)。在这

里 PCR 用于实现靶 DNA 的指数扩增,然后使用 OLA 检测。

[0171] G. 连接酶 / 聚合酶介导的遗传单位分析

[0172] 美国专利 5,952,174 描述了还包含能够与靶分子紧邻序列杂交的两个引物的方法。在靶标固定于其上的固相支持物上形成杂交产物。在这里发生杂交,以致于引物通过单核苷酸空间彼此分离开。在聚合酶、连接酶和包含至少一个脱氧核苷三磷酸的核苷三磷酸混合物存在下孵育该杂交的产物,使得任意一对相邻的杂交的寡核苷酸发生连接。连接酶的加入产生对于信号产生所必需的两个事件,即延长和连接。这提供比使用单独的延长或者连接的方法更高的特异性和更低的“噪声”,并且与基于聚合酶的测定法不同,该方法通过将其与对于固相上所连信号的第二次杂交和连接步骤相组合,提高了聚合酶步骤的特异性。

[0173] H. 侵入切割反应

[0174] 侵入切割反应可以用于评价细胞 DNA 的特定多态性。称作 INVADER®的技术采用此类反应(例如 de Arruda 等人,2002;Stevens 等人,2003,其以引用的方式并入本文)。通常,存在三种核酸分子:1) 靶位点上游的寡核苷酸(“上游寡核苷酸”),2) 覆盖靶位点的的探针寡核苷酸(“探针”),和 3) 具有靶位点的单链 DNA(“靶”)。上游寡核苷酸和探针不重叠,但是它们包含连续的序列。探针包含供体荧光团,例如荧光素,和受体染料,例如 Dabcyl。上游寡核苷酸 3' 末端的核苷酸与探针-靶双链体的第一个碱基对重叠(“侵入”)。然后探针被结构特异性的 5' 核酸酶切割,导致荧光团 / 猝灭剂对分开,这增加了可以检测的荧光的量。见 Lu 等人,2004。

[0175] 在一些情况中,在固体表面上或者以阵列形式进行测定法。

[0176] I. 检测 SNP 的其它方法

[0177] 用于多态性检测和鉴定的数个其它特异性方法在下面给出,并且可以照此使用,或者以与鉴定本发明的 ODC1 基因多态性联合的适宜修改后使用。数个其它方法还描述于位于互联网站点 ncbi.nlm.nih.gov/SNP 上的 NCBI 的 SNP 网站上,其以引用的方式并入本文。

[0178] 在特定的实施方案中,可以确定群体中任何特定的基因座上的扩展单元型,这使得人们可以精确地鉴定哪一个 SNP 将是冗余的并且哪一个将是相关研究中所必需的。后者被称为“单元型标签 SNP(htSNP)”,标记着连锁不平衡基因或区域的单元型的获得。对于示例性方法参见 Johnson 等人(2001)以及 Ke 和 Cardon(2003),每一文献以引用的方式并入本文。

[0179] VDA 测定法采用了通过使用 TaKaRa LA Taq 试剂和其它标准反应条件的长 PCR 方法对基因组片段的 PCR 扩增。长扩增可以扩增大约 2,000-12,000bp 的 DNA 大小。产物与变量检测阵列(VDA)的杂交可以由 Affymetrix 高通量筛选中心完成并且使用计算机化软件分析。

[0180] 称作 Chip 测定法的方法使用通过标准或长 PCR 方案的基因组片段的 PCR 扩增。杂交产物通过 VDA 分析,Halushka 等人(1999),以引用的方式并入本文。基于杂交方式的计算机分析,通常将 SNP 归类于“确定的”或者“可能的”。通过与备选的检测方法例如核苷酸测序相比较,通过该方法“确定的”SNP 已经 100%得到证实;并且“可能的”SNP 已经 73%得到证实。

[0181] 其它方法仅包含在用有关限制性酶消化之后的 PCR 扩增。然而其它方法包含从已知基因组区域纯化的 PCR 产物的测序。

[0182] 在另一方法中,各个外显子或者大外显子的重叠片段被 PCR 扩增。从公开的或者数据库序列设计引物,并且使用下列条件进行基因组 DNA 的 PCR 扩增:200ng DNA 模板,0.5 μ M 的每一种引物,80 μ M 的每一种 dCTP、dATP、dTTP 和 dGTP,5% 甲酰胺,1.5mM $MgCl_2$,0.5U 的 Taq 聚合酶和 0.1 体积的 Taq 缓冲液。进行热循环并且通过在多种条件(例如含 15% 尿素,含或不含 5% 甘油的 5% 或 10% 聚丙烯酰胺凝胶)下的 PCR-单链构象多态性(PCR-SSCP)分析来分析所得到的 PCR 产物。电泳过夜。将显示迁移率有变化的 PCR 产物重新扩增并测序以鉴定核苷酸变异。

[0183] 在称作 CGAP-GAI (DEMIGLACE) 的方法中,将序列和比对数据(来自 PHRAP. ace 文件)、对于序列碱基调用的质量评分(来自 PHRED 质量文件)、距离信息(来自 PHYLIP dnadist 和邻近程序)和碱基调用数据(来自 PHRED' -d' 开关)加载到存储器中。将序列比对并检查所得到配对中每一垂直记忆单位(“程序片(slice)”)的不一致性。任何此类的程序片被考虑为候选的 SNP (DEMIGLACE)。DEMIGLACE 使用许多过滤器以去除不可能代表真实多态性的程序片。这些过滤器包括下列的过滤器:(i) 将邻近序列质量评分下降 40% 或更多的任何特定程序片中的序列排除在 SNP 之外;(ii) 排除其中对于该核苷酸类型峰值低于所有碱基调用第 15 百分位数的调用;(iii) 排除与参加 SNP 计算的共有序列具有大量不一致的序列的区域;(iv) 去除具有其中峰值占调用峰值面积达 25% 或更高的替代调用的任何碱基调用;(v) 排除仅在一个阅读方向上出现的变化。PHRED 质量评分被转变成程序片中每一核苷酸的误差概率值。使用标准的 Bayesian 方法计算后验概率,这是特定位置上为核苷酸异质性的证据。

[0184] 在称作 CU-RDF (RESEQ) 的方法中,使用每一 SNP 的特异性引物从分离自血液的 DNA 进行 PCR 扩增,并且在标准的清除方案以去除未使用的引物和游离核苷酸之后,使用相同的引物或者巢式引物进行直接的测序。

[0185] 在称作 DEBNICK (METHOD-B) 的方法中,对簇 EST 序列进行全面的分析并通过基于荧光的 DNA 测序证实。在称作 DEBNICK (METHOD-C) 的相关的方法中,对如下的簇 EST 序列进行全面分析:错配位点上 phred 质量 > 20,在 SNP 的 5' 侧翼和 3' 的 5 个碱基中平均 phred 质量 $\geq$ 20,SNP 的 5' 和 3' 的 5 个碱基中没有错配,每一等位基因至少出现两次,并通过检查迹线证实。

[0186] 在标识为 ERO (RESEQ) 的方法中,对于电子公布的 STS 设计新的引物组并用于从 10 个不同的小鼠品系中扩增 DNA。然后将来自每一品系的扩增产物通过凝胶纯化,并使用利用 ^{33}P - 标记的终止物的标准双脱氧循环测序技术测序。然后将所有的 ddATP 终止反应加载在测序凝胶的邻近泳道中,然后是所有的 ddGTP 反应等等。通过扫描放射线照片显色鉴定 SNP。

[0187] 在标识为 ERO (RESEQ-HT) 的另一方法中,对于电子公布的鼠 DNA 序列设计新的引物组并用于从 10 个不同的小鼠品系扩增 DNA。从每一品系制备扩增产物用于通过以核酸外切酶 I 和虾碱性磷酸酶处理来测序。测序使用 ABI Prism Big Dye Terminator Ready Reaction 试剂盒 (Perkin-Elmer) 进行并且序列样品在 3700DNA 分析仪 (96 毛细管测序仪) 上运行。

[0188] FGU-CBT (SCA2-SNP) 标识为使用引物 SCA2-FP3 和 SCA2-RP3 进行 PCR 扩增包含 SNP 的区域的方法。大约 100ng 的基因组 DNA 在包含终浓度 5mM Tris、25mM KCl、0.75mM MgCl₂、0.05% 明胶、20pmol 每一引物和 0.5U Taq DNA 聚合酶的 50ml 反应体积中扩增。样品变性、复性并延伸,并且使用例如 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从自琼脂糖凝胶上切下的条带中纯化 PCR 产物,并且使用染料终止物化学在 ABI Prism 377 自动 DNA 测序仪上使用 PCR 引物进行测序。

[0189] 在标识为 JBLACK (SEQ/RESTRICT) 的方法中,使用基因组 DNA 进行两个独立的 PCR 反应。来自第一次反应的产物通过测序分析,表明具有唯一的 FspI 限制位点。通过用 FspI 消化证实第二次 PCR 反应产物中的突变。

[0190] 在描述为 KWOK (1) 的方法中,通过比较利用 PCR 产物直接 DNA 测序与染料终止物化学而自四个随机选择个体获得的高质量的基因组序列数据来鉴定 SNP (参见 Kwok 等人, 1996)。在标识为 KWOK (2) 的相关方法中,通过比较来自重叠的大插入片段克隆 (例如细菌人工染色体 (BAC) 或者基于 P1 的人工染色体 (PAC)) 的高质量基因组序列数据鉴定 SNP。然后将包含该 SNP 的 STS 显色并且通过汇总 DNA 测序证实多种群体中 SNP 的存在 (参见 Taillon-Miller 等人, 1998)。在称作 KWOK (3) 的另一个相似方法中,通过比较来自重叠大插入片段克隆 BAC 或者 PAC 的高质量基因组序列数据鉴定 SNP。通过该方法发现的 SNP 代表着在两个供体染色体之间存在的 DNA 序列变异,但是仍不能确定一般群体中的等位基因频率。在方法 KWOK (5) 中,通过比较由 PCR 产物直接 DNA 测序与染料终止物化学而自纯合 DNA 样品和一个或多个汇总 DNA 样品获得的高质量基因组序列数据鉴定 SNP。所使用的 STS 从公众可获得的数据库中存在的序列数据产生。特别地,这些 STS 通过针对在所有基因座纯合的完全性葡萄胎 (CHM) 和来自 80 名 CEPH 双亲的 DNA 样品汇总的 PCR 来扩增 (参见 Kwok 等人, 1994)。

[0191] 在另一个此类方法 KWOK (OverlapSnxDetectionWithPolyBayes) 中,通过对大插入片段人基因组克隆序列重叠区的自动计算机分析发现 SNP。对于数据采集,克隆序列直接从大规模测序中心得到。这是必需的,因为碱基质量序列在 GenBank 中不存在 / 不可获得。原始数据加工包含分析克隆序列和伴随碱基质量信息的一致性。没有相关碱基质量序列的完成的 (“碱基正确”, 错误率低于 10,000bp 中有 1 个) 序列被指定为一致的碱基质量值 40 (10,000bp 中有 1 个的错误率)。没有碱基质量值的初稿序列被拒绝。处理后的序列加入到局部数据库中。具有屏蔽的已知人重复的每一序列版本也被储存。使用程序 “MASKERAID” 进行重复屏蔽。重叠检测: 使用程序 “WUBLAST” 检测假定的重叠。随后是数个过滤步骤,以便消除与真的重叠相对的假重叠检测结果,即由于序列复制而产生的在一对克隆序列之间存在相似性。在具有高碱基质量值 “高质量错配” 的核苷酸之间存在重叠总长度、总体相似性百分数、序列数量的差异。结果还与在华盛顿大学基因组测序中心的基因组克隆的限制性片段作图结果 finisher' s reports on overlaps, 以及在 NCBI 的序列重叠群构建结果相比较。SNP 检测: 使用 “POLYBAYES” SNP 检测软件分析重叠的克隆序列对的候选 SNP 位点。在序列对之间的序列差异被评分为代表真正序列变异相对测序错误的概率。该过程需要两个序列皆存在碱基质量值。高评分候选物被提出。搜索局限于取代类型碱基对变异。通过 POLYBAYES 软件计算候选 SNP 的置信度评分。

