

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 145**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2010** **E 10775626 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014** **EP 2430452**

54 Título: **Diagnóstico y tratamientos del carcinoma, basado en el genotipo de ODC1**

30 Prioridad:

03.06.2009 US 217682 P

03.06.2009 US 217679 P

14.05.2009 US 216216 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.10.2014

73 Titular/es:

**ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF OF
UNIVERSITY OF ARIZONA (50.0%)
888 N. Euclid Avenue, Room 204
Tucson, AZ 85721, US y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA, A CALIFORNIA CORPORATION
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**GERNER, EUGENE;
ZELL, JASON;
MCLAREN, CHRISTINE;
MEYSKENS, FRANK;
ANTON-CULVER, HODA y
THOMPSON, PATRICIA A.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 507 145 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico y tratamientos del carcinoma, basado en el genotipo de *ODC1*

I. Campo de la invención

La presente invención se refiere en líneas generales a los campos de la biología y de la medicina del cáncer. Más particularmente, se refiere a procedimientos para el diagnóstico, prevención y tratamiento de carcinomas y factores de riesgo de los mismos.

II. Descripción de la técnica relacionada

Un impedimento importante a la aplicación de la investigación de la quimioprevención del cáncer a la práctica clínica ha sido la eficacia y toxicidades de agentes marginales que superaban el beneficio (Psaty y Potter, 2006; Lippman, 2006). Por ejemplo, la marcada eficacia demostrada de la combinación inhibidora de poliamina de *D,L*- α -difluorometilornitina (DFMO, eflornitina) oral diaria a largo plazo y sulindaco entre pacientes con adenoma colorrectal (ACR) se demostró recientemente (Meyskens y col., 2008), sin embargo, el tratamiento se asoció a ototoxicidad subclínica modesta (McLaren y col., 2008) y a un mayor número de acontecimientos cardiovasculares entre pacientes con alto riesgo cardiovascular inicial (Zell y col., 2009). El identificar características genéticas que identifican la idoneidad de un paciente para una pauta de tratamiento preventiva o curativa sería un beneficio importante.

Por ejemplo, sigue existiendo la necesidad de procedimientos eficaces y menos tóxicos para tratar y prevenir cánceres colorrectales y otros carcinomas. Según el Instituto Nacional del Cáncer, hubo aproximadamente 147.000 nuevos casos y 50.000 muertes de cáncer colorrectal en los Estados Unidos en 2009. Los actuales protocolos de tratamiento, especialmente aquellos para cánceres y pólipos de colon, incluyen resección tumoral, quimioterapia y radioterapia. Un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el intrón-1 del gen *ODC1* humano afecta la transcripción de *ODC1* (Guo y col., 2000), y se ha investigado como marcador genético para riesgo de adenoma colorrectal (ACR) (Martínez y col., 2003; Barry y col., 2006; Hubner y col., 2008). La frecuencia del alelo A menor informada es aproximadamente del 25 % y, a pesar de las diferencias entre la raza/etnicidad, la distribución del genotipo de *ODC1* está en equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de cada raza (O'Brien y col., 2004; Zell y col., 2009). Individuos homocigóticos para el alelo A menor de *ODC1* han reducido el riesgo de reaparición de adenoma en comparación con aquellos con el alelo G mayor (Martínez y col., 2003; Hubner y col., 2008). Además, el alelo A de *ODC1* (genotipo AA o GA, pero no genotipo GG) y el uso informado de aspirina se han asociado a la reducida aparición de pólipos de colon (Martínez y col., 2003; Barry y col., 2006; Hubner y col., 2008), y a un riesgo reducido del 50 % estadísticamente significativo de adenomas avanzados (Barry y col., 2006). Si el genotipo de *ODC1* afecta diferencialmente la reaparición de adenoma, las respuestas de poliamina de tejido, perfiles de toxicidad y cómo pueden usarse para determinar la idoneidad de tratamientos preventivos y curativos sería una ventaja importante. Gerner y Meyskens (Clin. Cancer Res., 2009, 15(3) 758-761) desvelan una combinación de DFMO y un AINE para prevenir cáncer de colon.

Resumen de la invención

Así, la presente solicitud describe usos dirigidos al tratamiento, prevención y/o diagnóstico relacionados con identificar el genotipo del paciente en la posición +316 de al menos un alelo del gen promotor *ODC1*.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende α -difluorometilornitina (DFMO) y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que no contiene aspirina para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de carcinoma colorrectal o factores de riesgo del mismo en un paciente, en el que el genotipo del paciente en la posición +316 de al menos un alelo del gen promotor *ODC1* es G; y en el que el tratamiento de factores de riesgo de carcinoma colorrectal en el paciente previene la formación de nuevos focos de cripta aberrantes, nuevos pólipos adenomatosos o nuevos adenomas con displasia en el paciente; opcionalmente en el que el paciente es un ser humano.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende α -difluorometilornitina (DFMO) para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de carcinoma colorrectal, o factores de riesgo del mismo como se definen con respecto al primer aspecto, en un paciente como se define con respecto al primer aspecto; en el que al paciente también se administra una composición que comprende un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que no contiene aspirina, siendo al paciente administrada la composición que comprende el AINE que no contiene aspirina antes, al mismo tiempo o después de la administración de la composición que comprende DFMO.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que no contiene aspirina para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de carcinoma colorrectal, o factores de riesgo del mismo como con respecto al primer aspecto, en un paciente como se define con respecto al primer aspecto; en el que al paciente también se administra una composición que comprende

α -difluorometilornitina (DFMO), siendo al paciente administrada la composición que comprende DFMO antes, al mismo tiempo o después de la administración de la composición que comprende el AINE que no contiene aspirina.

5 En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el AINE que no contiene aspirina aumenta la expresión de espermidina/espermina N^1 -acetiltransferasa dentro del paciente.

10 En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el genotipo del paciente en la posición +316 de al menos un alelo del gen promotor *ODC1* puede haber sido determinado recibiendo un informe que contiene dicho genotipo o tomando un antecedente del paciente que revela los resultados. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el genotipo del paciente se determina en la base nucleotídica en la posición +316 de un alelo del gen promotor *ODC1* del paciente. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el genotipo del paciente se determina en la posición +316 de ambos alelos del gen promotor *ODC1*. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el genotipo del paciente en la posición +316 de ambos alelos del gen promotor *ODC1* es GG. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el genotipo del paciente en la posición +316 de ambos alelos del gen promotor *ODC1* es GA.

20 En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, los usos definidos comprenden además aumentar la dosificación de DFMO o AINE que no contiene aspirina si el paciente ya estaba tratándose con la terapia farmacéutica, pero a una menor dosificación, antes de obtener los resultados de la prueba. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, los usos definidos comprenden además aumentar la dosificación de DFMO y AINE que no contiene aspirina si el paciente ya estaba tratándose con la terapia farmacéutica, pero a una menor dosificación, antes de obtener los resultados de la prueba.

25 En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el AINE que no contiene aspirina es un inhibidor selectivo de la COX-2. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el AINE que no contiene aspirina es sulindaco o celecoxib. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el AINE que no contiene aspirina es sulindaco.

30 En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el uso definido previene la formación de nuevos focos de cripta aberrantes en el paciente. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el uso definido previene la formación de nuevos pólipos adenomatosos en el paciente. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el uso definido previene la formación de nuevos adenomas con displasia en el paciente.

35 En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la DFMO y el sulindaco se administran sistémicamente. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la DFMO y el sulindaco se administran por vías distintas. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la DFMO o el AINE que no contiene aspirina se administra por vía oral, intra-arterialmente o intravenosamente. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la DFMO se administra por vía oral. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la cantidad eficaz de DFMO es 500 mg/día. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la DFMO se administra intravenosamente. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la cantidad eficaz de DFMO es de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5,0 g/m²/día. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la DFMO y el AINE que no contiene aspirina se formula para administración por vía oral. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la DFMO y el AINE que no contiene aspirina se formula como una cápsula dura o blanda o un comprimido. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la DFMO y el AINE que no contiene aspirina se administran cada 12 horas. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la DFMO y el AINE que no contiene aspirina se administran cada 24 horas. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la cantidad eficaz de sulindaco es de aproximadamente 10 a aproximadamente 1500 mg/día. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la cantidad eficaz de sulindaco es de aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg/día. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la cantidad eficaz de sulindaco es 150 mg/día. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la DFMO se administra antes del sulindaco. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la DFMO se administra después del sulindaco. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la DFMO se administra antes y después del sulindaco. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la DFMO se administra simultáneamente con el sulindaco. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, la DFMO se administra al menos una segunda vez. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el sulindaco se administra al menos una segunda vez.

65 En variaciones de cualquiera de las realizaciones anteriores del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el paciente tiene un tumor sólido, y dicho tumor sólido está reseccionado y opcionalmente se administran DFMO y sulindaco antes de, o después, de dicha resección.

En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el cáncer colorrectal está en estadio I. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el cáncer colorrectal está en estadio II. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el cáncer colorrectal está en estadio III. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el cáncer colorrectal está en estadio IV.

En variaciones de cualquiera de las realizaciones anteriores del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el uso definido previene la formación de nuevas neoplasias colorrectales avanzadas dentro del paciente. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el uso definido previene la ototoxicidad o el riesgo de la misma dentro del paciente. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el uso definido previene la formación de nuevas neoplasias colorrectales avanzadas del lado derecho. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el uso definido previene la formación de nuevas neoplasias colorrectales avanzadas del lado izquierdo.

En variaciones de cualquiera de las realizaciones anteriores del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el paciente ha sido identificado como que tiene uno o más pólipos adenomatosos en el colon, recto o apéndice. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el paciente ha sido identificado como que tiene una o más neoplasias colorrectales avanzadas. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el paciente ha sido identificado como que tiene una o más neoplasias colorrectales avanzadas del lado izquierdo. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el paciente ha sido identificado como que tiene una o más neoplasias colorrectales avanzadas del lado derecho. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el paciente ha sido diagnosticado con poliposis adenomatosa familiar. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el paciente ha sido diagnosticado con síndrome de Lynch. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el paciente ha sido diagnosticado con cáncer colorrectal familiar tipo X. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el paciente cumple los Criterios de Ámsterdam o los Criterios de Ámsterdam II. En algunas realizaciones del primer, segundo y/o tercer aspectos de la invención, el paciente tiene un antecedente de resección de uno o más adenomas colorrectales.

En variaciones de cualquiera de las realizaciones anteriores, el paciente es humano.

El uso de la palabra “un” o “una”, cuando se usa conjuntamente con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva, puede significar “uno”, pero también está de acuerdo con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”.

En toda la presente solicitud, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, siendo el procedimiento empleado para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos en estudio.

Los términos “comprenden”, “tienen” e “incluyen” son verbos de unión de extremos abiertos. Cualquier forma o tiempo de uno o más de estos verbos, tales como “comprende”, “que comprende”, “tiene”, “que tiene”, “incluye” y “que incluye”, también son de extremos abiertos. Por ejemplo, cualquier procedimiento que “comprenda”, “tenga” o “incluya” una o más etapas no se limita a poseer solo aquellas una o más etapas y también cubre otras etapas sin enumerar.

El término “eficaz”, como ese término se usa en la memoria descriptiva y/o reivindicaciones, significa adecuado para realizar un resultado deseado, esperado o previsto.

Como se usa en el presente documento, el término “CI₅₀” se refiere a una dosis inhibidora que es el 50 % de la máxima respuesta obtenida.

Como se usa en el presente documento, el término “paciente” o “sujeto” se refiere a un organismo mamífero vivo, tal como un ser humano, mono, vaca, oveja, cabra, perro, gato, ratón, rata, cobaya, o especie transgénica de los mismos. En ciertas realizaciones, el paciente o sujeto es un primate. Ejemplos no limitantes de sujetos humanos son adultos, jóvenes, lactantes y fetos.

“Farmacéuticamente aceptable” significa aquella que es útil en preparar una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y ni biológicamente ni de otro modo no deseable e incluye aquella que es aceptable para uso veterinario, además de uso farmacéutico humano.

“Prevención” o “prevenir” incluye: (1) inhibir la aparición de una enfermedad en un sujeto o paciente que puede estar en riesgo y/o predispuesto a la enfermedad, pero que todavía no experimenta o muestra ninguna o toda la patología o sintomatología de la enfermedad, y/o (2) ralentizar la aparición de la patología o sintomatología de una enfermedad en un sujeto o paciente que puede estar en riesgo y/o predispuesto a la enfermedad, pero que todavía no experimenta o muestra ninguna o toda de la patología o sintomatología de la enfermedad.

“Cantidad eficaz”, “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad farmacéuticamente eficaz” significa aquella cantidad que, cuando se administra a un sujeto o paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar tal tratamiento para la enfermedad.

“Tratamiento” o “tratar” incluye (1) inhibir una enfermedad en un sujeto o paciente que experimenta o que muestra la patología o sintomatología de la enfermedad (por ejemplo, detener adicionalmente el desarrollo de la patología y/o sintomatología), (2) mejorar una enfermedad en un sujeto o paciente que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad (por ejemplo, invertir la patología y/o sintomatología), y/o (3) efectuar cualquier disminución medible en una enfermedad en un sujeto o paciente que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad.

Las definiciones anteriores suplantán cualquier definición conflictiva en cualquiera de las referencias citadas en el presente documento. Sin embargo, el hecho de que se definan ciertos términos no debe considerarse indicativo de que cualquier término que no se defina sea indefinido. Más bien, se cree que todos los términos usados describen la invención en términos tales que un experto habitual pueda apreciar el alcance y práctica de la presente invención.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente divulgación serán evidentes de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se facilitan a modo de ilustración solo, ya que diversos cambios y modificaciones serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y están incluidos para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente divulgación. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

FIG. 1 - Efectos diferenciales de la regulación de poliamina por *MAD1* y *c-MYC*. Esquema que representa los efectos diferenciales propuestos de la regulación de poliamina por *MAD1* y *c-MYC* sobre el alelo A menor de *ODC1* +316. También se muestran efectos del inhibidor de ODC DFMO (difluorometilornitina).