[0192] 在标识为 KWOK (TaqMan 测定法) 的方法中, TaqMan 测定法用于确定 90 个随机

个体的基因型。在标识为 KYUGEN(Q1) 的方法中,所标明群体的 DNA 样品被汇总并通过 PLACE-SSCP 分析。在汇总分析中每一等位基因的峰高被杂合体中的那些所校正,并且随后用于等位基因频率的计算。高于 10% 的等位基因频率通过该方法可以可靠地定量。等位基因频率 = 0 (零) 意味着在个体当中存在等位基因,但是在检查汇总物时不能看到相应的峰。等位基因频率 = 0-0.1 表明在汇总物中检测到次要等位基因,但是峰太低而不能可靠地定量。

[0193] 在标识为 KYUGEN(方法 1) 的另一方法中,PCR 产物用荧光染料进行后标记并通过 SSCP 条件下的自动毛细管电泳系统 (PLACE-SSCP) 分析。在一系列实验中使用或者不使用两个汇总的 DNA (日本人汇总 DNA 和 CEPH 双亲汇总 DNA) 分析四个或者更多个个体 DNA。通过目测检查鉴定等位基因。具有不同基因型的个体 DNA 被测序并鉴定 SNP。在使用杂合体中的峰高对信号偏移校正后,从汇总样品中的峰高估计等位基因频率。对于 PCR,引物被标记,在它们的末端具有 5' -ATT 或者 5' -GTT,以便于双链的后标记。在包含缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH 8.3 或 9.3, 50mM KCl, 2.0mM MgCl₂)、0.25 μM 每一引物、200 μM 每一 dNTP 和与抗 Taq 抗体预混合的 0.025 单位 / μl Taq DNA 聚合酶的反应混合物中扩增 DNA 样品 (10ng/ μl)。通过 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段的交换反应,使用以 R110 和 R6G 修饰的核苷酸差异性地标记 PCR 产物的两个链。通过加入 EDTA 终止反应,并且通过加入小牛肠碱性磷酸酶将未掺入的核苷酸去磷酸化。对于 SSCP:等分试样的荧光标记 PCR 产物和 TAMRA 标记的内标加入去离子甲酰胺中并且变性。使用 ABI Prism 310 遗传分析仪在毛细管中进行电泳。Genescan 软件 (P-E Biosystems) 用于数据收集和数据处理。个体 (2 个至 11 个) 的 DNA,包括在 SSCP 上显示不同基因型的那些个体 DNA,使用 big-dye 终止物化学在 ABI Prism 310 测序仪上直接测序。从 ABI Prism 310 得到的多序列迹线文件通过 Phred/Phrap 处理和比对并且使用 Consed 查看器查看。通过 PolyPhred 软件和目视检测鉴定 SNP。

[0194] 在标识为 KYUGEN(方法 2) 的另一方法中,通过变性 HPLC (DHPLC) 或者 PLACE-SSCP (Inazuka 等人,1997) 搜索具有不同基因型的个体,并且确定它们的序列以鉴定 SNP。使用在其末端以 5' -ATT 或者 5' -GTT 标记的引物进行 PCR,以便对双链进行后标记。使用 WAVE DNA 片段分析系统 (Transgenomic) 进行 DHPLC 分析。将 PCR 产物注入 DNasep 柱中,并在所确定的条件下使用 WAVEMaker 程序 (Transgenomic) 分离。通过 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段的交换反应,使用以 R110 和 R6G 修饰的核苷酸差异性地标记 PCR 产物的两个链。通过加入 EDTA 终止反应,并且通过加入小牛肠碱性磷酸酶将未掺入的核苷酸去磷酸化。在 SSCP 之后使用 ABI Prism 310 遗传分析仪在毛细管中进行电泳。Genescan 软件 (P-E Biosystems)。个体的 DNA,包括在 DHPLC 或者 SSCP 上显示不同基因型的那些个体 DNA,使用 big-dye 终止物化学在 ABI Prism 310 测序仪上直接测序。从 ABI Prism 310 得到的多序列迹线文件通过 Phred/Phrap 处理和比对并且使用 Consed 查看器查看。通过 PolyPhred 软件和目视检测鉴定 SNP。Unigene 中 EST 序列的迹线色谱图数据用 PHRED 处理。为了鉴定可能的 SNP,从对于每一 Unigene 簇通过程序 PHRAP、BRO 和 POA 产生的多重序列比对报告单碱基错配。BRO 校正可能的错误报告的 EST 定位,而 POA 鉴定和分析预示着将产生假 SNP 的基因混合 / 嵌合体的非线性对准结构。Bayesian 推理用于权衡对于真正多态性对比测序错误、未对准或者错度的、错聚的或者嵌合 EST 序列的证据,评价数据例如原始色谱图高度、锐度、重叠和间隔;测序错误率;背景敏感性;cDNA 文库来源等。

[0195] IX. 药物制剂和施用途径

[0196] 本公开书的治疗化合物可以通过多种方法施用,例如经口或者通过注射(例如皮下、静脉内、腹膜内等)。依赖于施用的途径,可将活性化合物在材料中包被,以保护化合物不被酸和会使化合物失活的其它天然条件作用。它们还可以通过疾病或创伤部位的连续灌流/输注施用。

[0197] 为了通过除肠胃外施用方式之外的方式施用治疗化合物,有必要将化合物用保护它们不失活的材料包被,或者将化合物与所述材料共施用。例如,治疗化合物可以在适当的载剂如脂质体或稀释剂中向患者施用。药学上可接受的稀释剂包括生理盐水和水性缓冲液。脂质体包括水包油包水 CGF 乳液以及常规的脂质体 (Strejan 等人,1984)。

[0198] 治疗化合物还可以经肠胃外、腹膜内、椎管内或大脑内施用。可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中和在油中制备分散液。在常规的储存和使用条件下,这些制剂会包含防腐剂以阻止微生物生长。

[0199] 适合注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(当为水溶性时)或分散液以及用于临时制备无菌的可注射溶液或分散液的无菌散剂。在所有情况下,组合物必须是无菌的并且必须是存在可容易注射程度的流体。它必须是在制造和储存条件下稳定的并且必须进行防腐处理以防止微生物如细菌和真菌的污染作用。载剂可以是溶剂或分散媒介物,包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等等)、它们的适宜混合物和植物油。可以通过使用包衣如卵磷脂、通过维持所需要的颗粒大小(在分散剂的情况下)和通过使用表面活性剂维持适当的流动性。防止微生物的作用可以通过多种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等等实现。在许多情况下,在组合物中包含等渗剂如糖、氯化钠或多元醇如甘露醇和山梨糖醇将更好。延长可注射组合物的吸收可以通过在组合物中包含延缓吸收的试剂如单硬脂酸铝或明胶实现。

[0200] 无菌可注射溶液可如下制备,即在适当溶剂中将所需量的治疗化合物根据需与上述成分中的一种或组合相混合,然后过滤除菌。通常,分散剂通过将治疗化合物混合入无菌载剂中制备,其中所述无菌载剂包含基本的分散媒介物和需要的来自上面所列举的其它成分。以用于制备无菌可注射溶液的无菌散剂为例,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,这样可获得活性成分(即治疗化合物)加上来自其先前无菌过滤溶液的任何额外预期成分的散剂。

[0201] 治疗化合物可以经口施用,例如,与惰性稀释剂或可同化的可食载剂一起。治疗化合物和其它成分还可以包封在硬壳或软壳明胶胶囊中,压制成片剂或者直接掺入到受试者食物中。对于口服治疗施用,治疗化合物可以与赋形剂混合并且以可吸收片剂、颊含片、锭剂、胶囊剂、酏剂、混悬剂、糖浆剂、薄片(wafer)等等形式使用。当然,治疗化合物在组合物和制剂中的百分数是可变的。治疗化合物在此类治疗用途组合物中的量导致将得到适宜的剂量。

[0202] 特别有利的是配制成容易施用和剂量均一的单位剂量形式的肠胃外组合物。如本文所使用,单位剂量形式指适宜作为用于待治疗受试者的单一剂量的物理不连续单位;每一单位包含经计算产生预期治疗效果的预定量的治疗化合物以及与之结合的所需要的药物载剂。本发明的单位剂量形式的规格决定于并直接依赖于(a)治疗化合物的独特特征和待实现的特定治疗效果,和(b)本领域中将用于治疗所选择患者疾病的此类治疗化合物进

行化合的固有局限性。

[0203] 治疗化合物还可以局部施用至皮肤、眼或粘膜。备选地,如果希望局部递送至肺,则治疗化合物可通过吸入干粉末或气溶胶制剂施用。

[0204] 活性化合物以足以治疗与患者病症相关的病症的治疗有效量施用。例如,化合物的功效可以在动物模型系统如实施例和附图中所示模型系统中评估,所述动物模型系统可预测治疗人疾病的功效。

[0205] 向受试者施用的本公开书的化合物或包含本公开书的化合物的组合物的实际剂量可以通过物理因素和生理因素,如年龄、性别、体重、疾病的严重性、待治疗疾病的类型、先前或并行的治疗干预、受试者的特发症和施用途径确定。这些因素可以由熟练的技术人员确定。负责施用的从业者将典型地确定组合物中一种或多种活性成分的浓度和个体受试者的一个或多个适宜剂量。如果发生了任何并发症,各个医生可调整剂量。

[0206] 在持续一天或数天的每天一次或多次剂量施用中,有效量典型地会从约 0.001mg/kg 至约 1,000mg/kg、从约 0.01mg/kg 至约 750mg/kg、从约 100mg/kg 至约 500mg/kg、从约 1.0mg/kg 至约 250mg/kg、从约 10.0mg/kg 至约 150mg/kg 变化(当然取决于施用模式和上述因素)。其它适宜的剂量范围包括 1mg 至 10,000mg/天、100mg 至 10,000mg/天、500mg 至 10,000mg/天和 500mg 至 1,000mg/天。在一些特定实施方案中,数量小于 10,000mg/天,范围为 750mg 至 9,000mg/天。

[0207] 有效量可以小于 1mg/kg/天、小于 500mg/kg/天、小于 250mg/kg/天、小于 100mg/kg/天、小于 50mg/kg/天、小于 25mg/kg/天或者小于 10mg/kg/天。备选地是 1mg/kg/天至 200mg/kg/天的范围。例如,对于糖尿病患者的治疗,单位剂量可以是与未治疗受试者相比减少血液葡萄糖至少 40%的量。在另一实施方案中,单位剂量是将血液葡萄糖减少至非糖尿病受试者血液葡萄糖水平 $\pm 10\%$ 水平的量。

[0208] 在其它非限定性实例中,剂量还可以包括从每次施用约 1 μ g/kg/体重、约 5 μ g/kg/体重、约 10 μ g/kg/体重、约 50 μ g/kg/体重、约 100 μ g/kg/体重、约 200 μ g/kg/体重、约 350 μ g/kg/体重、约 500 μ g/kg/体重、约 1mg/kg/体重、约 5mg/kg/体重、约 10mg/kg/体重、约 50mg/kg/体重、约 100mg/kg/体重、约 200mg/kg/体重、约 350mg/kg/体重、约 500mg/kg/体重至约 1,000mg/kg/体重或更高,以及可从其中导出的任何范围。在从上面所列数值所导出范围的非限定性实例中,基于上述数值可以施用约 5mg/kg/体重至约 100mg/kg/体重,约 5 μ g/kg/体重至约 500mg/kg/体重等的范围。

[0209] 在某些实施方案中,本公开书的药物组合物可以包含例如至少约 0.1%的本公开书的化合物。在另外的实施方案中,本公开书的化合物可以包括约 2%至约 75%间的重量单位或者约 25%至约 60%间的重量单位,和可从中导出的任何范围。

[0210] 考虑了试剂的单次剂量或多次剂量。对于多次剂量递送的预期时间间隔可由本领域普通技术人员仅采用常规实验即可确定。例如,受试者可以以近似 12 小时的间隔每日施用两次剂量。在一些实施方案中,试剂每天施用一次。

[0211] 一种或多种试剂可以以常规时间表施用。如本文所使用,常规时间表指预先设定的时间阶段。常规时间表可以包括在长度上相同或者不同的时间阶段,只要时间表是预设的即可。例如,常规时间表可以包括如下每天两次、每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每月一次或者它们当中数天或数周的任何

设定数值施用。备选地,预定的常规时间表可以包括在第一周每天两次施用,接着的数月内每天一次施用等。在另外的实施方案中,本发明提供了,一种或多种试剂可以经口摄入并且其时间点依赖于或不依赖于食物摄入。因此,例如,试剂可以每天早上和 / 或每天晚上摄入,而不管何时受试者进食或将进食。

[0212] X. 联合治疗

[0213] 有效的联合治疗可以使用单一组合物或包含两种试剂的药物制剂,或者同时施用两种不同的组合物或制剂实现,其中一种组合物包含本公开书的化合物,并且另一种包含一种或多种第二试剂。备选地,治疗可以以数分钟至数月的间隔先于或后于其它试剂治疗。

[0214] 可以采用多种组合,例如当“A”表示第一试剂(例如DFMO)并且“B”表示第二试剂(例如舒林酸)时,其非限定性实例描述如下:

[0215] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/BB/A/B/B

[0216] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/AB/B/A/A

[0217] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/AA/A/B/A

[0218] XI. 实施例

[0219] 包含下列实施例以说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应该认识到,附随实施例中公开的技术代表着本发明人公开的、在实施本发明中良好工作的技术,并且因此可以认为构成本发明实施的优选模式。然而,本领域技术人员将意识到,依据本公开书,可以在不脱离本发明精神和范围情况下在所公开特定实施方案中做出许多改变,并且仍然能得到相同或类似结果。

[0220] 实施例 1- 流行病学研究:与 CRC- 特异性存活有关的 ODC+316SNP

[0221] 实验设计:研究包含来自 UC Irvine 的基于群体的家族 CRC 基因-环境研究的 440 名新发 CRC 病例(于 1994-1996 年诊断,随访至 2008 年 3 月)。主要的结果是依赖于 ODC 基因型(GG 对 AA/GA)的 CRC- 特异性存活(CRC-SS)。在人结肠癌细胞系中,通过 western 印迹和染色质免疫沉淀(CHIP)测定法确定 E- 盒转录因子的 ODC 等位基因特异性结合。使用启动子构建体与表达转录激活剂 c-MYC 或者阻抑物 MAD1 的载体的组合确定 ODC 等位基因特异性启动子活性。

[0222] 结果:在 CRC 病例当中基因型特异性存活差异局限于结肠癌病例中:与 ODC GG 基因型病例相比(HR = 1.00, 参照物),调整的 CRC-SS 风险比(HR)对于 ODC GA 病例是 2.31(1.15-4.64)并且对于 ODC AA 病例是 3.73(0.93-14.99)(P- 倾向 = 0.006)。在结肠癌细胞中,侧翼为两个 E- 盒的 ODC+316SNP 预示着 ODC 启动子活性。在培养细胞中,与主要 G- 等位基因相比, E- 盒激活剂 -MYC 和阻抑物 MAD1 和 MAD4 优先结合次要 A- 等位基因。

[0223] 研究群体. 我们研究了在 1994-1996 年期间登记进入加利福尼亚大学欧文分校的家族性结直肠癌基因-环境研究(Peel 等人, 2000; Zell 等人, 2007) 并随访至 2008 年 3 月的侵入 CRC 新发病例。设计双亲研究以确定在基于大群体的结直肠癌病例同期组群中的 HNPCC 发病率。使用 2008 年 4 月的数据文件通过 Cancer Surveillance Program of Orange County/San Diego Imperial Organization for Cancer Control 的基于群体的癌症登记确定参加者。在双亲研究中(Peel 等人, 2000), 确定了从 1994 至 1996 年在 Orange County, CA 以所有年龄诊断为 CRC 的所有受试者。还确定了在 1994 年和 1995 年之间在 San Diego 和 Imperial Counties, CA 以年龄 < 65 岁诊断的所有受试者。然后联系病人看他们是否适合

研究（在确定的时间时还活着并且具有联系地址）以及他们的医师是否拒绝同意联系。在研究登记时，病人签署同意书同意抽血和披露医学信息。此项研究得到 UC Irvine 伦理审查委员会的批准（#93-257）。临床和人口数据，包括生存状态和随访，通过链接至如先前描述的区域癌症登记数据库得到（Peel 等人，2000；Zell 等人，2007；Zell 等人，2008）。肿瘤、结节、转移癌（TNM）分期确定来自现存的可利用的 AJCC 码和疾病码的转换程度，如先前所报导（Le 等人，2008）。在一级亲属中的癌症家族史通过在登记时进行的电话访视过程中的自我报告确定（Zell 等人，2008；Ziogas 和 Anton-Culver，2003）。如通过阿姆斯特丹标准确定的具有遗传性非息肉病结肠癌（HNPCC）的 22 个病例被辨别出并排除在分析之外。从 CRC 诊断到研究登记（即家族病史访视日）的中值时间是 16 个月（95% CI 12-23 个月）。

[0224] DNA 提取和 ODC+316 SNP 基因分型。使用 QIAGEN QIAamp DNAMidi 或者 Mini 试剂盒（Qiagen）按照生产商的说明书从 2.0mL 红细胞凝集样品中提取 DNA。使用被设计用于扩增包含 +316 位置多态性碱基的 172-bp 片段的寡核苷酸引物进行 ODC+316SNP 的基因分型（Applied Biosystems, Foster City, CA）。使用不同的 5' 标记物（6-羧基荧光素或者 VIC）和相同的 3' 猝灭剂染料（6-羧基四甲基罗丹明）合成等位基因特异性 TaqMan 探针（23）。每一 PCR 反应（总共 5 μ L）包含 10ng 参加者 DNA，30pmol 每一引物，12.5pmol 每一 TaqMan 探针，和 1 $\times$ TaqMan Universal PCR Master Mix（Applied Biosystems, Foster City, CA），如先前所报导（Martinez 等人，2003；Guo 等人，2000）。

[0225] 统计学分析 - 基于群体的研究。基于估计的 ODC GG 基因型与 ODCGA/AA 基因型的 1 : 1 比率确定样本大小（Martinez 等人，2003；Barry 等人，2006；Hubner 等人，2008；Guo 等人，2000）。对来自 UC Irvine 的家族 CRC 基因 - 环境研究的 1154 个结肠和直肠癌病例的资料的先前分析显示 10 年 CRC- 特异性存活大约为 66%（Zell 等人，2008）。发明人提出，对于我们的样本大小计算，仅基于 ODC 基因型的 CRC- 特异性存活具有 15% 或更大的差异。因此，总共 315 个受试者需要以具有 80% 把握度的 5% 显著性水平检测所提出的两组之间的 10 年 CRC- 特异性存活差异：组 1 中 55% 对组 2 中 70%。481 个 DNA 样品中有 440 个样品被成功地进行了基因分型。因为 DNA 浓度低和 / 或 DNA 质量差，所以有 41 个病例（8.5%）未能确定 ODC+316 基因型，然而在成功进行基因分型的病例和未成功进行基因分型的病例之间没有观察到临床病理学差异。因此研究充分有力地解决主要终点。

[0226] 在结肠和直肠癌病例当中的人口统计、临床和病理学变量使用皮尔森卡方统计学（Pearson chi-square statistic）或者用于名义变量的 Fisher 精确检验和用于连续变量的 Student t- 检验来比较。结直肠癌 - 特异性存活被定义为源于 CRC 自身的死亡率，并且在下列情况下存在数据删改：在随访结束时还活着，随访失败，或者死于 CRC 之外的任何原因。总体的存活（OS）以源于任何原因的死亡率定义。使用 Kaplan-Meier 方法构建结肠和直肠癌病例的存活曲线，并用单变量分析的对数秩检验进行分析。使用距诊断的时间对于所有的 CRC 病例、结肠癌病例和直肠癌病例进行 Cox 比例风险建模，以基于 ODC 基因型描绘调整的总体风险和 CRC 特异性死亡。在 Cox 模型中分析了 ODC 基因型（GG，GA 或者 AA）对存活的影响，其中对于下列协变量做了调整：年龄、性别、种族、CRC 家族病史、诊断时 TNM 分期、结肠内的肿瘤部位、组织学亚型、手术治疗、放射治疗和化学治疗。模型中的每一变量使用哑变量编码。所有分析使用 SAS 9.2 统计学软件（SAS Institute, Cary, NC）进行。统计学显著性假设为 2 尾 P 值 < 0.05。

[0227] 实施例 2- 实验研究 : 结肠癌细胞中的 ODC+316SNP 调节

[0228] 细胞培养 . 人结肠癌细胞系 HT29 和 HCT116 维持在 McCoy's 5A 培养基中 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。所使用的所有培养基添加有 10% FBS 加 1% 青霉素 / 链霉素溶液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。培养保持在 37℃ 下 5% CO₂ 的湿润环境中。

[0229] 基因分型测定 . 来自 HT29 和 HCT116 细胞的 DNA 样品经过 PCR-RFLP 过程以检测多态性 PstI 位点。使用下列引物通过 PCR 扩增序列 : 5'-TCTGCGCTTCCCCATGGGGCT-3' (SEQ ID NO :1) 和 5'-TTTCCCAACCCTTCG-3' (SEQ ID NO :2)。每一反应在 25 μ l 终体积中包含 1 μ l DNA, 4pmol 每一引物, 12.5 μ l 2 $\times$ PCR PreMixes 缓冲液 "G" (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI) 和 0.5 单位 Taq DNA 聚合酶。预期的 PCR 产物大小是 351bp。在扩增后, 10-20 μ l 的 PCR 产物用 30 μ l 中的 10 单位 PstI 在 37℃ 下消化 2 小时。来自 HT29 细胞的 DNA (GA) 包含 PstI 位点, 消化后得到 156 和 195bp 两个片段。

[0230] Western 印迹分析 . 收获细胞并裂解, 蛋白质在 12.5% SDS-PAGE 凝胶上分离。通过电泳将蛋白质转移至 Hybond-C 膜上。膜用 Blotto A (在 TTBS 溶液中 5% 封闭级别的奶粉) 封闭并且使用 Blotto A 中 1 : 300 稀释的一级抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 探测。一级抗体于 4℃ 下孵育过夜, 然后用适宜的 HRP- 标记的二级抗体 (1 : 1000 稀释) 在室温下孵育 1 小时。使用 ECL Western 检测试剂 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 进行化学发光检测并用 Biomax XAR 胶片 (Kodak) 曝光。

[0231] 染色质免疫沉淀 (CHIP). 使用商品化试剂盒, 如生产商所推荐 (Upstate Biotech, Lake Placid, NY, 美国) 进行 CHIP 测定。简言之, 细胞用 1% 甲醛处理以将 DNA 和蛋白质交联, 并且通过超声将 DNA- 蛋白质复合体打断成 200 至 1000bp 之间的长度。裂解液用包含蛋白酶抑制剂的免疫沉淀 (IP) 稀释缓冲液稀释 10 倍。抗 c-MYC, MAD1 和 MAD4 的抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 用于沉淀染色质, 而另外留下样品作为阴性抗体 (-Ab) 对照。在 4℃ 旋转情况下将样品免疫沉淀过夜。通过加入 60 μ l 鲑精 DNA/ 蛋白质 A 琼脂糖浆体并于 4℃ 旋转情况下孵育 1 小时然后温和离心 (1000rpm, 1 分钟) 得到免疫复合物。蛋白质 A 琼脂糖沉淀用低盐缓冲液、高盐缓冲液、LiCl 缓冲液和 TE 缓冲液洗涤。然后通过加入 250 μ l 洗脱缓冲液 (0.1M NaHCO₃, 1% SDS) 两次将复合物洗脱, 并且使用 0.2M NaCl 通过将所有样品, 包括输入 DNA 和 -Ab DNA 对照, 在 65℃ 下加热 4 小时将 DNA- 蛋白质交联逆转。DNA 重悬于 30 μ l ddH₂O 中。为了观测 PCR 产物及其大小, 进行标准的 PCR 反应。用于 PCR 的 ODC 引物序列是 5' -CCTGGGCGCTCTGAGGT-3' (SEQ ID NO :3) (17mer) 和 5' -AGGAAGCGGCGCCTCAA-3' (SEQ ID NO :4) (17mer)。使用 TaqMan 基因表达测定试剂盒 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 在 ABI7700 序列检测系统上进行定量实时 PCR。对于计算相对结合的细节可以在生产商的网站上 (<http://www.appliedbiosystems.com/>) 找到。

[0232] 瞬时转染 . 使用 LipofectAMINE 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 根据生产商的方案进行瞬时转染, 如在增补文件中所详细描述。HCT116 和 HT29 细胞以 1 μ g pGL3-ODC/A 或 pGL3-ODC/G 质粒 (Martinez 等人, 2003) 连同 0.01 μ g 海肾-TK 质粒一起转染。海肾-TK 质粒购自 Promega (Madison, WI) 并在所有启动子-报告基因转染实验中用作转染效率对照。对于 c-MYC 实验, ODC pG L3- 质粒与 pcDNA 3.0 或 CMV-c-MYC 表达载体 (OriGene, Rockville, MD) 共转染。对于 MAD1 实验, ODC 质粒与 pcDNA 3.1 或 pcDNA-MAD1 共转染。对