FIG. 2 - Cálculos estimados de la tasa de supervivencia específica del cáncer colorrectal. Esta figura muestra cálculos estimados de la tasa de supervivencia específica del cáncer colorrectal de Kaplan-Meier para casos con cáncer colorrectal de estadio III, estratificado por genotipo de *ODC1* +316. Se incluyen casos de la Universidad de California Irvine - Estudio de genes-medioambiente de cáncer colorrectal familiar diagnosticado durante el periodo 1994-1996 con seguimiento hasta marzo de 2008: GG de *ODC1* (64 casos, 15 muertes específicas de cáncer colorrectal), GA/AA de *ODC1* (62 casos, 25 muertes específicas de cáncer colorrectal).

FIG. 3A y B - Localización y análisis del SNP del promotor *ODC1*. La FIG. A muestra A, localización del SNP del promotor *ODC1*. El SNP en investigación en este estudio está 316 nucleótidos 3' del sitio de inicio de la transcripción de *ODC1* (*). Este SNP reside entre dos cajas E consenso como se muestra por las secuencias subrayadas, y afecta un sitio de restricción PstI (recuadro) (SEC ID N°: 5). La FIG. 3B muestra un análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del SNP de *ODC1*. El ADN se obtuvo de dos tipos de células y se secuenció la región que rodea el sitio de SNP de *ODC1*. Se encontró que células HT29 derivadas del colon eran GA heterocigóticas, mientras que se encontró que células HCT116 eran GG homocigóticas, en el sitio de SNP de *ODC1*. Se obtuvo un producto de PCR de 350 pb de esta región de cada tipo de célula y se sometió a digestión con PstI. Los indicios de un alelo A se indicaron por productos de restricción <350 pb.

FIG. 4A y B - Expresión de la caja E y análisis de inmunoprecipitación. Localización del promotor del SNP de *ODC1*. La FIG. 4A muestra la expresión de proteínas de la caja E en células derivadas de colon. La expresión de proteínas que va a evaluarse para la unión al SNP de *ODC1* +316 se evaluó por análisis de transferencia Western. Los extractos de tanto células HT29 como HCT116 se evaluaron para *c-MYC*, *MAD1* y *MAD4*; se usó β -actina como control de carga. La FIG. 4B muestra documentación para el factor de transcripción específico de alelo que se une por análisis de inmunoprecipitación de cromatina, que se realizó como se describe en la sección de ejemplos más adelante. Células HT29 fueron una fuente de alelos A de *ODC1*, ya que estas células son GA heterocigóticas en este sitio. Se usaron células HCT116 como fuente de alelos G de *ODC1*.

FIG. 5A y B - Efectos de la expresión de *c-MYC* y *MAD1* sobre la actividad de *ODC1*. La FIG. 5A muestra el efecto de la expresión de *c-MYC* sobre la actividad del promotor específico de alelos de *ODC1* en células HT29 derivadas de colon. La actividad del promotor se midió después de la transfección con plásmidos indicadores del promotor *ODC1* co-transfectados con el plásmido pcDNA 3.0 o el vector de expresión CMV-*MYC*. Las construcciones de promotor se diferencian por la presencia del primer elemento de la caja E, localizado en -485 a -480 pb (“caja E 1 nt” para la secuencia natural o “caja E 1 mut” para una secuencia mutante). Las construcciones también se diferencian por el SNP de *ODC1* +316 (“+316 G” o “+316 A”). *, $P \leq 0,013$ para cada una de las cuatro comparaciones con respecto a la actividad del promotor con co-transfección con pcDNA 3.0. La FIG. 5B muestra el efecto de la expresión de *MAD1* sobre la actividad del promotor específico de alelos de *ODC1* en células HT29 derivadas de tumor de colon. La actividad del promotor se midió

después de la transfección con plásmidos indicadores del promotor *ODC1* co-transfectados con el plásmido pcDNA 3.1 o con un plásmido pcDNA-MAD1. Las construcciones de promotor usadas se describieron en la leyenda para el panel A de esta figura. *, P = 0,027, significancia estadística relativa para la actividad del promotor con co-transfección con pcDNA 3.1.

FIG. 6 - Reducción en pólipos adenomatosos. Esta figura muestra el porcentaje de reaparición de pólipos adenomatosos de pacientes tratados con DFMO y sulindaco en comparación con placebo. Hubo una reducción del 70 % en adenoma total, una reducción del 92 % en adenoma avanzado y una reducción del 95 % en adenoma múltiple.

FIG. 7 - Análisis del beneficio/riesgo farmacogenómico basado en el genotipo de *ODC1* +316. Esta figura compara la reducción en el % de reaparición de adenomas al final de 3 años frente a placebo con el % de ototoxicidad para los grupos de tratamiento y de placebo en función del genotipo de *ODC1* +316 del paciente. La ototoxicidad se determinó usando prueba audiométrica.

FIG. 8A-C - Análisis del beneficio/riesgo farmacogenómico basado en el genotipo de *ODC1* +316. Esta figura compara el beneficio, reducción en el % de reaparición de adenomas al final de 3 años, con el riesgo, % de ototoxicidad, para los grupos de tratamiento y placebo en función del genotipo de *ODC1* +316 del paciente. La ototoxicidad se determinó usando prueba audiométrica.

FIG. 9 - Número promedio de tumores por tamaño en colon de ratones *Min/+*. Esta figura muestra el número promedio de tumores por tamaño en el colon de los tres grupos de tratamiento en comparación con controles sin tratar. Ratones, comprados de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Me.), fueron cruces de machos C57BL/6J- *Apc^{Min/+}* y hembras C57/BL6. Se identificaron ratones *Min* heterocigóticos (*Apc^{Min} /Apc⁺*): (heterocigóticos para una mutación terminadora en el codón 850 de *Apc*) genotipando en el destete por un ensayo de PCR específico de alelos usando ADN de la punta de la cola. Los compañeros de camada homocigóticos (*Apc⁺ /Apc⁺*) sirvieron de controles. Un tratamiento consistió en suplementar el agua de bebida con 2 % de DFMO (Merrell Dow Research Inst.) en el 8º día de estudio. En el otro tratamiento, 167 ppm de sulindaco (Harlen Teklad) se añadieron a la dieta para ratones AIN-93G en el 21º día del estudio. El tercer tratamiento fue una combinación de DFMO y sulindaco. Después de 114 días, los ratones se sacrificaron mediante asfixia con CO₂. Se extirparon segmentos del intestino delgado y colon de ratones y se diseccionaron longitudinalmente, se montaron y se fijaron en 70 % de etanol, y se colocaron a 4 °C para la puntuación del tumor. También se tomaron tejidos representativos para evaluación de histopatología.

FIG. 10 - Número promedio de tumores por tamaño en el intestino delgado de ratones *Min/+*. Esta figura muestra el número promedio de tumores por tamaño en el intestino delgado de los tres grupos de tratamiento en comparación con controles sin tratar. Para detalles experimentales véase la descripción de la FIG. 9 anterior.

FIG. 11 - Número de adenomas de alto grado en función de la terapia en ratones *Min/+*. Esta figura muestra cómo el número de adenomas de alto grado varía dependiendo del tipo de terapia. Para detalles experimentales véase la descripción de la FIG. 9 anterior.

Descripción de realizaciones ilustrativas

La presente solicitud describe procedimientos y usos que comprenden predecir la idoneidad, eficacia, toxicidad y/o dosificación de terapias de combinación anti-carcinoma que comprenden α -difluorometilornitina (DFMO) y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que no contiene aspirina que actúa de agonista de la expresión de espermidina/espermina *N*¹-acetiltransferasa, basado al menos en parte en el genotipo del promotor *ODC1* del paciente. La invención se limita a la prevención o tratamiento de carcinoma colorrectal o factores de riesgo del mismo en pacientes que tienen el genotipo especificado en la reivindicación 1.

La presente invención implica la administración de los compuestos terapéuticos anteriormente mencionados a individuos que presentan síntomas pre-cancerosos para prevenir la aparición de carcinoma colorrectal y/o para prevenir la aparición de factores de riesgo del mismo, tal como formación de nuevos focos de cripta aberrantes, formación de nuevos pólipos adenomatosos o nuevos adenomas con displasia. Las células de esta categoría incluyen pólipos y otras lesiones precancerosas, tumores premalignos, fenotipo preneoplásico u otro aberrante que indica la probable progresión a un estado canceroso, basado al menos en parte en el genotipo del promotor *ODC1* del paciente.

I. Metabolismo de poliaminas

El exceso de formación de poliaminas participa desde hace tiempo en la carcinogénesis epitelial, particularmente carcinogénesis colorrectal. Las poliaminas son pequeñas moléculas ubicuas que participan en diversos procesos, que incluyen transcripción, estabilización de ARN, apertura de canales de iones y otros (Wallace, 2000). La ornitina descarboxilasa (ODC), la primera enzima en la síntesis de poliaminas, es esencial para el desarrollo normal y reparación de tejido en mamíferos, pero se regula por disminución en la mayoría de los tejidos adultos (Gerner y Meyskens, 2004). Múltiples anomalías en el control del metabolismo y transporte de poliaminas producen elevados niveles de poliamina que pueden promover la tumorigénesis en varios tejidos (Thomas y Thomas, 2003).

El metabolismo de poliaminas está regulado por incremento en tejidos epiteliales intestinales de seres humanos con poliposis adenomatosa familiar (PAF) (Giardiello y col., 1997), un síndrome asociado a alto riesgo de cáncer de

colon y otros cánceres.

La PAF puede producirse por mutaciones en el gen supresor de tumores poliposis adenomatosa coli (*APC*) y se ha mostrado que la señalización de *APC* regula la expresión de ODC en tanto células humanas (Fultz y Gerner, 2002) como en un modelo de ratón de PAF (Erdman y col., 1999).

La expresión de *APC* natural conduce a reducir la expresión de ODC, mientras que *APC* mutante conduce a aumentar la expresión de ODC. El mecanismo de regulación de ODC dependiente de *APC* implica factores de transcripción de la caja E, que incluye el activador transcripcional *c-MYC* y el represor transcripcional *MAD1* (Fultz y Gerner, 2002; Martínez y col., 2003). Se mostró por otros que *c-MYC* regulaba la transcripción de ODC (Bellofernandez y col., 1993). Varios genes que participan en el metabolismo de poliaminas son genes esenciales para el crecimiento óptimo en la mayoría de los organismos, y se regulan por disminución en células y tejidos no proliferantes y/o adultos (Gerner y Meyskens, 2004). Las poliaminas influyen en fenotipos celulares específicos, en parte, afectando patrones de expresión génica, como se revisa en cualquier parte (Childs y col., 2003).

Como se describe más adelante, una estrategia que implica la inhibición de la actividad de ODC (es decir, la enzima limitante de la velocidad de la síntesis de poliaminas) y/o reducción de los niveles de poliamina celular ha demostrado una sorprendente eficacia en prevenir la reaparición de pólipos colorrectales en seres humanos. Resultados epidemiológicos y experimentales de la presente investigación demuestran regulación condicional de la homeostasis de poliaminas por polimorfismo genético en ODC, y sugieren un modelo en el que el SNP de ODC +316 puede ser protector para la reaparición de adenoma de colon y perjudicial para la supervivencia después del diagnóstico de cáncer de colon. Esta información puede usarse para determinar el pronóstico de cáncer de colon. Identificando pacientes en riesgo elevado de progresión/reaparición de cáncer puede establecerse la implementación temprana de estrategias de gestión de la prevención terciaria. Adicionalmente, esta investigación puede usarse para identificar pacientes con cáncer colorrectal locorregional de alto riesgo, pero de otro modo óptimamente tratados, que se beneficiarían de las terapias de prevención terciaria del cáncer.

Dependiendo de la dieta de un paciente, el problema de las poliaminas en exceso puede agravarse por el hecho de que las poliaminas, por ejemplo, la putrescina están presentes en muchos alimentos comunes, tales como zumo de naranja, que contiene aproximadamente 400 ppm de putrescina. A este respecto, una dieta alta en poliaminas es contraindicativa, y para algunas de las realizaciones proporcionadas en el presente documento debe evitarse una dieta tal. Véase la solicitud de patente provisional de EE.UU. por Kavitha P. Raj, Jason A. Zell, Christine E. McLaren, Eugene W. Gerner, Frank L. Meyskens y Jeffrey Jacob, titulada "Cancer Prevention and Treatment Methods Based on Dietary Polyamine Content", presentada el 14 de mayo de 2010.

II. Poliposis adenomatosa familiar

La poliposis adenomatosa familiar (PAF), un síndrome de poliposis heredado, es el resultado de mutación de la línea germinal del gen supresor de tumores poliposis adenomatosa coli (*APC*) (Su y col., 1992). Esta afección autosómica-dominante con expresión variable está asociada al desarrollo de cientos de adenomas colónicos, que progresan uniformemente a adenocarcinoma a los cuarenta años de edad, dos décadas antes que la edad media de diagnóstico para cáncer de colon esporádico (Bussey, 1990). En estudios previos de individuos pre-sintomáticos con PAF se han detectado elevados niveles de las poliaminas espermidina y espermina, y su precursor de diamina putrescina en biopsias colorrectales de aparición normal cuando se comparó con controles de miembros de la familia normales (Giardiello y col., 1997). La actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC), la primera enzima y limitante de la velocidad en la síntesis de poliaminas de mamífero, también es elevada en biopsias de la mucosa colónica aparentemente normales de pacientes con PAF (Giardiello y col., 1997; Luk y Baylin, 1984). Estos hallazgos son de interés ya que las poliaminas son necesarias para la proliferación celular óptima (Pegg, 1986). Además, la supresión de la actividad de ODC, usando el inhibidor irreversible activado por la enzima DFMO, inhibe la carcinogénesis del colon en roedores tratados con carcinógeno (Kingsnorth y col., 1983; Tempero y col., 1989).