于 c-MYC 和 MAD1 共转染,制备包含克隆入 pGL3 载体中的 ODC 基因第一个 1.6Kb 的 ODC 启动子报告基因构建体。构建体包含完整的 (wt E-盒 1) 或者缺失的 (mut E-盒 1)E-盒 1(-485 至 -480bp)。此外,使用 +316ODC SNP 的两个变体,产生总共 4 个不同的构建体。在 6 小时的孵育之后,向细胞添加包含 20% FBS 的完全培养基,并生长过夜。转染后第二天,用包含 10% FBS 的培养基替换包含 20% FBS 的完全培养基。转染后 48 小时,细胞用 PBS 洗涤并在双荧光素酶测定试剂盒中的 Passive Lysis 缓冲液 (Promega, Madison, WI) 中裂解。如生产商所描述,使用 Turner Designs TD-20/20 发光计测量双荧光素酶活性,并且表示为相对荧光素酶单位 (RLU)。实验一式三份进行并重复至少 2 次。

[0233] 统计学分析 - 实验研究. 对于瞬时转染实验,使用双样品 t-检验 (Microsoft Excel Microsoft Corp., Redmond, WA)。使用差异在于第一个 E-盒元件存在与否的 ODC 启动子构建体检查 c-MYC 表达对 HT29 结肠癌细胞中 ODC 等位基因特异性启动子活性的影响: (a) 野生型 (wt)E-盒 1+316G, (b) 突变体 (mut)E-盒 1+316G, (c) wt E-盒 1+316A, 和 (d) mut E-盒 1+316A。对于每一启动子构建体,使用双样品 t-检验以比较用 pcDNA3.0 质粒共转染的细胞与用 CMV-c-MYC 表达载体转染的细胞之间的启动子活性。同样地,为了检查 MAD1 表达对 ODC 等位基因特异性启动子活性的影响,使用双样品 t-检验,以比较用 pcDNA3.1 质粒共转染的启动子构建体中与用 pcDNA-MAD1 质粒转染的启动子构建体中启动子活性的作用。统计学显著性假定为 2 尾 P 值 < 0.05。

[0234] 实施例 3-ODC1 基因型的差异性影响

[0235] 此项研究包含分析来自多中心 III 期结肠腺瘤预防试验 (Meyskens 等人, 2008) 的患者资料。登记了 375 名患者,并且研究在 267 名患者已完成研究结束时的结肠镜检查时被数据安全监控委员会 (DSMB) 停止 (由于研究满足了其功效终点)。DSMB 监测所有安全性和功效终点。在 2002 年 11 月之后,从 228 名同意研究的患者收集血液样品用于基因分型分析 (包含之前随机化的 246 名患者中的 159 名,和该日期之后随机化的 129 名患者中的 69 名),当时根据证明 ODC1 SNP (2) 重要性的数据对方案进行了修改。如先前所述,在患者来源的基因组 DNA 上使用等位基因特异性 TaqMan 探针进行 ODC1 (rs2302615) 基因分型 (Guo 等人, 2000)。如先前所述 (Meyskens 等人, 1998 ; Seiler 和 Knodgen, 1980) 使用 8 个随机选择的直肠粘膜活检样品中的 3 个确定直肠组织多胺含量。进行组织多胺反应,反应值范围是从 25% 至 45%。

[0236] 在显性模型下分析 ODC1 基因型 :AA/GA 对 GG 患者。对两个基因型组之间非正常分布的连续变量进行 Wilcoxon 秩和检验。使用卡方检验或者 Fisher 精确检验评价基线明确变量与基因型组之间的关联。对具有预测因子的主要结果 (腺瘤复发) 进行对数二项式回归 :治疗组、年龄、性别、人种 (白种人对其它人种)、阿司匹林使用、ODC1 基因型 (在显性模型中) 和代表通过基因型相互作用治疗的术语。对于次要的结果 (直肠组织多胺反应, 毒性),使用完全的对数二项式模型检查治疗组的影响、基因型以及治疗与基因型之间的相互作用。统计学分析使用 SAS 9.2 统计学软件 (SAS Inc., Cary, NC) 进行。患者签署关于试验纳入和样品检索 / 分析的知情同意书。研究在 UC Irvine 伦理审查委员会的全面委员会评审 (IRB 方案 #2002-2261) 和参加研究地点的当地每一个 IRB 的评审之后得到批准。

[0237] ODC1 基因型分布是 :126GG (55%), 87GA (38%), 和 15AA (7%)。基线临床特征表现出差异,如表 1 所示。在完全回归模型中调整后,相对于治疗的腺瘤复发相对风险 (RR)

是 0.39 (95% CI 0.24-0.66)。在分别接受安慰剂或者治疗的患者当中,耳毒性在 ODC1GG 患者中的发生率是 23%对 22%,在 ODC1GA 患者中的发生率是 20%对 21%,并且在 ODC1AA 患者中的发生率是 0% (7 个中有 0 个) 对 57% (7 个中有 4 个)。

[0238] 表 1. 通过 ODC1 基因型分类的基线时所有受试者 (n = 228) 的临床特征。

[0239]

	ODC1 AA/GA 基 因型(n=102)	ODC1 GG 基因型 (n=126)	P*
平均年龄(岁± 标准差)	60.2 ± 8.4 SD	62.6 ± 8.7 SD	0.024 [†]
性别(n, %)			
男	77(75%)	96(76%)	0.90
女	25(25%)	30(24%)	
人种(n, %)			
白种人	84(82%)	107(85%)	0.007 [‡]
黑种人	3(3%)	4(3%)	
西班牙人	4(4%)	12(10%)	
亚洲人	9(9%)	1(1%)	
其它	2(2%)	2(2%)	
治疗组 (n, %)			
依氟鸟氨酸 + 舒林酸	46(45%)	71(56%)	0.09
安慰剂	56(55%)	55(44%)	
低剂量阿司匹林使用(n, %)			
是	44(43%)	54(43%)	0.97
否	58(57%)	72(57%)	
中位数数值(最小-最大)	2.00(1, 11)	2.00(1, 16)	0.41 [†]
最大的先前息肉的位置 (n, %)			
直肠	26(25%)	23(18%)	0.19
结肠	76(75%)	103(82%)	
先前息肉组织学(n, %)			
管状	76(75%)	99(79%)	0.03 [‡]
腺瘤-NOS	6(6%)	8(6%)	
管状绒毛状	10(10%)	17(13%)	
绒毛状	7(7%)	1(1%)	
原位癌	3(3%)	0(0%)	
管状腺瘤, 高分级发育异常	0(0%)	1(1%)	
最大的息肉≥1 cm(n, %)	25(25%)	40(32%)	0.23
对于先前息肉给予治疗 (n, %)			
完全的内窥镜去除	92(90%)	117(93%)	0.47
手术	10(10%)	9(7%)	
基线组织多胺含量 [§] (中位数, nmol/mg 蛋白, 范围)			
腐胺	0.47(0.01-4.60)	0.56(0.01-5.29)	0.48 [†]
亚精胺	1.99(0.76-9.18)	2.17(1.05-8.97)	0.08 [†]
精胺	6.82(2.29-19.86)	7.29(2.72-22.85)	0.23 [†]
亚精胺:精胺比率	0.30(0.19-0.98)	0.31(0.19-0.76)	0.23 [†]

[0240] *对于 χ^2 检验的 p- 值被列出, 除非另外指出。

[0241] †对于 Wilcoxon 秩和检验的 p- 值。

[0242] ‡对于 Fisher 精确检验的 p- 值。

[0243] §对于具有 ODC1GG 基因型的 1 个受试者和具有 ODC1AA/GA 基因型的 1 个受试者丢失组织多胺数据。

[0244] 表 2. 基于 ODC1 基因型对结直肠癌病例进行的多变量总体存活和结直肠癌特异性存活分析。

[0245]

	ODC1 基因型		p
	GG	GA/AA	
总体死亡率			
事件数量	47	62	
处于风险中的数量	208	192	
未调整的 HR(95% CI)	1(参照物)	1.57(1.07-2.29)	0.020
调整的 HR(95% CI)*	1(参照物)	1.58(1.07-2.34)	0.021
CRC-特异性死亡率			
事件数量	22	37	
处于风险中的数量	208	192	
未调整的 HR(95% CI)	1(参照物)	1.97(1.16-3.34)	0.012
调整的 HR(95% CI)*	1(参照物)	2.02(1.17-3.50)	0.012

[0246] 缩写 :95% CI, 95% 置信区间。

[0247] *包括对于分期 (I, II, III) 的层化和对于年龄 (岁)、性别、种族、结直肠癌家族病史、诊断时 TNM 分期、结直肠内肿瘤部位、组织学亚型、使用手术的治疗、放射治疗和化学治疗的调整。

[0248] 表 3. 随机化和通过 ODC1 基因型层化 (显性模型) 后事件的发病率。

[0249]

	安慰剂 (n=111)		依氟鸟氨酸/舒林酸 (n=117)		<i>P</i> *
	<i>ODC1</i> GG	<i>ODC1</i> GA 或者 AA	<i>ODC1</i> GG	<i>ODC1</i> GA 或者 AA	
任何腺瘤复发	22/44(50)	18/53(34)	7/64(11)	9/42(21)	< 0.0001
任何不良事件- 具有不良事件的患者数 (%)					
心血管事件 [†] 患者数(%)	8/55(15)	8/56(14)	13/71(18)	9/46(20)	0.30
胃肠道事件 [‡] , 患者数(%)	4/55(7)	8/56(14)	9/71(13)	7/46(15)	0.54
在 ≥ 2 频率时耳聋至少 15dB, 患者数(%)	10/44(23)	9/52(17)	14/63(22)	11/41(27)	0.26

[0250] *对于在全部模型中（依氟鸟氨酸和舒林酸对安慰剂）对腺瘤复发的治疗效果 of 似然比检验的 *P*- 值, 全部模型包括年龄、性别、人种 / 种族、阿司匹林使用、治疗、基因型和作为共变量的治疗与基因型相互作用。在全部模型中对于腺瘤复发检测到统计学显著相互作用 (*P* = 0.038) ;对于心血管毒性、胃肠道毒性或者耳毒性没有检测到相互作用。

[0251] [†]心血管事件包括冠状动脉疾病、心肌梗死、脑血管意外、充血性心力衰竭和胸痛。

[0252] [‡]胃肠道事件包括胃肠道出血（从任何区域），例如直肠出血、上消化道出血、便血或者粪便中潜血。

[0253] 表 4. 功效和不良事件与 *ODC1*+316SNP.

[0254]

	安慰剂 (N=111)			DFMO/舒林酸 (N=117)			<i>P</i>
	<i>ODC</i> GG (N=55)	<i>ODC</i> GA (N=48)	<i>ODC</i> AA (N=8)	<i>ODC</i> GG (N=71)	<i>ODC</i> GA (N=39)	<i>ODC</i> AA (N=7)	
任何腺瘤复发(%)	22/44(50)	(35)	(29)	7/64(11)	(14)	(57)	< 0.0001
心血管事件 患者数(%)a	8/55(15)	7/48(15)	1/8(13)	13/71(18)	7/39(18)	2/7(29)	0.37
胃肠道事件 患者数(%)b	4/55(7)	8/48(17)	0/8(0)	9/71(13)	5/39(13)	2/7(29)	0.45
在≥ 2 频率时耳聋 至少 15dB, 患者数(%)c	10/44(23)	9/45(20)	0/8(0)	14/63(22)	7/34(21)	4/7(57)	0.020

[0255] *****

[0256] 本文中公开和要求保护的所有方法可根据本公开书不经不当实验即可执行和实施。虽然本发明的方法已经依据优选实施方案进行了描述,但对于本领域技术人员显而易见,可对本文描述的方法和步骤或步骤次序予以变化,却不会偏离本发明的概念、精神和范围。更具体地,显而易见在化学和生理上具有相关性的特定试剂可替代本文描述的试剂,同时仍能获得相同或类似的结果。对于本领域技术人员显而易见的所有此类类似取代和修饰被认为处于随附权利要求书所限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0257] 参考文献

[0258] 以下参考文献用于提供示例性程序细节或补充本文所述内容的其它细节,以引用的方式具体并入本文中。

[0259] 美国专利 3,647,858

[0260] 美国专利 3,654,349

[0261] 美国专利 4,330,559

[0262] 美国专利 4,413,141

[0263] 美国专利 4,582,788

[0264] 美国专利 4,656,127

[0265] 美国专利 4,683,194

[0266] 美国专利 4,683,202

[0267] 美国专利 5,814,625

[0268] 美国专利 5,843,929

[0269] 美国专利 5,952,174

[0270] 美国专利 6,258,845

[0271] Alberts 等人, J. Cell. Biochem. 增刊 (22) :18-23, 1995. .

[0272] AMA Drug Evaluations Annual, 1814-1815, 1994.

[0273] Babbar 等人, Biochem. J. , 394 :317-24, 2006.

[0274] Babbar 等人, J. Biol. Chem. , 278(48) :47762-47775, 2003.

- [0275] Barry 等人, J. Natl. Cancer Inst., 98(20) :1494-500, 2006.
- [0276] Bedi 等人, Cancer Res., 55(9) :1811-1816, 1995.
- [0277] Bellofernandez 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :7804-8, 1993.
- [0278] Bussey, Hepatology, 12(1) :175-6, 1990
- [0279] Childs 等人, Cell. Molec. Life Sci., 60 :1394-1406, 2003.
- [0280] de Arruda 等人, Expert Rev. Mol. Diagn., 2(5) :487-496, 2002.
- [0281] Derynck 等人, Nature Genetics, 29 :117-29, 2001.
- [0282] DuBois 等人, Cancer Res., 56 :733-737, 1996.
- [0283] Erdman 等人, Carcinogenesis, 20 :1709-13, 1999.
- [0284] 欧洲申请 201, 184
- [0285] 欧洲申请 237, 362
- [0286] 欧洲申请 258, 017
- [0287] 欧洲申请 50, 424
- [0288] 欧洲申请 84, 796
- [0289] 法国申请 2, 650, 840
- [0290] Fultz 和 Gerner, Mol. Carcinog., 34 :10-8, 2002.
- [0291] Gerner 和 Meyskens, Nature Rev. Cancer, 4 :781-92., 2004.
- [0292] Gerner 等人, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 3 :325-330, 1994.
- [0293] Giardiello 等人, Cancer Res., (57) :199-201, 1997.
- [0294] Guo 等人, Cancer Res., 60(22) :6314-6317, 2000.
- [0295] Halushka 等人, Nat. Genet., 22(3) :239-247, 1999.
- [0296] Hanif 等人, Biochemical Pharmacology, (52) :237-245, 1996.
- [0297] Hubner 等人, Clin. Cancer Res., 14(8) :2303-9, 2008.
- [0298] Ignatenko 等人, Cancer Biol. Ther., 5(12) :1658-64, 2006.
- [0299] Inazuka 等人, Genome Res, 7(11) :1094-1103, 1997.
- [0300] Iwamoto 等人, Carcinogenesis, 21 :1935-40, 2000.
- [0301] Johnson 等人, Nat. Genet., 29(2) :233-237, 2001.
- [0302] Ke 和 Cardon Bioinformatics, 19(2) :287-288, 2003.
- [0303] Keller 和 Giardiello, Cancer Biol. Ther., 2(4 增刊 1) :S140-9, 2003.
- [0304] Kingsnorth 等人, Cancer Res., 43(9) :4035-8, 1983.
- [0305] Komher 等人, Nucl. Acids. Res. 17 :7779-7784, 1989.
- [0306] Kuppaswamy 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 :1143-1147, 1991.
- [0307] Kwok 和 Chen, Curr Issues Mol. Biol., Apr ;5(2) :43-60, 2003.
- [0308] Kwok 等人, Genomics, 23(1) :138-144, 1994.
- [0309] Kwok, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 2 :235-258, 2001.
- [0310] Kwok 等人, Genomics, 31(1) :123-6, 1996.
- [0311] Ladenheim 等人, Gastroenterology, 108 :1083-1087, 1995.
- [0312] Landegren 等人, Science, 241 :1077-1080, 1988.
- [0313] Lanza 等人, Arch. Intern. Med., 155 :1371-1377, 1995.

- [0314] Le 等人, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 17 :1950-62, 2008.
- [0315] Lipkin, J. *Cell Biochem. 增刊*, 28-29 :144-7, 1997.
- [0316] Lippman, *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 3(10) :523, 2006.
- [0317] Love 等人, *J. Natl. Cancer Inst.*, 85 :732-7, 1993.
- [0318] Lu 等人, *Eukaryot Cell.*, 3(6) :1544-56, 2004.
- [0319] Luk 和 Baylin, *N. Engl. J. Med.*, 311(2) :80-83, 1984.
- [0320] Lupulescu, *Cancer Detect. Prev.*, 20(6) :634-637, 1996.
- [0321] Martinez 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 :7859-64, 2003.
- [0322] Matsubara 等人, *Clinical Cancer Res.*, 1 :665-71, 1995.
- [0323] Maxam 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 :560, 1977.
- [0324] McLaren 等人, *Cancer Prev. Res.*, 1(7) :514-21, 2008.
- [0325] Meyskens 等人, *Cancer Prev. Res.*, 1(1) :32-8, 2008.
- [0326] Meyskens 等人, *J. Natl. Cancer Inst.*, 86(15) :1122-1130, 1994.
- [0327] Meyskens 等人, *J. Natl. Cancer Inst.*, 90(16) :1212-8, 1998.
- [0328] Mullis 等人, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51 :263-273, 1986.
- [0329] Muscat 等人, *Cancer*, 74 :1847-1854, 1994.
- [0330] Narisawa 等人, *Cancer Res.*, 41(5) :1954-1957, 1981.
- [0331] Nickerson 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 :8923-8927, 1990.
- [0332] Nyren 等人, *Anal. Biochem.* 208 :171-175, 1993.
- [0333] O' Brien 等人, *Molec. Carcinog.*, 41(2) :120-3, 2004.
- [0334] Pardali 和 Moustakas, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1775 :21-62, 2007.
- [0335] PCT 申请 W091/02087
- [0336] PCT 申请 W092/15712
- [0337] Peel 等人, *J. Natl. Cancer Inst.*, 92 :1517-22, 2000.
- [0338] Pegg, *Biochem.*, 234(2) :249-262, 1986.
- [0339] Physician's Desk Reference, *Medical Economics Data*, Montville, N. J., 1745-1747, 1999
- [0340] Piazza 等人, *Cancer Res.*, (55) :311 3116, 1995.
- [0341] Piazza 等人, *Cancer Res.*, (57) :2452-2459, 1997a.
- [0342] Piazza 等人, *Cancer Res.*, (57) :2909-2915, 1997b.
- [0343] Pollard 和 Luckert, *Cancer Res.*, 49 :6471-6473, 1989.
- [0344] Prezant 等人, *Hum. Mutat.*, 1 :159-164, 1992.
- [0345] Psaty 和 Potter, *N. Engl. J. Med.*, 355(9) :950-2, 2006.
- [0346] Rao 等人, *Cancer Res.*, (55) :1464-1472, 1995.
- [0347] Reddy 等人, *Cancer Res.*, (50) :2562-2568, 1990.
- [0348] Reddy 等人, *Cancer Res.*, 47 :5340-5346, 1987.
- [0349] Rice 等人, *Mol. Cancer Ther.*, 2(9) :885-92, 2003.
- [0350] Roberts 和 Wakefield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 :8621-3, 2003.
- [0351] Sanger 等人, *J. Molec. Biol.*, 94 :441, 1975.

- [0352] Seiler 和 Knodgen, J. Chromatogr. , 221 (2) :227-235, 1980.
- [0353] Simoneau 等人, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. , 17 :292-9, 2008.
- [0354] Simoneau 等人, J. Natl. Cancer Inst. , 93 :57-9, 2001.
- [0355] Singh 和 Reddy, Annals. NY Acad. Sci. , (768) :205-209, 1995.
- [0356] Singh 等人, Carcinogenesis, (15) :1317-1323, 1994.
- [0357] Small 等人, N. Engl. J. Med. , 347 :1135-1142, 2002.
- [0358] Sokolov, Nucl. Acids Res. 18 :3671, 1990.
- [0359] Stevens 等人, Biotechniques, 34 :198-203, 2003.
- [0360] Strejan 等人, Cell Immunol. , 84(1) :171-184, 1984.
- [0361] Su 等人, Science, (256) :668-670, 1992.
- [0362] Syvanen 等人, Genomics 8 :684-692, 1990.
- [0363] Taillon-Miller 等人, Genome Res, 8(7) :748-754, 1998.
- [0364] Tempero 等人, Cancer Res. , 49(21) :5793-7, 1989.
- [0365] Thomas 和 Thomas, J. Cell Mol. Med. , 7 :113-26, 2003.
- [0366] Thompson 等人, J. Natl. Cancer Inst. , (87) :125-1260, 1995.
- [0367] Ugozzoli 等人, GATA 9 :107-112, 1992.
- [0368] Vane 和 Botting, Adv Exp Med Biol. , 433 :131-8, 1997.
- [0369] Visvanathan 等人, J. Urol. , 171(2 Pt 1) :652-5, 2004.
- [0370] Wallace, Eur. J. Clin. Invest. , 30 :1-3, 2000.
- [0371] Zell 等人, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. , 17 :3134-40, 2008.
- [0372] Zell 等人, Cancer Prev. Res. , 2(3) :209-12, 2009.
- [0373] Zell 等人, Clin. Cancer Res. , 15(19) :6208-16, 2009.
- [0374] Zell 等人, Intl. J. Cancer, 120 :459-68, 2007.
- [0375] Ziogas 和 Anton-Culver, Am. J. Prev. Med. , 24 :190-8, 2003.

[0001]

序列表

<110>	尤金·格尔纳 J·泽尔 C·麦克拉伦 F·麦斯金斯 H·安东卡尔弗 P·A·汤普森	
<120>	基于ODC1基因型的癌诊断与治疗	
<130>	CAPP:006W0	
<140>	未知	
<141>	2010-05-14	
<150>	61/217682	
<151>	2009-06-03	
<150>	61/217679	
<151>	2009-06-03	
<150>	61/216216	
<151>	2009-05-14	
<160>	5	
<170>	PatentIn 版本 3.5	
<210>	1	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引物	
<400>	1 tctgcgcttc cccatgggga t	21
<210>	2	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引物	
<400>	2 tttccaacc ctteg	15
<210>	3	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引物	
<400>	3 cctgggcgct ctgaggt	17
<210>	4	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引物	
<400>	4 aggaagcgga gcctcaa	17

[0002]