Como se trata en mayor detalle más adelante, el ratón Min (neoplasia intestinal múltiple), que comparte un genotipo *APC/apc* mutado con PAF, sirve de modelo animal experimental útil para pacientes con PAF humana (Lipkin, 1997). El ratón Min puede desarrollar más de 100 adenomas/adenocarcinomas gastrointestinales a lo largo del tubo gastrointestinal durante 120 días de vida conduciendo a hemorragia GI, obstrucción y muerte. Se mostró que una terapia de combinación de DFMO y sulindaco era eficaz en reducir adenomas en estos ratones (patente de EE.UU. nº 6.258.845; Gerner y Meyskens, 2004). Los resultados para tratar ratones Min con tanto DFMO sola, sulindaco solo, como una combinación de DFMO y sulindaco, sobre la formación tumoral en tanto el colon como el intestino delgado se muestran en las FIG. 9-11.

III. Polimorfismo de ornitina descarboxilasa-1

La actividad de ornitina descarboxilasa (ODC), la primera enzima en la síntesis de poliaminas, se requiere para el crecimiento normal y es elevada en muchos cánceres, que incluyen cáncer colorrectal. En el presente documento se examinaron las asociaciones del polimorfismo de ODC +316 de un solo nucleótido (SNP) con la supervivencia específica del cáncer colorrectal (CCR) entre casos de CCR y se investigó su significancia funcional en células de

cáncer de colon.

Un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el intrón-1 del gen *ODC1* humano afecta la transcripción de *ODC1* (Guo y col., 2000), y se ha investigado como marcador genético para riesgo de adenoma colorrectal (ACR) (Martínez y col., 2003; Barry y col., 2006; Hubner y col., 2008). La frecuencia informada del alelo A menor es aproximadamente del 25 % y, a pesar de diferencias entre la raza/etnicidad, la distribución del genotipo de *ODC1* está en equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de cada raza (O'Brien y col., 2004; Zell y col., 2009). Individuos homocigóticos para el alelo A menor de *ODC1* tienen riesgo reducido de reaparición de adenoma en comparación con aquellos con el alelo G mayor (Martínez y col., 2003; Hubner y col., 2008). Además, el alelo A de *ODC1* (genotipo AA o GA, pero no genotipo GG) y el uso informado de aspirina se han asociado a reducida reaparición de pólipos de colon (Martínez y col., 2003; Barry y col., 2006; Hubner y col., 2008), y a un riesgo reducido del 50 % estadísticamente significativo de adenomas avanzados (Barry y col., 2006).

Se investigó la unión específica a alelos de ODC de factores de transcripción de la caja E y se evaluó la significancia funcional del SNP de ODC +316, localizado entre dos cajas E (caja E 2 y 3 como se representa en la FIG. 2A). Cada genotipo de la línea celular influye en un sitio de restricción consenso PstI en esta región. La FIG. 2B muestra que un producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hecho de células HT29 de colon humano fue parcialmente sensible a corte con PstI, sugiriendo que estas células contuvieron al menos un alelo A de ODC. Un producto de PCR hecho de células HCT116 de colon humano usando los mismos cebadores fue insensible a la acción de PstI, que implica que estas células contuvieron solo alelos G de ODC. Este resultado se confirmó por secuenciación directa de ADN.

La expresión de proteínas de unión a la caja E específicas, que incluyen el activador transcripcional *c-MYC* y varios represores transcripcionales en células HT29 y HCT116 (por ejemplo, *MAD1* y *MAD4*), se estableció por transferencia Western (FIG. 3A). Se realizó el análisis de inmunoprecipitación de cromatina (CHIP) de la región que rodea +316 del promotor ODC usando anticuerpos dirigidos contra estas proteínas. Como se muestra en la FIG. 3B, los productos de PCR específicos del promotor ODC se sintetizaron a partir de ADN de HT29 obtenido después de la inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpos dirigidos contra *c-MYC*, *MAD1* o *MAD4*. Los productos de PCR sintetizados a partir de ADN de HCT116 después de inmunoprecipitación con cromatina similar se redujeron sustancialmente en comparación con aquellos sintetizados a partir de ADN de HT29. La cuantificación de estos resultados indicó que la unión de *c-MYC*, *MAD1* y *MAD4* a la región de SNP de ODC fue 4-14 veces mayor en células HT29, que contuvieron un alelo A de ODC, en comparación con células HCT116, que solo contuvieron alelos G de ODC.

Se evaluó la actividad del promotor específico de alelos de ODC. La hipótesis de que SNP de ODC +316 influyó en la expresión de ODC de un modo dependiente de la expresión de activadores y represores de la caja E se probó del siguiente modo. La co-transfección transitoria de células HT29 derivadas de cáncer de colon se llevó a cabo con construcciones de promotor específicas de alelos de ODC en combinación con vectores que expresan tanto el activador transcripcional *c-MYC* como el represor *MAD1* (FIG. 4A y B). Las barras de error estándar mostradas reflejan la variabilidad de mediciones por triplicado dentro de un único experimento representativo, que se ha replicado. Los indicadores del promotor específicos de alelos usados en estos experimentos incluyeron las tres cajas E mostradas en la FIG. 2A. Como se muestra en la FIG. 4A, la expresión de *c-MYC* tuvo el mayor efecto estimulante sobre los promotores que contienen las tres cajas E consenso y el alelo A de ODC (caja E 1 nt +316 A, $P = 0,0014$). La delección de la caja E en la dirección 5' redujo la actividad del promotor, pero la expresión de *c-MYC* continuó estimulando esta actividad (caja E 1 mut +316 A, $P = 0,0013$). La sustitución de G por A en la posición del SNP +316 redujo la capacidad de *c-MYC* para estimular la actividad del promotor incluso con una caja E consenso flanqueante de 5' intacta. La mutación de la caja E consenso flanqueante de 5' en combinación con el alelo G de ODC redujo adicionalmente la actividad del promotor.

Cuando *MAD1*, en vez de *c-MYC*, se co-transfectó con los indicadores del promotor específicos de alelos de ODC (FIG. 4B), el represor solo fue capaz de reducir la actividad del promotor ODC que contenía las tres cajas E y el alelo A +316 natural ($P = 0,027$). La delección de la caja E en la dirección 5' (caja E 1 mut +316A) redujo significativamente el efecto de *MAD1* sobre la actividad del promotor ODC. La sustitución de G por A en la posición +316 dio promotores que contenían tanto dos como tres cajas E insensibles a la supresión de *MAD1*.

IV. Difluorometilornitina (DFMO)

La DFMO, también conocida como eflornitina, tiene la siguiente designación química: 2-(difluorometil)-*D*-ornitina. Es un inhibidor de ornitina descarboxilasa (ODC) irreversible activado por enzima, la enzima limitante de la velocidad de la ruta biosintética de poliaminas. Como resultado de esta inhibición de la síntesis de poliaminas, el compuesto es eficaz en prevenir la formación de cáncer en muchos sistemas de órganos, inhibiendo el crecimiento del cáncer, y reduciendo el tamaño del tumor. También tiene acción sinérgica con otros agentes antineoplásicos.

Se ha mostrado que la DFMO reduce la tumorigénesis intestinal dependiente de APC en ratones (Erdman y col., 1999). La DFMO oral administrada diariamente a seres humanos inhibe la actividad enzimática de ODC y contenidos de poliamina en varios tejidos epiteliales (Love y col., 1993; Gerner y col., 1994; Meyskens y col., 1994; Meyskens y

col., 1998; Simoneau y col., 2001; Simoneau y col., 2008). Recientemente, los inventores informaron de que la DFMO en combinación con el fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) sulindaco, se ha informado que reduce sustancialmente la tasa de reaparición de adenoma entre individuos con adenomas colónicos cuando se compara con placebos en un ensayo clínico aleatorizado (Meyskens y col., 2008).

La DFMO se sintetizó originalmente por el Centro de Investigación Merrell, Estrasburgo; autorizaciones de la FDA actuales incluyen

- Tripanosomosis africana. Dosificación IV sistémica de alta dosis – no comercializada (Sanofi/OMS)
- forma de dosificación tópica para hirsutismo (crecimiento excesivo del pelo inducido por andrógenos)

Actualmente no se han autorizado formulaciones orales.

La DFMO y su uso en el tratamiento de hipertrofia benigna de próstata se describen en dos patentes, las patentes de EE.UU. nº 4.413.141 y 4.330.559. La patente de EE.UU. nº 4.413.141 describe la DFMO como un poderoso inhibidor de ODC, tanto *in vitro* como *in vivo*. La administración de DFMO produce una disminución en las concentraciones de putrescina y espermidina en células en las que estas poliaminas normalmente se producen activamente. Adicionalmente, se ha mostrado que la DFMO puede ralentizar la proliferación de células neoplásicas cuando se prueban en modelos tumorales convencionales. La patente de EE.UU. nº 4.330.559 describe el uso de DFMO y derivados de DFMO para el tratamiento de hipertrofia benigna de próstata. La hipertrofia benigna de próstata, al igual que muchos estados de enfermedad caracterizados por la rápida proliferación celular, va acompañada de elevación anormal de las concentraciones de poliamina. El tratamiento descrito dentro de esta referencia puede administrarse a un paciente tanto por vía oral, como parenteralmente.

La DFMO puede administrarse posiblemente continuamente con efectos antitumorales significativos. Este fármaco es relativamente no tóxico a dosis bajas de 0,4 g/m²/día a seres humanos mientras que produce la inhibición de la síntesis de putrescina en tumores. Estudios en un modelo de tumor de rata demuestran que la infusión de DFMO puede producir una disminución del 90 % en los niveles de putrescina tumoral sin suprimir los números de plaquetas periféricas.

Efectos secundarios observados con DFMO incluyen efectos sobre la audición a altas dosis de 4 g/m²/día que se solucionan cuando se suspende. Estos efectos sobre la audición no se observan a dosis menores de 0,4 g/m²/día cuando se administran durante hasta un año (Meyskens y col., 1994). Además, se observan algunos casos de mareos/vértigo que se solucionan cuando el fármaco se detiene. Se ha informado de trombocitopenia predominantemente en estudios usando altas dosis "terapéuticas" de DFMO (>1,0 g/m²/día) y principalmente en pacientes con cáncer que habían recibido previamente quimioterapia o pacientes con médula ósea comprometida. Aunque la toxicidad asociada a terapia con DFMO no es, en general, tan grave como otros tipos de quimioterapia, en ensayos clínicos limitados se ha encontrado que promovía una trombocitopenia relacionada con la dosis. Además, estudios en ratas han mostrado que la infusión continua de DFMO durante 12 días reduce significativamente los números de plaquetas en comparación con controles. Otras investigaciones han hecho observaciones similares en las que la trombocitopenia es la principal toxicidad de la terapia de DFMO i.v. continua. Estos hallazgos sugieren que la DFMO puede inhibir significativamente la actividad de ODC de precursores de la médula ósea de megacariocitos. La DFMO puede inhibir los procesos de reparación proliferativa, tales como cicatrización epitelial.

Un ensayo clínico de fase III evaluó la reaparición de pólipos adenomatosos después del tratamiento durante 36 meses con difluorometilornitina (DFMO) más sulindaco o placebos de correspondencia. La sordera parcial temporal es una toxicidad conocida del tratamiento con DFMO, así se desarrolló un enfoque completo para analizar audiogramas de conducción del aire en serie. El procedimiento de ecuaciones de estimación generalizadas estimó la diferencia media entre los brazos de tratamiento con respecto al cambio en los umbrales de tono puro de conducción del aire mientras que representa la correlación dentro del sujeto debido a mediciones repetidas a frecuencias. Basándose en 290 sujetos, hubo una diferencia promedio de 0,50 dB entre sujetos tratados con DFMO más sulindaco en comparación con aquellos tratados con placebo (intervalo de confianza del 95 %, -0,64 a 1,63 dB; P = 0,39), ajustado para valores del nivel inicial, edad y frecuencias. En el intervalo de habla normal de 500 a 3.000 Hz se detectó una diferencia estimada de 0,99 dB (-0,17 a 2,14 dB; P = 0,09). La intensidad de la dosis no añadió información a los modelos. Hubo 14 de 151 (9,3 %) en el grupo de DFMO más sulindaco y 4 de 139 (2,9 %) en el grupo de placebo que experimentaron al menos 15 dB de reducción de la audición desde el nivel inicial en 2 o más frecuencias consecutivas a través del intervalo entero probado (P = 0,02). El seguimiento de la conducción del aire hecho al menos 6 meses después del final del tratamiento mostró una diferencia media ajustada en los umbrales de audición de 1,08 dB (-0,81 a 2,96 dB; P = 0,26) entre brazos de tratamiento. No hubo diferencia significativa en la proporción de sujetos en el grupo de DFMO más sulindaco que experimentaron sordera parcial clínicamente significativa en comparación con el grupo de placebo. El riesgo atribuible estimado de ototoxicidad de exposición al fármaco es del 8,4 % (intervalo de confianza del 95 %, -2,0 % al 18,8 %; P = 0,12). Hay una diferencia < 2 dB en el umbral medio para pacientes tratados con DFMO más sulindaco en comparación con aquellos tratados con placebo. Los resultados de este estudio se tratan en mayor detalle en McLaren y col., 2008. En el presente documento se

proporcionan procedimientos de reducción y/o prevención de la ototoxicidad en pacientes tratados con agentes tales como DFMO y sulindaco.

V. AINE

Los AINE son agentes antiinflamatorios que no son esteroides. Además de las acciones antiinflamatorias, tienen acciones analgésicas, antipiréticas e inhibidoras de plaquetas. Se usan principalmente en el tratamiento de afecciones artríticas crónicas y ciertos trastornos de tejidos blandos asociados a dolor e inflamación. Actúan bloqueando la síntesis de prostaglandinas que inhiben ciclooxigenasa, convirtiendo el ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos, precursores de prostaglandinas. La inhibición de la síntesis de prostaglandinas explica sus acciones analgésicas, antipiréticas e inhibidoras de plaquetas; otros mecanismos pueden contribuir a sus efectos antiinflamatorios. Ciertos AINE también pueden inhibir las enzimas lipoxigenasas o fosfolipasa C o pueden modular la función de linfocitos T (AMA Drug Evaluations Annual, 1814-5, 1994).

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), que incluyen aspirina, ibuprofeno, piroxicam (Reddy y col., 1990; Singh y col., 1994), indometacina (Narisawa, 1981) y sulindaco (Piazza y col., 1997; Rao y col., 1995), inhiben eficazmente la carcinogénesis de colon en el modelo de rata tratada con AOM. Los AINE también inhiben el desarrollo de tumores que alojan un Ki-ras activado (Singh y Reddy, 1995). Parece que los AINE inhiben la carcinogénesis mediante la inducción de apoptosis en células tumorales (Bedi y col., 1995; Lupulescu, 1996; Piazza y col., 1995; Piazza y col., 1997b). Varios estudios sugieren que las propiedades quimiopreventivas de los AINE, que incluyen la inducción de apoptosis, es una función de su capacidad para inhibir la síntesis de prostaglandinas (revisado en DuBois y col., 1996; Lupulescu, 1996; Vane y Botting, 1997). Sin embargo, estudios indican que los AINE pueden actuar mediante tanto mecanismos dependientes como independientes de prostaglandinas (Alberts y col., 1995; Piazza y col., 1997a; Thompson y col., 1995; Hanif, 1996). La sulindaco sulfona, un metabolito del AINE sulindaco, carece de actividad inhibidora de la COX, aunque induce apoptosis en células tumorales (Piazza y col., 1995; Piazza y col., 1997b) e inhibe el desarrollo tumoral en varios modelos de roedor de carcinogénesis (Thompson y col., 1995; Piazza y col., 1995, 1997a).

Se han examinado varios AINE para sus efectos en ensayos clínicos humanos. Se ha completado un ensayo de fase IIa (un mes) de ibuprofeno e incluso a la dosis de 300 mg/día se observó una disminución significativa en los niveles de prostaglandina E₂ (PGE₂) en mucosa plana. Una dosis de 300 mg de ibuprofeno es muy baja (intervalo de dosis terapéutica de 1200-3000 mg/día o más), y es poco probable que se observe toxicidad, incluso durante a largo plazo. Sin embargo, en modelos de quimioprevención animal, el ibuprofeno es menos eficaz que otros AINE.

A. Sulindaco y sus principales metabolitos, sulindaco sulfona y sulindaco sulfuro

El sulindaco es un derivado de indeno antiinflamatorio no esteroideo con la siguiente designación química: ácido (Z)-5-fluoro-2-metil-1-((4(metilsulfinil)fenil)metilen)-1H-indeno-3-acético (Physician's Desk Reference, 1999). El resto sulfonyl se convierte *in vivo* por reducción reversible en un metabolito de sulfuro y por oxidación irreversible en un metabolito de sulfona (exisulind). Véase la patente de EE.UU. 6.258.845. El sulindaco, que también inhibe la activación de Ki-ras, se metaboliza a dos moléculas diferentes que se diferencian en su capacidad para inhibir la COX, incluso ambas pueden ejercer efectos quimiopreventivos mediante la inducción de apoptosis. La sulindaco sulfona carece de actividad inhibidora de la COX, y lo más probablemente facilita la inducción de apoptosis de un modo independiente de la síntesis de prostaglandinas. Pruebas disponibles indican que el derivado de sulfuro es al menos uno de los compuestos biológicamente activos. Basándose en esto, el sulindaco puede considerarse un profármaco.

El sulindaco (Clinoril®) está disponible, por ejemplo, como comprimidos de 150 mg y 200 mg. La dosificación más común para adultos es 150 a 200 mg dos veces a día, con una dosis diaria máxima de 400 mg. Después de la administración por vía oral, aproximadamente el 90 % del fármaco se absorbe. Los niveles en plasma pico se consiguen en aproximadamente 2 horas en pacientes en ayunas y 3 a 4 horas cuando se administran con comida. La semivida media del sulindaco es 7,8 horas: la semivida media del metabolito de sulfuro es 16,4 horas. Las patentes de EE.UU. nº 3.647.858 y 3.654.349 cubren preparaciones de sulindaco.

El sulindaco se indica para el alivio agudo y a largo plazo de signos y síntomas de osteoartritis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, gota aguda y hombro doloroso agudo. Los efectos analgésicos y antiinflamatorios ejercidos por el sulindaco (400 mg por día) son comparables a aquellos alcanzados por la aspirina (4 g por día), ibuprofeno (1200 mg por día), indometacina (125 mg por día) y fenilbutazona (400 a 600 mg por día). Efectos secundarios del sulindaco incluyen efectos gastrointestinales leves en casi el 20 % de los pacientes, siendo el dolor abdominal y las náuseas las molestias más frecuentes. Se observan efectos secundarios del CNS en hasta el 10 % de los pacientes, siendo la somnolencia, cefalea y nerviosismo aquellos más frecuentemente informados. Se produce erupción cutánea y prurito en el 5 % de los pacientes. El tratamiento crónico con sulindaco puede conducir a grave toxicidad gastrointestinal tal como hemorragia, ulceración y perforación.

Se ha estudiado bien el posible uso de sulindaco para la quimioprevención de cánceres, y en particular pólipos colorrectales. Dos patentes de EE.UU. nº 5.814.625 y 5.843.929 recientes detallan posibles usos quimiopreventivos

del sulindaco en seres humanos. Las dosis de sulindaco reivindicadas en la patente de EE.UU. nº 5.814.625 oscilan de 10 mg a 1500 mg por día, con dosis preferidas de 50 mg a 500 mg por día. Sin embargo, a mayores dosis, el mayor problema con el uso de sulindaco como único agente en la quimioprevención es sus toxicidades muy conocidas y riesgo moderadamente alto de intolerancia. Parece que los ancianos son especialmente vulnerables, ya que la incidencia de efectos secundarios es mayor en aquellos por encima de la edad de 60. Se observa que es más probable que este grupo de edad desarrolle cáncer colorrectal y, por tanto, es más probable que se beneficie de la quimioprevención.

El sulindaco y su metabolito de sulfona exisulind se han probado y continúan probándose clínicamente para la prevención y el tratamiento de varios tipos de cáncer. ClinicalTrials.gov, una base de datos del Instituto Nacional Estadounidense de Salud, proporciona la siguiente visión general a partir del 10 de mayo de 2010.

Estado	Ensayo clínico
Reclutando	Un estudio aleatorizado de sulindaco en lesiones premalignas orales Afecciones: Leucoplaquia, Oral; neoplasias benignas Intervenciones: Fármaco: sulindaco; Fármaco: placebo Patrocinadores: Centro Oncológico Memorial Sloan-Kettering; Cirugía de cabeza y cuello, AIMS, Cochin, India; Colegio Médico Weill de la Universidad de Cornell; Centro Regional del Cáncer (RCC), Trivandrum, India; Centro del Cáncer Mazumdar Shaw (MSCC) Fase: No registrada
Reclutando	Sulindaco en la prevención de melanoma en participantes sanos que están en riesgo elevado de melanoma Afección: Afección precancerosa Intervenciones: Fármaco: sulindaco; Otro: placebo Patrocinadores: Universidad de Arizona; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase: Fase II
Activo, no reclutando	Eflornitina y sulindaco en la prevención de cáncer colorrectal en pacientes con pólipos de colon Afecciones: Cáncer colorrectal; afección precancerosa/no maligna Intervención: Fármaco: eflornitina más sulindaco Patrocinadores: Universidad de California, Irvine; Centro Integral del Cáncer de la familia Chao; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase: Fase III
Completado	Sulindaco en la prevención de cáncer de mama en mujeres en alto riesgo de cáncer de mama Afección: Cáncer de mama Intervenciones: Fármaco: sulindaco; Otro: análisis de biomarcadores de laboratorio Patrocinadores: Universidad de Arizona; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase: Fase I
Completado	Cápsulas de sulindaco en comparación con comprimidos de sulindaco en voluntarios sanos Afección: Tumor sólido en adultos no especificado, protocolo específico Intervenciones: Fármaco: sulindaco; Otro: estudio farmacológico Patrocinadores: Clínica Mayo; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase:
Activo, no reclutando	Eflornitina más sulindaco en la prevención de cáncer colorrectal en pacientes con pólipos colorrectales benignos Afección: Cáncer colorrectal Intervención: Fármaco: eflornitina más sulindaco Patrocinadores: Universidad de California, Irvine; Centro Integral del Cáncer de la familia Chao; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase: Fase II

Activo, no reclutando	Bevacizumab/tarceva y tarceva/sulindaco en carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello Afección: Carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello (CCECC) Intervenciones: Fármaco: bevacizumab; Fármaco: erlotinib; Fármaco: sulindaco Patrocinadores: Hospital General de Massachusetts; Instituto del Cáncer Dana-Farber; Universidad de Emory; Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill; Genentech; OSI Pharmaceuticals Fase: Fase II
Activo, no reclutando	Sulindaco en la prevención de cáncer de pulmón en fumadores actuales o exfumadores con displasia bronquial Afecciones: Cáncer de pulmón; afección precancerosa; Trastorno por el uso de tabaco Intervenciones: Fármaco: sulindaco; Otro: placebo Patrocinadores: Clínica Mayo; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase: Fase II
Completado	Sulindaco y tamoxifeno en el tratamiento de pacientes con tumor desmoide Afección: Tumor desmoide Intervenciones: Fármaco: sulindaco; Fármaco: citrato de tamoxifeno Patrocinadores: Grupo de Oncología Pediátrica; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase: Fase II
Reclutando	Sulindaco y epirubicina en el tratamiento de pacientes con melanoma maligno metastásico Afección: Melanoma (piel) Intervenciones: Fármaco: clorhidrato de epirubicina; Fármaco: sulindaco; Otro: técnica inmunológica Patrocinador: Todo el Grupo Cooperativo Irlandés de Investigación Oncológica Fase: Fase II
Completado	Atorvastatina, inulina enriquecida en oligofructosa o sulindaco en la prevención de cáncer en pacientes en riesgo elevado de desarrollar neoplasia colorrectal Afecciones: Cáncer colorrectal; afección precancerosa Intervenciones: Suplemento dietético: inulina enriquecida en oligofructosa; Fármaco: atorvastatina cálcica; Fármaco: sulindaco; Otro: placebo Patrocinadores: Clínica Mayo; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase: Fase II
Suspendido	Sulindaco y compuestos vegetales en la prevención de cáncer de colon Afección: Cáncer colorrectal Intervenciones: Suplemento dietético: curcumina; Suplemento dietético: rutina; Fármaco: quercetina; Fármaco: sulindaco Patrocinador: Universidad de Rockefeller Fase:
Activo, no reclutando	Comparación de sulindaco, aspirina y ursodiol en la prevención de cáncer colorrectal Afección: Cáncer colorrectal Intervenciones: Fármaco: ácido acetilsalicílico; Fármaco: sulindaco; Fármaco: ursodiol Patrocinadores: Centro Oncológico M.D. Anderson; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase: Fase II
Completado	Sulindaco y docetaxel en el tratamiento de mujeres con cáncer de mama metastásico o recurrente Afección: Cáncer de mama Intervenciones: Fármaco: docetaxel; Fármaco: sulindaco Patrocinadores: Centro Oncológico Fox Chase; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase: Fase II

Reclutando	Influencia de sulindaco y prebióticos sobre el desarrollo de adenomas de la bolsa en pacientes con poliposis adenomatosa familiar Afección: Poliposis adenomatosa Coli Intervenciones: Fármaco: sulindaco (fármaco); Fármaco: VSL#3 (probiótico); Fármaco: inulina (probiótico) Patrocinadores: Universidad de Radboud; Sociedad Oncológica Holandesa Fase: Fase II
Terminado	Los efectos de curcuminoides sobre focos de cripta aberrantes en el colon humano Afección: Focos de cripta aberrantes Intervenciones: Fármaco: sulindaco; Fármaco: curcumina Patrocinador: Universidad de Medicina y Odontología de Nueva Jersey Fase:
Reclutando	Uso de curcumina para el tratamiento de adenomas intestinales en poliposis adenomatosa familiar (PAF) Afecciones: Pólipos del tracto inferior en pacientes con PAF; Pólipos del tracto superior en pacientes con PAF Intervenciones: Fármaco: calcumina (curcumina); Otro: cuestionario de factores de riesgo; Otro: muestras de sangre; Otro: biopsias (sigmoidoscopia); Otro: biopsias (endoscopia superior) Patrocinador: Universidad de Puerto Rico Fase:
Activo, no reclutando	Para prolongar la duración sin tratamiento de la supresión de andrógenos intermitente Afección: Cáncer de próstata Intervenciones: Fármaco: flutamida; Fármaco: acetato de leuprolida; Fármaco: exisulind Patrocinadores: Universidad de Washington; OSI Pharmaceuticals Fase: Fase II
Completado	Seguridad, eficacia y farmacocinética entre capecitabina y exisulind en pacientes con cáncer de mama metastásico Afecciones: Neoplasias de mama; metástasis, neoplasia Intervenciones: Fármaco: capecitabina; Fármaco: exisulind Patrocinadores: Centro Oncológico M.D. Anderson; Cell Pathways Fases: Fase I / Fase II
Completado	<u>Exisulind neoadyuvante en el tratamiento de pacientes que se someten a prostatectomía radical para cáncer de próstata de estadio II o estadio III</u> Afección: Cáncer de próstata Intervenciones: Fármaco: exisulind; Procedimiento: cirugía convencional; Procedimiento: terapia neoadyuvante Patrocinadores: Clínica Mayo; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase: Fase II
Completado	<u>Quimioterapia de combinación en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado</u> Afección: Cáncer de pulmón Intervenciones: Fármaco: carboplatino; Fármaco: exisulind; Fármaco: clorhidrato de gemcitabina Patrocinadores: Grupo Oncológico Cooperativo del Este; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase: Fase II
Completado	<u>Estudio de fase II de taxotere en combinación con exisulind en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP)</u> Afección: CPCNP Intervención: Fármaco: exisulind Patrocinador: OSI Pharmaceuticals Fases: Fase I / Fase II