<210> 5
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的引物

<400> 5
gcacgtgtgc ggcgcgctc gccggcctgc ggagacacgt gg

42

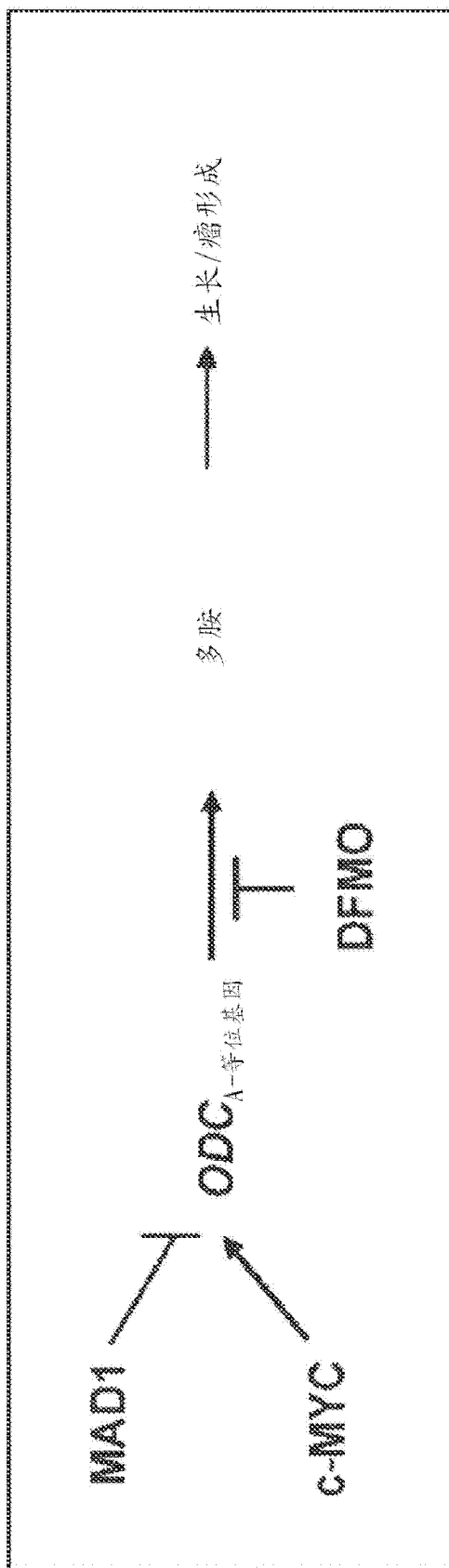


图 1

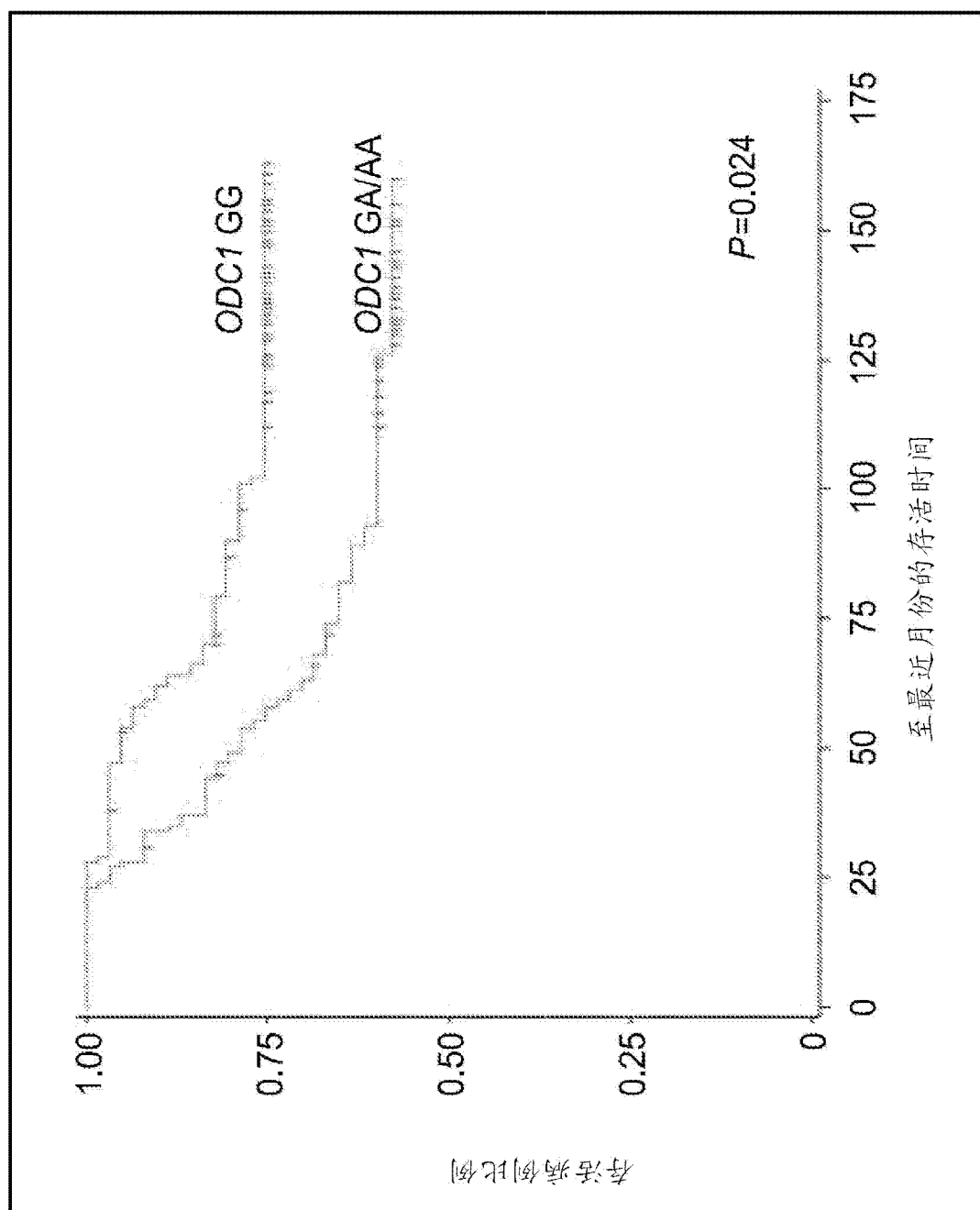


图 2