Completado	<u>Un estudio de fase III de la eficacia de taxotere/Aptosyn frente a taxotere/placebo en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas</u> Afección: Cáncer de pulmón de células no pequeñas Intervención: Fármaco: exisulind Patrocinador: OSI Pharmaceuticals Fase: Fase III
Completado	<u>Exisulind frente a placebo después de la extracción quirúrgica de la próstata</u> Afección: Neoplasias prostáticas Intervención: Fármaco: exisulind Patrocinadores: Clínica Mayo; OSI Pharmaceuticals Fase: Fase II
Completado	<u>Docetaxel, estramustina y exisulind en el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata metastásico que no han respondido a terapia hormonal</u> Afección: Cáncer de próstata Intervenciones: Fármaco: docetaxel; Fármaco: fosfato sódico de estramustina; Fármaco: exisulind Patrocinadores: Cáncer y Leucemia Grupo B; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase: Fase II
Completado	<u>Quimioterapia de combinación y exisulind en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas de estadio extendido</u> Afección: Cáncer de pulmón Intervenciones: Fármaco: carboplatino; Fármaco: etopósido; Fármaco: exisulind Patrocinadores: Cáncer y Leucemia Grupo B; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase: Fase II
Activo, no reclutando	<u>Exisulind en la prevención de pólipos en pacientes con poliposis adenomatosa familiar</u> Afecciones: Cáncer colorrectal; cáncer del intestino delgado Intervención: Fármaco: exisulind Patrocinador: Universidad de Utah Fases: Fase II / Fase III
Completado	<u>Exisulind antes de prostatectomía radical</u> Afección: Neoplasias prostáticas Intervención: Fármaco: terapia con exisulind Patrocinadores: Clínica Mayo; Instituto Nacional del Cáncer (NCI) Fase: Fase II

B. Piroxicam

- 5 Un agente antiinflamatorio no esteroideo que está muy establecido en el tratamiento de artritis reumatoide y osteoartritis con la siguiente designación química: 1,1-dióxido de 4-hidroxi-2-metil-*N*-2-piridil-2*H*-1,2-benzotiazin-3-carboxamida. Su utilidad también se ha demostrado en el tratamiento de trastornos musculoesqueléticos, dismenorrea y dolor posoperatorio. Su larga semivida permite que se administre una vez al día. Se ha mostrado que el fármaco es eficaz si se administra rectalmente. Las molestias gastrointestinales son los efectos secundarios más
- 10 frecuentemente informados.

Se ha mostrado que el piroxicam es un agente de quimioprevención eficaz en modelos animales (Pollard y Luckert, 1989; Reddy y col., 1987), aunque demostró efectos secundarios en un reciente ensayo IIb. Un gran meta-análisis de los efectos secundarios de los AINE también indica que el piroxicam tiene más efectos secundarios que otros

15 AINE (Lanza y col., 1995). Se ha mostrado que el sulindaco produce la regresión de adenomas en pacientes con poliposis adenomatosa familiar (PAF) (Muscat y col., 1994), aunque al menos un estudio en adenomas esporádicos no ha mostrado tal efecto (Ladenheim y col., 1995).

Se ha mostrado que la combinación de DFMO y piroxicam tiene un efecto quimiopreventivo sinérgico en el modelo de rata tratada con AOM de carcinogénesis de colon (Reddy y col., 1990), aunque la DFMO ejerció un mayor efecto supresor que el piroxicam sobre la mutación Ki-ras y tumorigénesis cuando cada agente se administró por separado (Reddy y col., 1990). En un estudio, la administración de DFMO o piroxicam a ratas tratadas con AOM redujo el número de tumores que alojaban mutaciones Ki-ras del 90 % al 36 % y 25 %, respectivamente (Singh y col., 1994). Ambos agentes también redujeron la cantidad de p21 ras bioquímicamente activo en tumores existentes.

25

C. Combinaciones de AINE

También se usan combinaciones de diversos AINE para diversos fines. Usando menores dosis de dos o más AINE es posible reducir los efectos secundarios o toxicidades asociadas a mayores dosis de AINE individuales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sulindaco puede usarse junto con celecoxib. En algunas realizaciones, uno o ambos de los AINE son inhibidores selectivos de la COX-2. Ejemplos de AINE que se usan de nuevo tanto solos como en combinación incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina, indometacina, sulindaco, etodolaco, diclofenaco, piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lomoxicam, isoxicam, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido tolfenámico, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, lumiracoxib o etoricoxib.

VI. Terapia de combinación de eflornitina/sulindaco

Estudios preclínicos de fármacos de quimioprevención administrados en combinación a bajas dosis muestran una eficacia sorprendente en la prevención de adenomas con pocas toxicidades adicionales, sugiriendo una estrategia para mejorar las relaciones de riesgo con respecto a beneficio para prevenir adenomas recurrentes.

Como se observa anteriormente, el ratón *Min* (neoplasia intestinal múltiple), que comparte un genotipo *APC/apc* mutado con PAF, sirve de modelo animal experimental útil para pacientes con PAF humano (Lipkin, 1997). El ratón *Min* puede desarrollar más de 100 adenomas/adenocarcinomas gastrointestinales a lo largo del tubo gastrointestinal durante 120 días de vida conduciendo a hemorragia GI, obstrucción y muerte. Se mostró que una terapia de combinación de DFMO y sulindaco era eficaz en reducir adenomas en estos ratones (patente de EE.UU. nº 6.258.845; Gerner y Meyskens, 2004). Los resultados para tratar ratones *Min* con tanto DFMO sola, sulindaco solo, como una combinación de DFMO y sulindaco sobre la formación de tumores en tanto el colon como el intestino delgado se muestran en las FIG. 9 y 10. La FIG. 9 muestra el número promedio de tumores por tamaño en el colon de los tres grupos de tratamiento en comparación con controles sin tratar. La FIG. 10 muestra el número promedio de tumores por tamaño en el intestino delgado de los tres grupos de tratamiento en comparación con controles sin tratar. La FIG. 11 muestra cómo el número de adenomas de alto grado varía dependiendo de terapia, sola o combinación.

VII. Eficacia de la terapia inhibidora de poliamina basada en el perfil del paciente

Se demostró la eficacia de una combinación inhibidora de poliamina de *D,L*- α -difluorometilornitina (DFMO, eflornitina) oral diaria a largo plazo y sulindaco entre pacientes con CRA (Meyskens y col., 2008); sin embargo, el tratamiento se asoció a modesta ototoxicidad subclínica (McLaren y col., 2008) y un mayor número de acontecimientos cardiovasculares entre pacientes con alto riesgo cardiovascular inicial (Zell y col., 2009). Los inventores han investigado determinado ahora que el genotipo de *ODC1* afecta diferencialmente la reaparición de adenoma, respuestas de poliamina de tejido o perfiles de toxicidad después del tratamiento con eflornitina y sulindaco en comparación con placebo.

Trescientos setenta y cinco pacientes con antecedentes de adenomas reseccionados (> 3 mm) se asignaron aleatoriamente para recibir difluorometilornitina (DFMO) oral 500 mg y sulindaco 150 mg una vez al día o placebos de correspondencia durante 36 meses, estratificados por el uso de baja dosis de aspirina (81 mg) en el nivel inicial y sitio clínico. La colonoscopia de seguimiento se hizo 3 años después de la aleatorización o fuera del estudio. La reaparición de adenoma colorrectal se comparó entre los grupos con regresión logística binomial. Comparando el resultado en pacientes que recibieron placebos con aquellos que recibieron intervención activa, (a) la reaparición de uno o más adenomas fue del 41,1 % y 12,3 % (relación de riesgo, 0,30; intervalo de confianza del 95 %, 0,18-0,49; $P < 0,001$); (b) el 8,5 % tuvo uno o más adenomas avanzados, en comparación con el 0,7 % de pacientes (relación de riesgo, 0,085; intervalo de confianza del 95 %, 0,011-0,65; $P < 0,001$); y (c) 17 (13,2 %) pacientes tuvieron adenomas múltiples (> 1) en la colonoscopia final, en comparación con 1 (0,7 %; relación de riesgo, 0,055; 0,0074-0,41; $P < 0,001$). Se produjeron acontecimientos adversos graves (grado > 3) en el 8,2 % de los pacientes en el grupo de placebo, en comparación con el 11 % en el grupo de intervención activa ($P = 0,35$). No hubo diferencia significativa en la proporción de pacientes que informaron cambios en la audición desde el nivel inicial. Los pólipos adenomatosos recurrentes pueden reducirse notablemente por una combinación de bajas dosis orales de DFMO y sulindaco y con pocos efectos secundarios. Los detalles de este estudio se tratan en mayor detalle más adelante y en Meyskens y col., 2008.

El estudio fue parado por el Comité de Vigilancia de Datos y Seguridad (CVDS) después de que 267 pacientes completaran las colonoscopias del fin del estudio (debido a que el estudio cumplió sus criterios de valoración de eficacia). El CVDS monitorizó todos los criterios de valoración de seguridad y eficacia. Como se trata en mayor detalle en la sección de ejemplos, este estudio implica el análisis de datos de pacientes del ensayo de prevención de adenoma de colon de fase III multicéntrico. Véase también (Meyskens y col., 2008).

A. Distribución del genotipo de *ODC1*

Se usaron un total de 440 casos de cáncer colorrectal (CCR) identificados del estudio de genes-medioambiente de CCR de UC Irvine en el análisis de solo casos. La mediana de la duración del seguimiento fue 11 años. Hubo 270 (61 %) casos de cáncer de colon, 162 (37 %) casos de cáncer rectal y 8 (2 %) casos de CCR de localización no especificada. Los datos clinicopatológicos para casos de cáncer de colon y rectal se muestran en la Tabla 1. La distribución del genotipo de *ODC* +316 entre todos los casos de CCR fue del 53 % de GG, 41 % de GA y 7 % de AA. La distribución del genotipo de *ODC* +316 fue similar entre casos de CCR con y sin un antecedente familiar. No hubo diferencias significativas en la distribución del genotipo de *ODC* por edad ($P = 0,38$), sexo ($P = 0,56$), antecedente familiar ($P = 0,94$), sitio dentro del colon-recto ($P = 0,55$), histología ($P = 0,46$) o grado de tumor ($P = 0,73$). La distribución del genotipo de *ODC* no se diferenció significativamente por estadio en el diagnóstico: estadio I (49 % de GG, 42 % de GA, 8 % de AA), estadio II (56 % de GG, 38 % de GA, 6 % de AA), estadio III (51 % de GG, 43 % de GA, 6 % de AA), estadio IV (59 % de GG, 37 % de GA, 4 % de AA) ($P = 0,87$). La distribución del genotipo de *ODC* por etnicidad reveló diferencias significativas: caucásicos (382 casos: 53 % de GG, 41 % de GA, 6 % de AA, frecuencia del alelo A menor = 26 %), afroamericanos (7 casos: 71 % de GG, 29 % de GA, 0 % de AA, frecuencia del alelo A menor = 15 %), hispanos (21 casos: 57 % de GG, 43 % de GA, 0 % de AA, frecuencia del alelo A menor = 21 %) y asiáticos (27 casos: 33 % de GG, 41 % de GA, 26 % de AA, frecuencia del alelo A menor = 46 %) ($P = 0,009$). Sin embargo, dentro de cada raza la distribución del genotipo de *ODC* estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg (caucásicos $P = 0,36$, afroamericanos $P = 0,66$, hispanos $P = 0,21$, asiáticos $P = 0,35$).

B. Reparación de adenoma

La distribución del genotipo de *ODC1* fue: 126 GG (55 %), 87 GA (38 %) y 15 AA (7 %). Las características clínicas iniciales revelaron diferencias, como se muestra en la Tabla 1. En modelos de regresión con las variables independientes edad, sexo, raza, uso de aspirina, tratamiento, genotipo de *ODC1* y tratamiento, el tratamiento fue el único factor asociado a diferencias en la reparación de adenoma, respuesta de poliamina de tejido y ototoxicidad. Se detectó una interacción estadísticamente significativa para el genotipo de *ODC1* y el tratamiento en el modelo completo para reparación de adenoma ($P = 0,021$), de forma que el patrón de reparación de adenoma entre pacientes con placebo fue: GG-50 %, GA-35 %, AA-29 % frente a pacientes con eflornitina/sulindaco: GG-11 %, GA-14 %, AA-57 %.

Se detectó una interacción estadísticamente significativa entre genotipo de *ODC1* y tratamiento en este modelo ($P = 0,038$). El genotipo de *ODC1* no estuvo significativamente asociado a una respuesta de putrescina de tejido o respuesta de la relación de espermidina:espermia en los modelos de regresión completa (datos no mostrados). El riesgo relativo (RR) de reparación de adenoma relacionado con el tratamiento después del ajuste en el modelo de regresión completo fue 0,39 (IC del 95 %, 0,24-0,66). No hubo asociaciones significativas entre el grupo de tratamiento y de genotipo de *ODC1* con respecto a acontecimientos adversos cardiovasculares o gastrointestinales (Tablas 3 y 4).

Aquí se observó que el efecto inhibidor del adenoma de eflornitina y sulindaco fue mayor entre aquel con el genotipo de *ODC1* homocigótico G mayor, a diferencia de informes previos que muestran una disminución del riesgo de adenoma recurrente entre pacientes con CCR que recibieron aspirina que llevaban al menos un alelo A (Martínez y col., 2003; Barry y col., 2006; Hubner y col., 2008). La distribución del genotipo de *ODC1* fue similar a la informada en ensayos previos basados en aspirina (Martínez y col., 2003; Barry y col., 2006; Hubner y col., 2008) y el alelo A se asoció a un menor riesgo de adenoma recurrente no significativo en el grupo de placebo de acuerdo con informes previos (Martínez y col., 2003; Hubner y col., 2008). Estos resultados demuestran que los portadores del alelo A de *ODC1* se diferencia en la respuesta a exposición prolongada a eflornitina y sulindaco en comparación con pacientes con genotipo GG, experimentando los portadores del alelo A menos beneficio en términos de reparación de adenoma, y posibilidades de elevado riesgo de desarrollar ototoxicidad, especialmente entre los homocigotos AA.

C. Análisis de supervivencia

De los 440 casos de CCR, 138 (31 %) había fallecido en el momento de análisis. Sesenta y cuatro (46 %) muertes se produjeron en casos que llevan el genotipo GG, en comparación con 74 (54 %) muertes en casos con los genotipos AA/AG. La causa de la muerte estuvo disponible para 102 de los 138 casos fallecidos de CCR. Ochenta y cinco (83 %) casos de CCR murieron como resultado de CCR. Se observó una mejora estadísticamente significativa en la supervivencia específica de CCR entre todos los casos de CCR homocigóticos para el alelo G de *ODC* (supervivencia a los 10 años = 84 %) en comparación con casos con al menos un alelo A (GA/AA de *ODC*) (supervivencia a los 10 años = 76 %; $P = 0,031$). El análisis de supervivencia específica de CCR por estadio reveló que no se observaron diferencias de supervivencia significativamente diferentes para CCR de estadio I ($P = 0,055$), II ($P = 0,61$) o IV ($P = 0,65$) de AJCC. Sin embargo, entre casos con CCR de estadio III, el genotipo GG de *ODC* se asoció a supervivencia específica de CCR a los 10 años mejorada: 75 % en comparación con 60 % para casos del genotipo GA/AA de *ODC*; $P = 0,024$ (FIG. 1). Entre casos de cáncer de colon se observó un beneficio de la supervivencia específica de CCR estadísticamente significativa para aquellos con genotipo GG de *ODC* en comparación con casos GA/AA de *ODC* (tasa de supervivencia a los 10 años = 87 % frente al 79 %; $P = 0,029$); esto no se observó para casos de cáncer rectal (supervivencia a los 10 años = 78 % para casos de GG de *ODC* frente al

72 % para casos de GA/AA de ODC; $P = 0,42$).

Entre todos los casos de CCR, los cálculos estimados de supervivencia específica de CCR basados en el genotipo de ODC después del ajuste para edad (años), sexo, etnicidad, antecedente familiar de CCR, estadio de TNM en el diagnóstico, sitio tumoral dentro del colon, subtipo histológico, tratamiento con cirugía, radioterapia y quimioterapia fueron como sigue: razón de riesgo (HR) de GG de ODC = 1,00 (referente), HR de GA de ODC = 1,73 y HR del genotipo AA de ODC = 1,73 (tendencia de $P = 0,0283$). Entre casos de colon solo, el análisis de supervivencia específica de CCR reveló que el SNP de ODC +316 era una variable independiente de la supervivencia específica de CCR, después del ajuste para las variables clínicas anteriores. En comparación con casos de cáncer de colon de GG de ODC, el riesgo de muerte específico de CCR (HR) fue 2,31 (1,15-4,64) para el genotipo GA de ODC y 3,73 (0,93-14,99) para el genotipo AA de ODC (tendencia de $P = 0,006$) (Tabla 2). El análisis de supervivencia global de estos casos de cáncer de colon estuvo de acuerdo con el análisis de supervivencia específica de CCR (Tabla 2). Entre casos de cáncer rectal, el análisis de supervivencia específica de CCR reveló que el SNP de ODC +316 no era una variable independiente de la supervivencia específica de CCR después del ajuste para las variables clínicas anteriormente mencionadas. En comparación con casos de cáncer rectal de GG de ODC (HR=1,00, referencia), el riesgo de muerte específico de CCR (HR) fue 1,72 (0,83-3,57) para heterocigotos GA de ODC y 1,93 (0,56-6,67) para homocigotos AA de ODC (tendencia de $P = 0,12$).

Como se observa anteriormente, la distribución del genotipo de ODC +316 se diferenció entre la etnicidad. El riesgo de mortalidad observado, además de por casualidad, probablemente refleja diferencias basadas en el genotipo de ODC; sin embargo, el riesgo puede limitarse a un grupo étnico particular. Así, se realizaron análisis multifactoriales entre casos de cáncer de colon en caucásicos, para evaluar el riesgo de mortalidad específico de genotipo dentro de este grupo étnico individual. Entre los 234 casos de cáncer de colon en caucásicos hubo 37 muertes relacionadas con CCR. El análisis de supervivencia específica de CCR multifactorial reveló que el SNP de ODC +316 era una variable independiente de supervivencia específica de CCR entre casos de cáncer de colon en caucásicos después del ajuste para las variables clínicas relevantes anteriormente mencionadas. En comparación con casos con genotipo GG de ODC (HR=1,00, referencia), el riesgo de muerte específico de CCR (HR) fue 2,67 (1,22-5,82) para el genotipo GA de ODC y 6,28 (1,46-26,95) para el genotipo AA de ODC (tendencia de $P = 0,0018$).

Las diferencias de supervivencia específicas del genotipo entre casos de CCR se limitaron a casos de cáncer de colon: en comparación con casos del genotipo GG de ODC (HR=1,00, referencia), la razón de riesgo de SE-CCR ajustada (HR) fue 2,31 (1,15-4,64) para casos de GA de ODC y 3,73 (0,93-14,99) para casos de AA de ODC (tendencia de $P = 0,006$). En células de cáncer de colon, el SNP de ODC +316, flanqueado por dos cajas E, predice la actividad del promotor ODC. El activador de la caja E *c-MYC* y los represores *MAD1* y *MAD4* se unen preferencialmente a alelos A menores, en comparación con G mayores, en células cultivadas.

Basándose en este análisis basado en la población de casos de cáncer colorrectal con duración del seguimiento de once años, se observó que el SNP de ODC +316 se asoció a supervivencia específica del cáncer colorrectal entre casos de cáncer de colon. Se observó un elevado riesgo estadísticamente significativo de mortalidad específica de CCR con cada alelo A de ODC adicional entre casos de cáncer de colon, es decir, de GG a GA a AA de ODC (tendencia de $P = 0,006$), después del ajuste para edad, sexo, etnicidad, estadio del tumor, antecedente familiar de CCR, sitio tumoral, histología, tratamiento con cirugía, radioterapia y quimioterapia.

D. Regulación específica de alelos de factores de transcripción

Los datos experimentales presentados aquí proporcionan percepciones sobre los posibles mecanismos biológicos que subyacen a las observaciones clínicas de los presentes inventores. En células epiteliales de cáncer de colon, los presentes inventores han mostrado que el SNP de ODC +316 es funcionalmente significativo, como se demuestra por la elevada unión de los factores de transcripción de la caja E a elementos promotores que contienen alelos A, en comparación con G. Tanto el activador *c-MYC* como el represor *MAD1* muestran mayores efectos sobre la actividad del promotor en elementos indicadores que contienen alelos A frente a G. Estos resultados sugieren regulación específica de alelos de ODC por factores de transcripción de la caja E. La actividad enzimática de la proteína ODC no se afecta evidentemente por el genotipo del SNP de ODC +316, que los presentes inventores creen que influye en la transcripción de ODC.

En células de colon se ha mostrado que la expresión condicional de *APC* natural, un gen expresado en mucosa colónica normal, suprime la expresión de *c-MYC* y aumenta la de *MAD1* (Fultz y Gerner, 2002). Además, se ha informado que *APC* natural puede regular la actividad del promotor ODC de un modo dependiente del SNP +316 (Martínez y col., 2003). *APC* natural se expresa en la mucosa colónica aparentemente normal de individuos no afligidos por PAF, mientras que la mayoría de los adenomas de colon esporádicos muestran pruebas de *APC* mutado o deleciónado (Iwamoto y col., 2000). *MYC* se expresa a bajos niveles en mucosa intestinal normal, pero es elevado en adenomas intestinales de ratones *APC^{Min/+}*. La inactivación condicional de la expresión de *MYC* epitelial intestinal suprime la tumorigénesis intestinal en ratones *APC^{Min/+}* (Ignatenko y col., 2006). Como se ha descrito anteriormente, el trabajo previo por el grupo de los presentes inventores (Martínez y col., 2003) y otros (Hubner y col., 2008) demostró una función protectora para el alelo A de ODC, especialmente en usuarios de aspirina, contra la reaparición de pólipos de colon en ensayos de prevención clínica. Sin embargo, en el estudio basado en la población

aquí presentado, el alelo A de ODC se asoció a poca supervivencia. Esta evidente contradicción puede explicarse por los resultados mostrados aquí, que indican que tanto los activadores como los represores de la caja E se unen al alelo A de ODC selectivamente. Los inventores especulan que la transición de epitelio normal, que expresa represores de la caja E, a epitelio neoplásico puede retardarse en individuos con alelos A de ODC. Este efecto puede resultar de la supresión de la síntesis de poliaminas. Sin embargo, si el epitelio transformado empieza a expresar activadores de la caja E (tales como c-MYC), entonces puede ser más probable que la progresión del cáncer se produzca en individuos con el genotipo A de ODC. Los resultados de los presentes inventores para el riesgo de mortalidad específica del cáncer de colon están de acuerdo con aquellos de otros que muestran que el riesgo de cáncer de próstata puede asociarse al alelo A de ODC entre individuos específicos como resultado de interacciones de genes con el medioambiente (O'Brien y col., 2004; Visvanathan y col., 2004). Tal progresión del cáncer de colon podría ser debida a una potenciada síntesis de poliaminas, como ya se ha demostrado para cáncer de próstata (Simoneau y col., 2008).

Este hallazgo de que un factor, tal como el SNP de ODC, puede tener tanto efectos promotores como inhibidores sobre la carcinogénesis no es único. Por ejemplo, el factor de crecimiento-beta transformante (TGF- β) tiene diversas funciones en la carcinogénesis y progresión del cáncer (Derynck y col., 2001; Pardali y Moustakas, 2007; Roberts y Wakefield, 2003). El TGF- β en células no transformadas inhibe la proliferación celular e induce apoptosis. Incluso se expresa en exceso en todos los tumores humanos y está asociado a progresión tardía del cáncer, específicamente invasión y metástasis tumoral. Un estudio individual que informa de la actividad de ODC en tumores colorrectales humanos demostró que los altos niveles de expresión de ODC se asociaban significativamente a supervivencia mejorada (Matsubara y col., 1995). Esto sugiere que, aunque la expresión en exceso de ODC promueve la formación de adenomas colorrectales humanos, es posible que en lesiones establecidas la expresión en exceso de ODC produzca proliferación potenciada y esté asociada a respuesta mejorada a tratamientos antiproliferativos. Sin embargo, ese estudio no incluyó estratificación por genotipo de ODC, por lo que no se sabe si estos efectos son independientes del genotipo de ODC.

Las asociaciones observadas del SNP de ODC +316 con mortalidad específica de CCR se limitaron a casos de cáncer de colon. Entre los casos de cáncer de colon se observaron efectos particularmente fuertes para caucásicos. Similar a otros informe, la frecuencia alélica del SNP de ODC +316 se diferencia considerablemente por etnicidad (O'Brien y col., 2004). Cuando los inventores limitaron el análisis de supervivencia a caucásicos solo (es decir, el único grupo étnico con potencia adecuada para tales análisis), las asociaciones del SNP de ODC +316 fueron significativas, y de mayor magnitud que los cálculos estimados observados para la cohorte entera.

El estudio epidemiológico comparte limitaciones de otros análisis basados con la población, que incluye falta de datos sobre condiciones comórbidas, estado general y pautas quimioterapéuticas particulares utilizadas. Adicionalmente, las muestras de biopsia de tejido obtenidas de participantes del Estudio de genes-medioambiente de cáncer colorrectal familiar de UC Irvine son especímenes incorporados en parafina y, por tanto, no pueden usarse para la precisa evaluación de la cuantificación de poliamina de tejido por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). También existe la posibilidad del sesgo de selección, favoreciendo un grupo relativamente sano de supervivientes de CCR, ya que hubo una mediana de retraso de 16 meses desde el momento del diagnóstico de CCR hasta el enrolamiento en el estudio. Otros factores que afectan el metabolismo de poliaminas de los que no se dio cuenta en el presente estudio pueden explicar las observaciones de los presentes inventores. Por ejemplo, la aspirina activa la acetilación y exportación de poliamina y trabaja con el alelo A de ODC para reducir los contenidos de poliamina en célula y tejido (Gerner y col., 2004; Martinez y col., 2003; Babbar y col., 2006).

En resumen, los inventores han observado consecuencias clínicas del SNP de ODC +316 sobre la mortalidad específica de CCR entre casos de cáncer de colon. Adicionalmente, los inventores han establecido adicionalmente la significancia funcional del SNP de ODC +316 en la transcripción dependiente de c-MYC y MAD1 de este gen en células de cáncer de colon humanas. Juntos, estos hallazgos experimentales y epidemiológicos sugieren funciones para el SNP de ODC +316 en la progresión del cáncer de colon que son distintas de su función previamente informada en la progresión a adenomas de colon. Estos hallazgos pueden usarse para evaluar el riesgo de progresión del cáncer de colon y pueden usarse para dirigir el tratamiento farmacogenético específico del paciente, monitorización de la supervisión e informar de enfoques novedosos dirigidos para la prevención de cáncer de colon secundario y terciario.

E. Resumen

Se detectó una interacción estadísticamente significativa para el genotipo de *ODC1* y tratamiento en el modelo completo para reaparición de adenoma ($P = 0,021$), de forma que el patrón de reaparición de adenoma entre pacientes con placebo fue: GG-50 %, GA-35 %, AA-29 % frente a pacientes con eflornitina/sulindaco: GG-11 %, GA-14 %, AA-57 %. Aquí se observó que el efecto inhibitor de adenoma de eflornitina y sulindaco fue mayor entre aquellos con el genotipo de *ODC1* homocigótico G mayor, a diferencia de informes previos que muestran una disminución del riesgo de adenoma recurrente entre pacientes con CCR que reciben aspirina que llevan al menos un alelo A (Martinez y col., 2003; Barry y col., 2006; Hubner y col., 2008). Estos resultados demuestran que los portadores del alelo A de *ODC1* se diferencian en la respuesta a exposición prolongada con eflornitina y sulindaco en comparación con pacientes con genotipo GG, experimentando los portadores del alelo A menos beneficio en

términos de reaparición de adenoma y posibilidad de elevado riesgo de desarrollar ototoxicidad, especialmente entre los homocigotos AA.