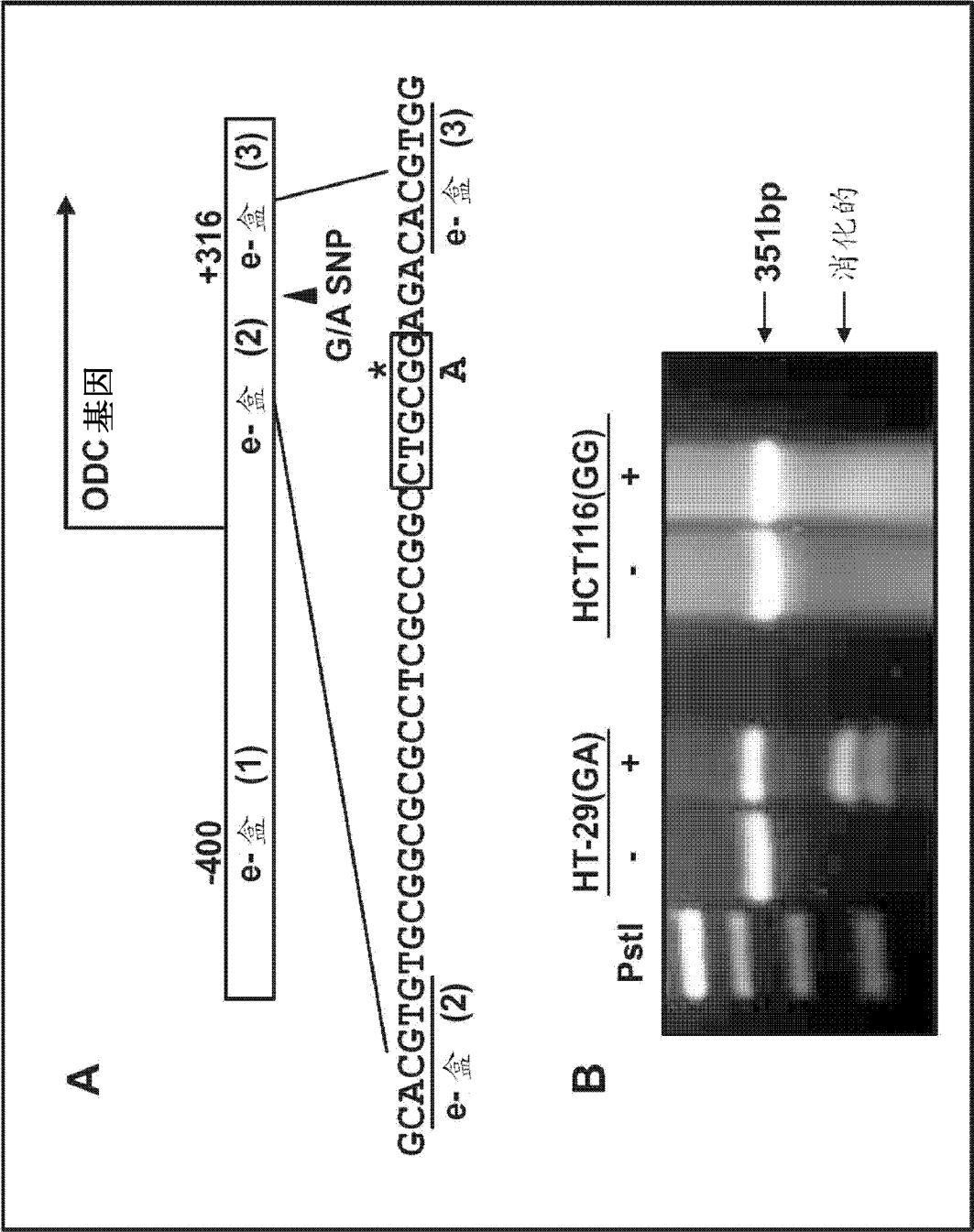


图 3A 和 B

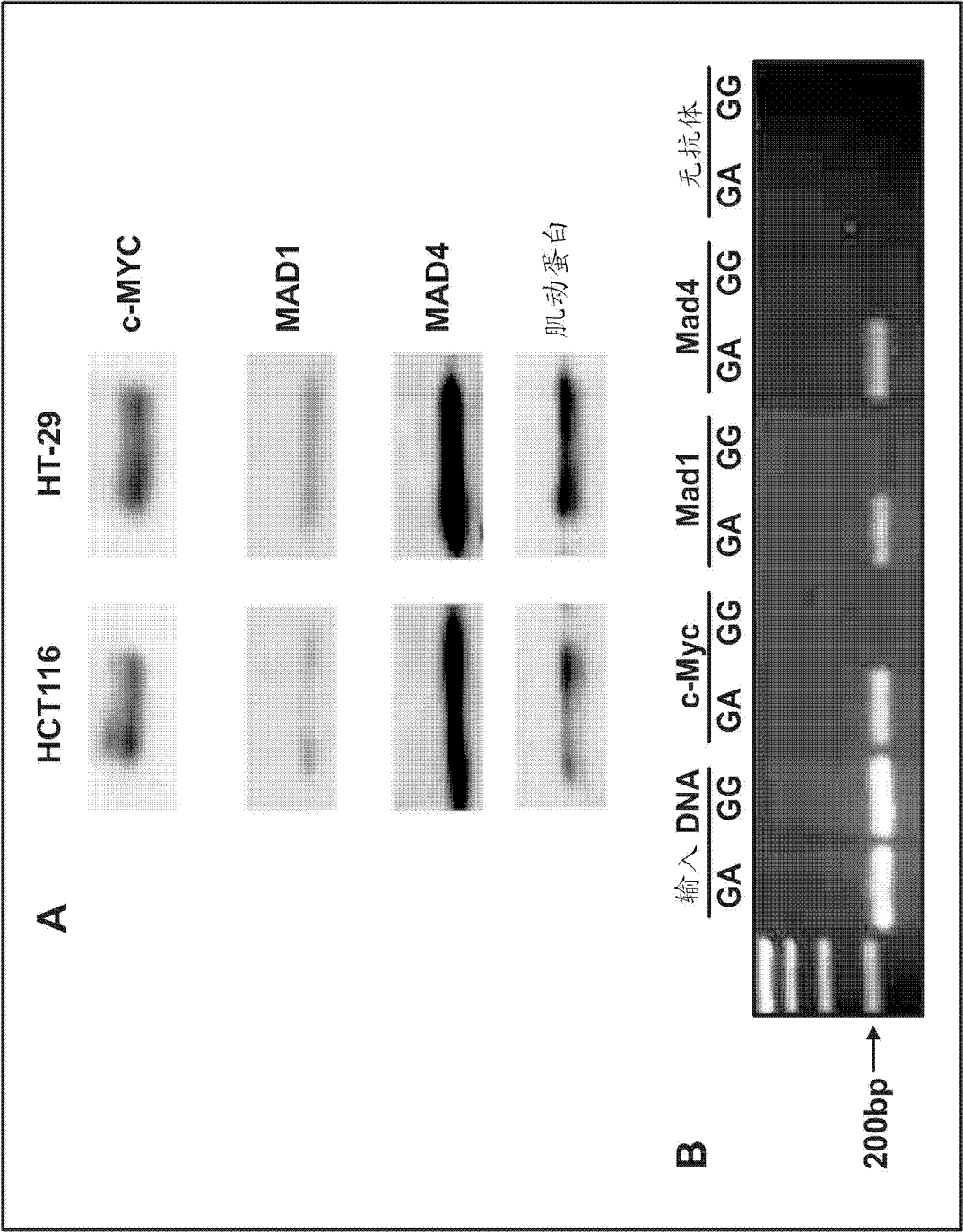


图 4A 和 B

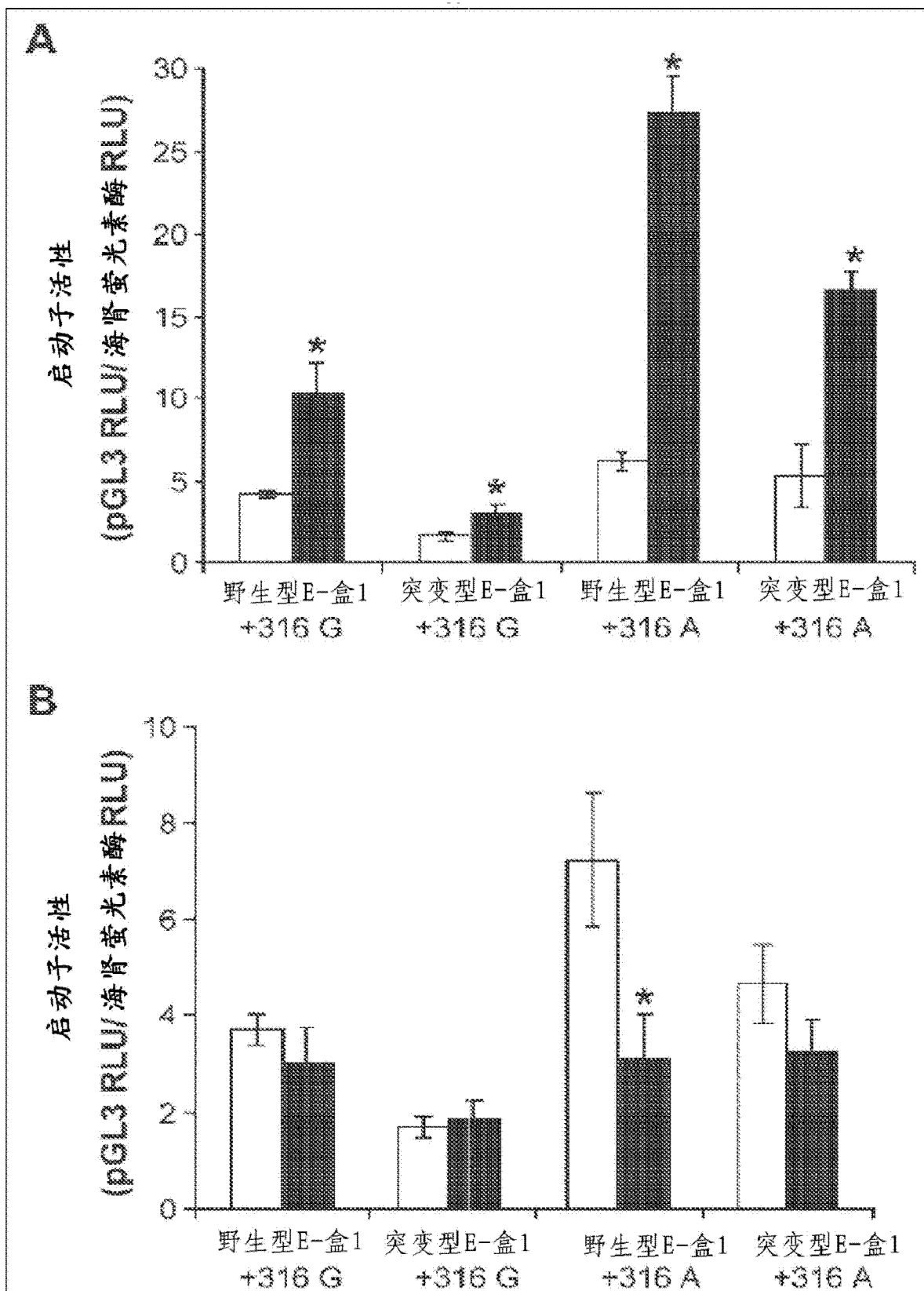


图 5A 和 B

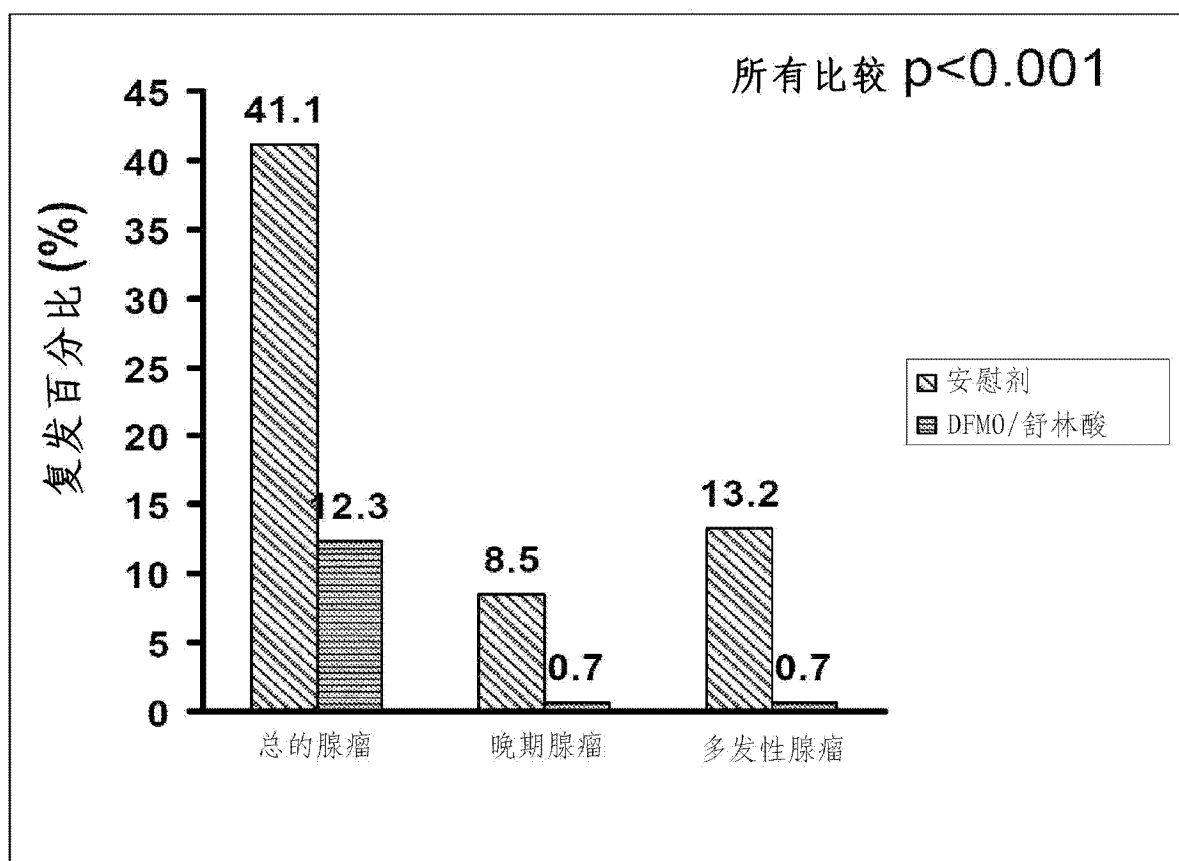


图 6