VIII. Análisis de polimorfismos

El genotipo en la posición +316 del gen promotor *ODC1* del paciente puede determinarse usando los procedimientos proporcionados más adelante, que incluyen los procedimientos específicos descritos en la sección de ejemplos. Estos procedimientos pueden modificarse y optimizarse adicionalmente usando los principios y técnicas de biología molecular como se aplican por un experto en la materia. Tales principios y técnicas se enseñan, por ejemplo, en Small y col., (2002). Procedimientos generales empleados para la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) se proporcionan más adelante. La referencia de Kwok y Chen (2003) y Kwok (2001) proporcionan visiones generales de algunos de estos procedimientos.

Los SNP referentes a *ODC1* pueden caracterizarse por el uso de cualquiera de estos procedimientos o modificación adecuada de los mismos. Tales procedimientos incluyen la secuenciación directa o indirecta del sitio, el uso de enzimas de restricción en las que los alelos del sitio respectivo crean o destruyen un sitio de restricción, el uso de sondas de hibridación específicas de alelo, el uso de anticuerpos que son específicos para las proteínas codificadas por los diferentes alelos del polimorfismo, o cualquier otra interpretación bioquímica.

A. Secuenciación de ADN

Un procedimiento comúnmente usado de caracterización de un polimorfismo es la secuenciación directa de ADN del sitio genético que flanquea e incluye el polimorfismo. Tal análisis puede llevarse a cabo usando tanto el "procedimiento de terminación de la cadena mediado por didesoxi", también conocido como el "procedimiento de Sanger" (Sanger y col., 1975) como el "procedimiento de degradación química", también conocido como el "procedimiento de Maxam-Gilbert" (Maxam y col., 1977). Puede utilizarse secuenciación en combinación con las tecnologías de amplificación específicas de secuencia genómica, tales como la reacción en cadena de la polimerasa, para facilitar la recuperación de los genes deseados (Mullis y col., 1986; solicitud de patente europea 50.424; solicitud de patente europea 84.796, solicitud de patente europea 258.017, solicitud de patente europea 237.362; solicitud de patente europea 201.184; patentes de EE.UU. 4.683.202; 4.582.788; y 4.683.194).

B. Resistencia a exonucleasas

Otros procedimientos que pueden emplearse para determinar la identidad de un nucleótido presente en un sitio polimórfico utilizan un derivado de nucleótidos resistente a exonucleasas especializado (patente de EE.UU. 4.656.127). Un cebador complementario a una secuencia alélica inmediatamente 3' con respecto al sitio polimórfico se hibrida con el ADN en investigación. Si el sitio polimórfico sobre el ADN contiene un nucleótido que es complementario al derivado de nucleótido resistente al exonucleótido particular presente, entonces ese derivado se incorporará por una polimerasa sobre el extremo del cebador hibridado. Tal incorporación hace que el cebador sea resistente a la escisión por exonucleasas y así permite su detección. Como la identidad del derivado resistente a exonucleótidos es conocida, puede determinarse el nucleótido específico presente en el sitio polimórfico del ADN.

C. Procedimientos de microsecuenciación

Se han descrito varios otros procedimientos de incorporación de nucleótido guiados por cebadores para ensayar sitios polimórficos en ADN (Komher y col., 1989; Sokolov, 1990; Syvanen 1990; Kuppuswamy y col., 1991; Prezant y col., 1992; Ugozzoli y col., 1992; Nyren y col., 1993). Estos procedimientos se basan en la incorporación de desoxinucleótidos marcados para discriminar entre bases en un sitio polimórfico. Como la señal es proporcional al número de desoxinucleótidos incorporados, los polimorfismos que se producen en ejecuciones del mismo nucleótido producen una señal que es proporcional a la longitud de la ejecución (Syvanen y col., 1990).

D. Extensión en solución

La patente francesa 2.650.840 y la solicitud PCT WO91/02087 tratan de un procedimiento basado en solución para determinar la identidad del nucleótido de un sitio polimórfico. Según estos procedimientos se usa un cebador complementario a las secuencias alélicas inmediatamente 3' con respecto a un sitio polimórfico. La identidad del nucleótido de ese sitio se determina usando derivados de didesoxinucleótido marcados que se incorporan al final del cebador si son complementarios al nucleótido del sitio polimórfico.

E. Análisis de bits genéticos o extensión en fase sólida

La solicitud PCT WO92/15712 describe un procedimiento que usa mezclas de terminadores marcados y un cebador que es complementario a la secuencia 3' con respecto a un sitio polimórfico. El terminador marcado que se incorpora es complementario al nucleótido presente en el sitio polimórfico de la molécula diana que se evalúa y así se identifica. Aquí, el cebador o la molécula diana se inmovilizan a una fase sólida.

F. Ensayo de ligación de oligonucleótidos (ELO)

Éste es otro procedimiento en fase sólida que usa metodología diferente (Landegren y col., 1988). Se usan dos oligonucleótidos, que pueden hibridarse con secuencias contiguas de una hebra sencilla de un ADN diana. Uno de estos oligonucleótidos se biotinila mientras que el otro se marca detectablemente. Si la secuencia complementaria precisa se encuentra en una molécula diana, los oligonucleótidos se hibridarán de forma que sus extremos sean contiguos, y creen un sustrato de ligación. La ligación permite la recuperación del oligonucleótido marcado usando avidina. También se han descrito otros ensayos de detección de ácidos nucleicos, basados en este procedimiento, combinado con PCR (Nickerson y col., 1990). Aquí se usa PCR para lograr la amplificación exponencial del ADN diana, que luego se detecta usando el ELO.

G. Análisis de bits genéticos mediado por ligasa/polimerasa

La patente de EE.UU. 5.952.174 describe un procedimiento que también implica dos cebadores que pueden hibridarse con secuencias contiguas de una molécula diana. El producto hibridado se forma sobre un soporte sólido al que se inmoviliza la diana. Aquí, la hibridación se produce de forma que los cebadores se separen entre sí por un espacio de un único nucleótido. La incubación de este producto hibridado en presencia de una polimerasa, una ligasa y una mezcla de trifosfatos de nucleósido que contiene al menos un trifosfato de desoxinucleósidos permite la ligación de cualquier par de oligonucleótidos hibridados contiguos. La adición de una ligasa produce dos acontecimientos requeridos para generar una señal, la extensión y la ligación. Esto proporciona una mayor especificidad y menor "ruido" que los procedimientos que usan tanto extensión como ligación sola y, a diferencia de los ensayos basados en polimerasa, este procedimiento potencia la especificidad de la etapa de polimerasa combinándola con una segunda hibridación y una etapa de ligación para una señal que va a unirse a la fase sólida.

H. Reacciones de escisión invasiva

Pueden usarse reacciones de escisión invasiva para evaluar el ADN celular para un polimorfismo particular. Una tecnología llamada INVADER® emplea tales reacciones (por ejemplo, de Arruda y col., 2002; Stevens y col., 2003). Generalmente, hay tres moléculas de ácidos nucleicos: 1) un oligonucleótido en la dirección 5' del sitio diana ("oligo en la dirección 5'"), 2) un oligonucleótido de sonda que cubre el sitio diana ("sonda"), y 3) un ADN monocatenario con el sitio diana ("diana"). El oligo en la dirección 5' y la sonda no se solapan, pero contienen secuencias contiguas. La sonda contiene un donante fluoróforo, tal como fluoresceína, y un colorante aceptor, tal como Dabcilo. El nucleótido en el extremo 3' del oligo en la dirección 5' se solapa ("invade") con el primer par de bases de un dúplex de sonda-diana. Entonces, la sonda se escinde por una nucleasa en 5' específica de la estructura causando la separación del par fluoróforo/extintor, que aumenta la cantidad de fluorescencia que puede detectarse. Véase Lu y col., 2004.

En algunos casos, el ensayo se realiza sobre una superficie sólida o en un formato de matriz.

I. Otros procedimientos para detectar SNP

Varios otros procedimientos específicos para la detección e identificación de polimorfismos se presentan más adelante y pueden usarse como tales o con modificaciones adecuadas conjuntamente con la identificación de polimorfismos del gen *ODC1* en la presente invención. Varios otros procedimientos también se describen en el sitio web de SNP del NCBI en la malla mundial en ncbi.nlm.nih.gov/SNP.

En una realización particular, haplotipos extendidos pueden determinarse en cualquier sitio dado en una población, que permite identificar exactamente qué SNP serán redundantes y cuáles serán esenciales en estudios de asociación. Lo último se denomina 'SNP de marca de haplotipo (htSNPs)', marcadores que capturan los haplotipos de un gen o una región de desequilibrio del enlace. Véase Johnson y col. (2001) y Ke y Cardon (2003), para procedimientos a modo de ejemplo.

El ensayo de VDA utiliza amplificación por PCR de segmentos genómicos por procedimientos de PCR larga usando reactivos TaKaRa LA Taq y otras condiciones de reacción convencionales. La amplificación larga puede amplificar tamaños de ADN de aproximadamente 2.000-12.000 pb. La hibridación de productos con la matriz detectora de variantes (VDA) puede realizarse por un centro de cribado de alto rendimiento Affymetrix y analizarse con software computerizado.

Un procedimiento llamado ensayo en chip usa amplificación por PCR de segmentos genómicos por protocolos de PCR convencional o larga. Los productos de hibridación se analizan por VDA, Halushka y col. (1999). Los SNP se clasifican generalmente como "Ciertos" o "Probables" basándose en el análisis informático de patrones de hibridación. Por comparación con procedimientos de detección alternativos tales como secuenciación de nucleótidos, SNP "ciertos" se han confirmado el 100 % de las veces; y SNP "probables" se han confirmado el 73 % de las veces por este procedimiento.

Otros procedimientos simplemente implican la amplificación por PCR tras la digestión con la enzima de restricción relevante. Todavía otros implican la secuenciación de productos de PCR purificados de regiones genómicas conocidas.

5 En otro procedimiento más, exones individuales o fragmentos que se solapan de exones grandes se amplifican por PCR. Los cebadores se diseñan a partir de secuencias publicadas o de bases de datos y la amplificación por PCR de ADN genómico se realiza usando las siguientes condiciones: 200 ng de molde de ADN, 0,5 μ M de cada cebador, 80 μ M de cada uno de dCTP, dATP, dTTP y dGTP, 5 % de formamida, $MgCl_2$ 1,5 mM, 0,5 U de Taq polimerasa y 0,1 de volumen del tampón Taq. Se realiza ciclado térmico y los productos de PCR resultantes se analizan por análisis de PCR-polimorfismo de conformación de cadena simple (PCR-SSCP), bajo varias condiciones, por ejemplo, 5 ó 10 % de gel de poliacrilamida con 15 % de urea, con o sin 5 % de glicerol. La electroforesis se realiza durante la noche. Los productos de PCR que muestran desplazamientos de la movilidad se reamplifican y se secuencian para identificar la variación de nucleótidos.

15 En un procedimiento llamado CGAP-GAI (DEMIPLACE), datos de secuencias y de alineamientos (de un archivo PHRAP.ace), puntuaciones de calidad para las llamadas de la base de secuencias (de los archivos de calidad PHRED), información de distancias (de los programas PHYLIP dnadist y programas vecinos) y datos de llamadas de la base (de PHRED '-d' switch) se cargan en memoria. Las secuencias se alinean y se examinan para cada trozo vertical ('rebanada') del ensamblaje resultante por discrepancia. Cualquier rebanada tal se considera un SNP candidato (DEMIPLACE). Se usan varios filtros por DEMIPLACE para eliminar rebanadas que no es probable que representen polimorfismos verdaderos. Éstos incluyen filtros que: (i) excluyen secuencias en cualquier rebanada dada de la consideración de SNP en la que las puntuaciones de calidad de la secuencia adyacente baja del 40 % o más; (ii) excluye llamadas en las que la amplitud del pico está por debajo del quince por ciento de todas las llamadas de la base para ese tipo de nucleótido; (iii) descalifica regiones de una secuencia que tienen un alto número de discrepancias con el consenso de participar en los cálculos de SNP; (iv) quita de consideración cualquier llamada de la base con una llamada alternativa en la que el pico constituya el 25 % o más del área del pico llamado; (v) excluye variaciones que se producen en solo una dirección de lectura. Las puntuaciones de calidad de PHRED se convirtieron en valores de probabilidad de error para cada nucleótido en la rebanada. Se usan procedimientos bayesianos convencionales para calcular la probabilidad posterior de que haya pruebas de heterogeneidad de nucleótidos en una localización dada.

En un procedimiento llamado CU-RDF (RESEQ), la amplificación por PCR se realiza a partir de ADN aislado de sangre usando cebadores específicos para cada SNP, y después de los protocolos de limpieza típicos para eliminar cebadores sin usar y nucleótidos libres, secuenciación directa usando los mismos cebadores o cebadores anidados.

35 En un procedimiento llamado DEBNICK (PROCEDIMIENTO-B) se realiza un análisis comparativo de secuencias de EST agrupadas y se confirma por secuenciación de ADN basada en fluorescencia. En un procedimiento relacionado, llamado DEBNICK (PROCEDIMIENTO-C), se realiza el análisis comparativo de secuencias de EST agrupadas con calidad phred > 20 en el sitio de emparejamiento erróneo, la calidad de phred promedio $\geq$ 20 durante 5 bases 5'-FLANK y 3' con respecto al SNP, ningún emparejamiento erróneo en 5 bases 5' y 3' con respecto al SNP, al menos dos manifestaciones de cada alelo, y se confirma examinando trazas.

45 En un procedimiento identificado por ERO (RESEQ) se diseñan nuevos conjuntos de cebadores para STS electrónicamente publicadas y se usan para amplificar ADN de 10 cepas de ratón diferentes. Entonces, el producto de amplificación de cada cepa se purifica en gel y se secuencia usando un didesoxi convencional, técnica de secuenciación en ciclo con terminadores marcados con ^{33}P . Entonces, todas las reacciones terminadas en ddATP se cargan en carriles adyacentes de un gel de secuenciación, seguido de todas las reacciones de ddGTP, etc. Los SNP se identifican observando visualmente las radiografías.