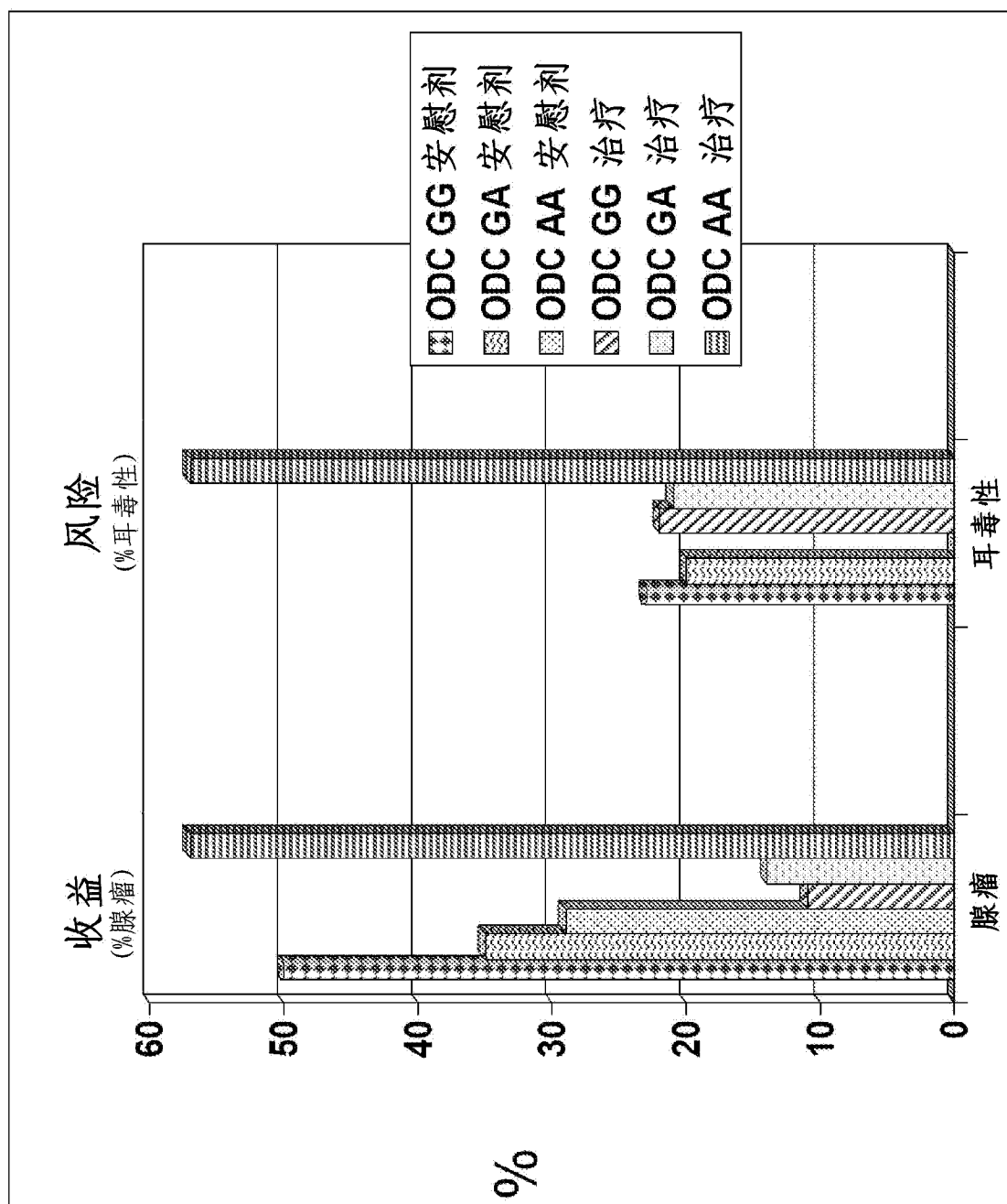


图 7

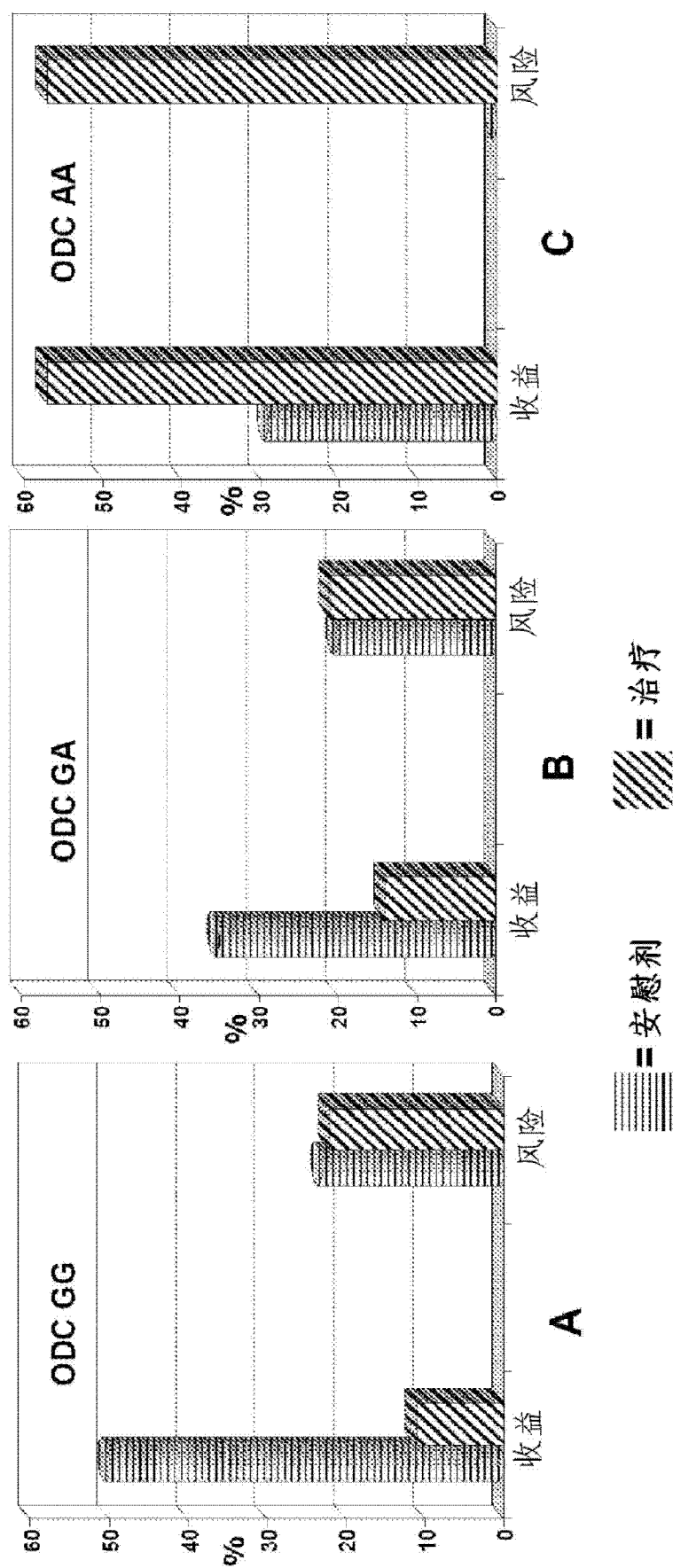


图 8A-C

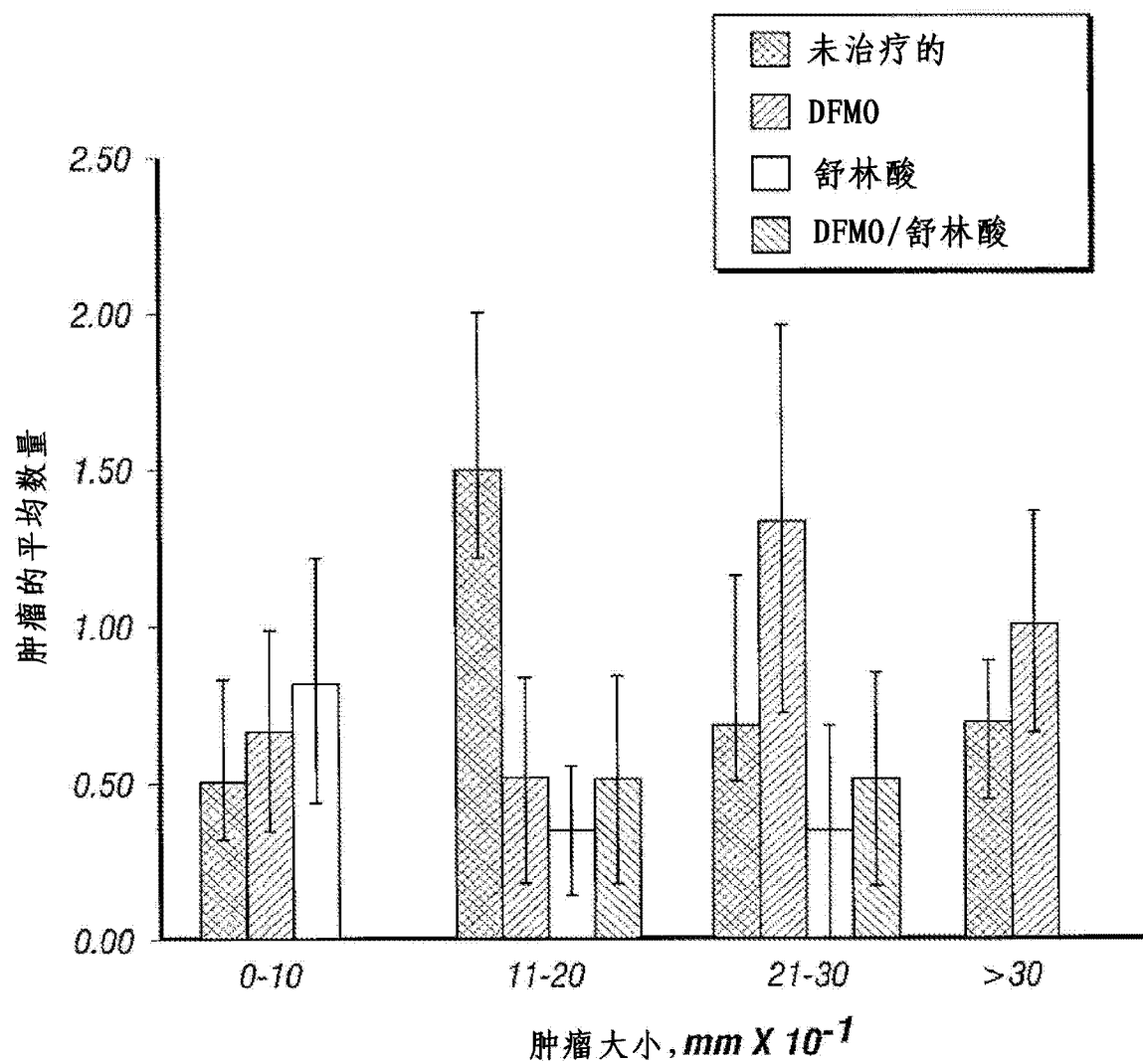


图 9

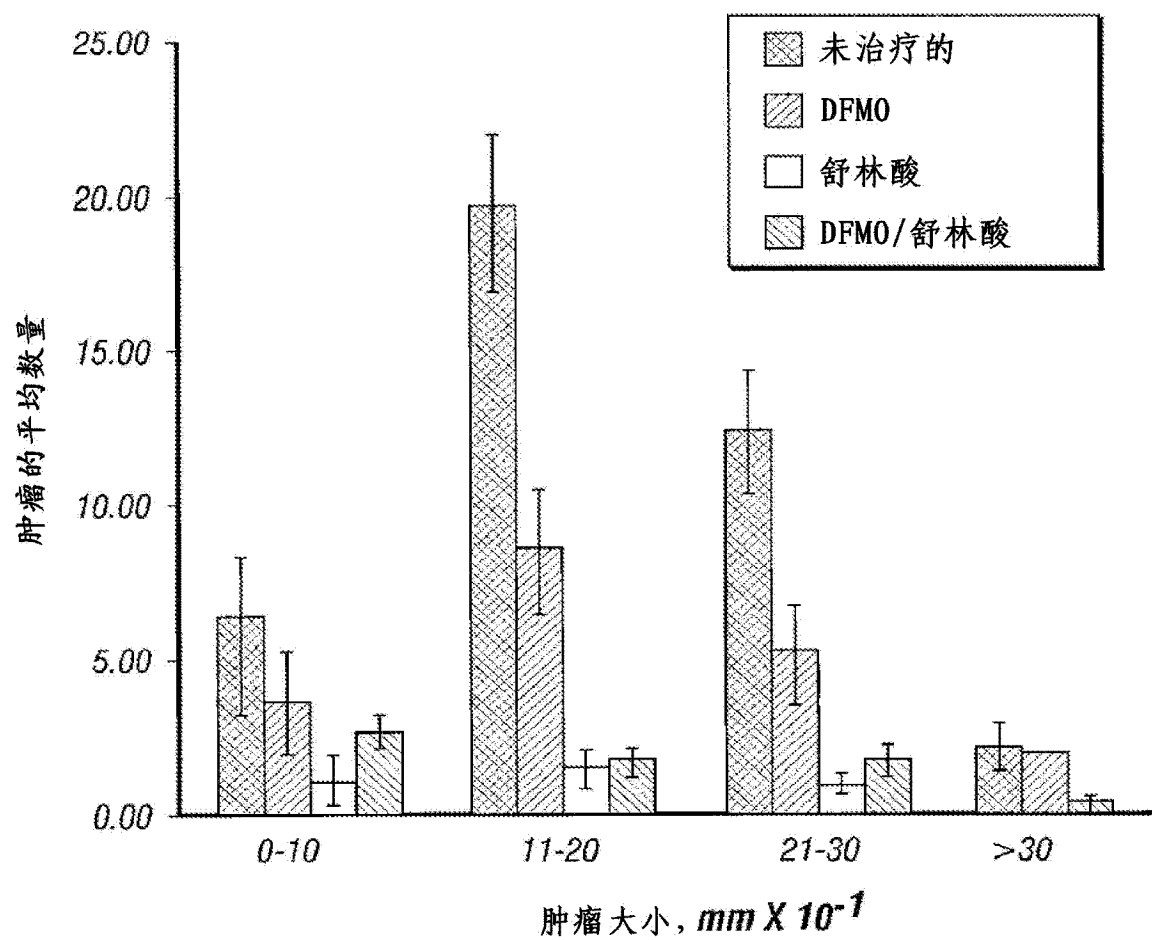


图 10

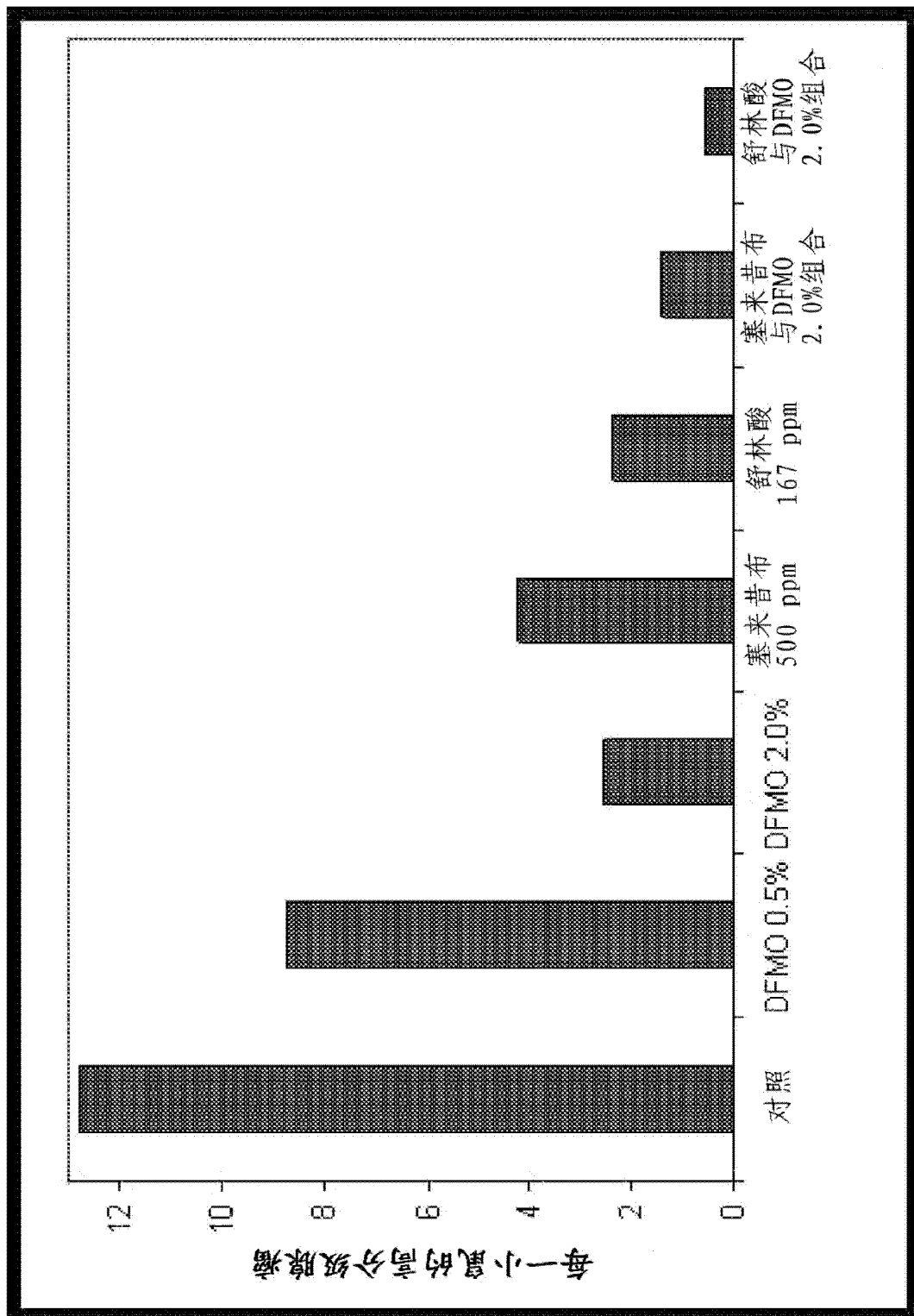


图 11