50 En otro procedimiento identificado como ERO (RESEQ-HT) se diseñan nuevos conjuntos de cebadores para secuencias de ADN murino electrónicamente publicadas y se usan para amplificar ADN de 10 cepas de ratón diferentes. El producto de amplificación de cada cepa se prepara para la secuenciación tratando con exonucleasa I y fosfatasa alcalina de gamba. La secuenciación se realiza usando un kit ABI Prism Big Dye Terminator Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) y las muestras de secuencia se ejecutan en el analizador de ADN 3700 (96 Capillary Sequencer).

60 FGU-CBT (SCA2-SNP) identifica un procedimiento en el que la región que contiene el SNP se amplificó por PCR usando los cebadores SCA2-FP3 y SCA2-RP3. Se amplifican aproximadamente 100 ng de ADN genómico en un volumen de reacción de 50 μ l que contiene una concentración final de Tris 5 mM, KCl 25 mM, $MgCl_2$ 0,75 mM, 0,05 % de gelatina, 20 pmoles de cada cebador y 0,5 U de Taq ADN polimerasa. Las muestras se desnaturalizan, se hibridan y se extienden y el producto de PCR se purifica de un corte de banda del gel de agarosa usando, por ejemplo, el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen) y se secuencia usando química de colorante-terminador en un secuenciador de ADN automático ABI Prism 377 con los cebadores de PCR.

65 En un procedimiento identificado como JBBLACK (SEQ/RESTRICT) se realizan dos reacciones de PCR independientes con ADN genómico. Los productos de la primera reacción se analizan por secuenciación, que indica

un sitio de restricción FspI único. La mutación se confirma en el producto de la segunda reacción de PCR digiriendo con FspI.

En un procedimiento descrito como KWOK(1), los SNP se identifican comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de cuatro individuos aleatoriamente elegidos por secuenciación directa de ADN de productos de PCR con química de colorante-terminador (véase Kwok y col., 1996). En un procedimiento relacionado identificado como KWOK(2), los SNP se identifican comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de clones de insertos largos que se solapan tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC) o cromosomas artificiales basados en P1 (PAC). Entonces se desarrolla una STS que contienen este SNP y la existencia del SNP en diversas poblaciones se confirma por secuenciación de ADN reunido (véase Taillon-Miller y col., 1998). En otro procedimiento similar llamado KWOK(3), los SNP se identifican comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de clones de insertos largos que se solapan BAC o PAC. Los SNP encontrados por este enfoque representan variaciones de secuencias de ADN entre los dos cromosomas donantes, pero todavía no se han determinado las frecuencias alélicas en la población general. En el procedimiento KWOK(5), los SNP se identifican comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de una muestra de ADN homocigótica y una o más muestras de ADN reunidas por secuenciación directa de ADN de productos de PCR con química de colorante-terminador. Las STS usadas se desarrollan a partir de datos de secuencias encontrados en bases de datos públicamente disponibles. Específicamente, estas STS se amplifican por PCR contra un mola hidatidiforme completa (CHM) que se ha mostrado que es homocigótica en todos los sitios y un conjunto de muestras de ADN de 80 padres de CEPH (véase Kwok y col., 1994).

En otro procedimiento tal, KWOK (OverlapSnpDetectionWithPolyBayes), los SNP se descubren por análisis computerizado automatizado de regiones que se solapan de secuencias de clones genómicas humanas de inserto grande. Para la adquisición de datos se obtienen secuencias de clones directamente de centros de secuenciación a gran escala. Esto es necesario debido a que las secuencias de calidad de la base no están presentes/disponibles mediante GenBank. El procesamiento de datos sin procesar implica el análisis de secuencias de clones e información de calidad de bases acompañantes para coherencia. A las secuencias finalizadas ('base perfecta', tasa de error inferior a 1 en 10.000 pb) sin secuencias de calidad de bases asociadas se les asigna un valor de calidad de base uniforme de 40 (tasa de error de 1 en 10.000 pb). Las secuencias borrador sin valores de calidad de base se rechazan. Las secuencias procesadas se entran en una base de datos local. También se almacena una versión de cada secuencia con repeticiones humanas conocidas enmascaradas. El enmascaramiento de repeticiones se realiza con el programa "MASKERAID". Detección de solapamientos: Se detectan solapamientos putativos con el programa "WUBLAST". Se siguieron varias etapas de filtración con el fin de eliminar falsos resultados de detección de solapamientos, es decir, similitudes entre un par de secuencias de clones que se producen debido a la duplicación de secuencias a diferencia del solapamiento verdadero. La longitud total del solapamiento, porcentaje de similitud global, número de diferencias de secuencias entre nucleótidos con alto valor de calidad de bases "errores de emparejamiento de alta calidad". También se comparan resultados con los resultados del mapeo de fragmentos de restricción de clones genómicos en el Centro de Secuenciación del Genoma de la Universidad de Washington, informes de los terminadores sobre solapamientos y los resultados del esfuerzo de construcción de cóntigos de secuencia en NCBI. Detección de SNP: Se analizan pares de solapamiento de la secuencia del clon para sitios de SNP candidatos con el software de detección de SNP 'POLYBAYES'. Las diferencias de secuencia entre el par de secuencias se puntúan para la probabilidad de representar variación de secuencias verdaderas a diferencia de error de secuenciación. Este procedimiento requiere la presencia de valores de calidad de bases para ambas secuencias. Se extraen candidatos de alta puntuación. La búsqueda se limita a variaciones de pares de bases individuales tipo sustitución. La puntuación de confianza del SNP candidato se calcula por el software POLYBAYES.

En el procedimiento identificado por KWOK (ensayo TaqMan), el ensayo TaqMan se usa para determinar genotipos para 90 individuos aleatorios. En el procedimiento identificado por KYUGEN(Q1), muestras de ADN de poblaciones indicadas se reúnen y se analizan por PLACE-SSCP. Las alturas de los picos de cada alelo en el análisis conjunto se corrigen por aquellos en un heterocigoto, y se usan posteriormente para el cálculo de frecuencias alélicas. Las frecuencias alélicas superiores al 10 % se cuantifican de forma fidedigna por este procedimiento. Frecuencia alélica = 0 (cero) significa que el alelo se encontró entre individuos, pero el pico correspondiente no se observa en el examen del conjunto. Frecuencia alélica = 0-0,1 indica que se detectan alelos menores en el conjunto, pero los picos son demasiado bajos como para cuantificarlos de forma fidedigna.

En otro procedimiento más identificado como KYUGEN (Procedimiento 1), los productos de PCR se marcan posteriormente con colorantes fluorescentes y se analizan por un sistema de electroforesis capilar automático bajo condiciones de SSCP (PLACE-SSCP). Se analizan cuatro o más ADN individuales con o sin dos ADN reunidos (conjunto japonés y conjunto de padres CEPH) en una serie de experimentos. Los alelos se identifican por inspección visual. Los ADN individuales con diferentes genotipos se secuencian y se identifican SNP. Las frecuencias alélicas se estiman a partir de las alturas de los picos en las muestras reunidas después de la corrección del sesgo de señales usando alturas de los picos en heterocigotos. Para la PCR los cebadores se marcan para tener 5'-ATT o 5'-GTT en sus extremos para el posterior marcado en ambas cadenas. Las muestras de ADN (10 ng/ul) se amplifican en mezclas de reacción que contienen el tampón (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3 ó 9,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,0 mM), 0,25 µM de cada cebador, 200 µM de cada dNTP y 0,025 unidades/µl de Taq ADN polimerasa previamente mezclada con anticuerpo anti-Taq. Las dos cadenas de productos de PCR se marcan diferencialmente con

nucleótidos modificados con R110 y R6G por una reacción de intercambio de fragmento de Klenow de ADN polimerasa I. La reacción se detiene añadiendo EDTA, y los nucleótidos sin incorporar se desfosforilan añadiendo fosfatasa alcalina intestinal bovina. Para SSCP: Una alícuota de productos de PCR fluorescentemente marcados y marcadores internos marcados con TAMRA se añade a formamida desionizada y se desnaturaliza. La electroforesis se realiza en un capilar usando un ABI Prism 310 Genetic Analyser. Se usan los softwares Genescan (P-E Biosystems) para la recogida de datos y el procesamiento de datos. El ADN de los individuos (dos a once) que incluyen aquellos que mostraron diferentes genotipos sobre SSCP se somete a secuenciación directa usando química de terminador Big-Dye, en secuenciadores ABI Prism 310. Los archivos de múltiples trazas de secuencias obtenidos de ABI Prism 310 se procesan y se alinean por Phred/Phrap y se visualizan usando el visor Consed. Los SNP se identifican por el software PolyPhred e inspección visual.

En otro procedimiento más identificado como KYUGEN (Procedimiento 2), individuos con diferentes genotipos son buscados por HPLC desnaturalizante (DHPLC) o PLACE-SSCP (Inazuka y col., 1997) y sus secuencias se determinan para identificar SNP. Se realiza PCR con cebadores marcados con 5'-ATT o 5'-GTT en sus extremos para el posterior marcado de ambas cadenas. El análisis de DHPLC se lleva a cabo usando el sistema de análisis de fragmentos de ADN WAVE (Transgenomic). Los productos de PCR se inyectan en la columna DNASep, y se separan en las condiciones determinadas usando el programa WAVEMaker (Transgenomic). Las dos cadenas de los productos de PCR que están diferencialmente marcadas con nucleótidos modificados con R110 y R6G por una reacción de intercambio del fragmento de Klenow de ADN polimerasa I. La reacción se detiene añadiendo EDTA, y los nucleótidos no incorporados se desfosforilan añadiendo fosfatasa alcalina intestinal bovina. Se realiza SSCP seguido de electroforesis en un capilar usando un ABI Prism 310 Genetic Analyser. Software Genescan (P-E Biosystems). El ADN de individuos que incluyen aquellos que mostraron diferentes genotipos sobre DHPLC o SSCP se someten a secuenciación directa usando química de terminador Big-Dye, en secuenciador ABI Prism 310. Los archivos de múltiples trazas de secuencias obtenidos de ABI Prism 310 se procesan y se alinean por Phred/Phrap y se visualizan usando el visor Consed. Los SNP se identifican por el software PolyPhred e inspección visual. Los datos del cromatograma de trazas de secuencias de EST en Unigene se procesan con PHRED. Para identificar SNP probables se informan emparejamientos erróneos de una sola base de múltiples alineamientos de secuencias producidos por los programas PHRAP, BRO y POA para cada agrupación Unigene. BRO corrigió posibles orientaciones de EST erróneamente informadas, mientras que POA identificó y analizó estructuras de alineamiento no lineales indicativas de mezclas/quimeras de genes que podrían producir SNP falsos. Se usa interferencia bayesiana para sopesar la evidencia de polimorfismo verdadero frente a error de secuenciación, alineamiento erróneo o ambigüedad, agrupación errónea o secuencias de EST quiméricas, que evalúan datos tales como altura del cromatograma en bruto, nitidez, solapamiento y separación; tasas de errores de secuenciación; sensibilidad del contexto; origen de bibliotecas de ADNc, etc.

IX. Formulaciones farmacéuticas y vías de administración

Los compuestos terapéuticos de la presente divulgación pueden administrarse mediante varios procedimientos, por ejemplo, por vía oral o mediante inyección (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, etc.). Dependiendo de la vía de administración, los compuestos activos pueden recubrirse en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto. También pueden administrarse por perfusión/infusión continua de una enfermedad o sitio de herida.

La administración del compuesto terapéutico por administración distinta de parenteral puede ser necesaria para recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto terapéutico puede administrarse a un paciente en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y disoluciones de tampón acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua, además de liposomas convencionales (Strejan y col., 1984).

El compuesto terapéutico también puede administrarse parenteralmente, intraperitonealmente, intraespinalmente o intracerebralmente. Pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites. Bajo condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones inyectables estériles o dispersión. En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (tal como glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes

isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico o polialcoholes tales como manitol y sorbitol, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

5 Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto terapéutico en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto terapéutico en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado a vacío y liofilización dando un polvo del principio activo (es decir, el compuesto terapéutico) más cualquier componente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración de la misma.

15 El compuesto terapéutico puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto terapéutico y otros componentes también pueden encerrarse en una cápsula de gelatina de vaina dura o blanda, comprimirse en comprimidos o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, el compuesto terapéutico puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. El porcentaje del compuesto terapéutico en las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variarse. La cantidad del compuesto terapéutico en tales composiciones terapéuticamente útiles es de forma que se obtenga una dosificación adecuada.

25 Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. Forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas aptas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del compuesto terapéutico calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y es directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto terapéutico y el efecto terapéutico particular que va a lograrse, y (b) las limitaciones inherentes en la materia de combinar un compuesto terapéutico tal para el tratamiento de una afección seleccionada en un paciente.

35 El compuesto terapéutico también puede administrarse tópicamente a la piel, ojo o mucosa. Alternativamente, si se desea administración local a los pulmones, el compuesto terapéutico puede administrarse por inhalación en un polvo seco o formulación en aerosol.

40 Los compuestos activos se administran a una dosificación terapéuticamente eficaz suficiente para tratar una afección asociada a una afección en un paciente. Por ejemplo, la eficacia de un compuesto puede evaluarse en un sistema de modelo animal que puede ser predictivo de eficacia en el tratamiento de la enfermedad en seres humanos, tal como los sistemas modelo mostrados en los ejemplos y dibujos.

45 La cantidad de dosificación actual de un compuesto de la presente divulgación o composición que comprende un compuesto de la presente divulgación administrada a un sujeto puede determinarse por factores físicos y fisiológicos tales como edad, sexo, peso corporal, gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que está tratándose, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, idiopatía del sujeto y de la vía de administración. Estos factores pueden determinarse por un experto. El médico responsable de la administración normalmente determinará la concentración del (de los) principio(s) activo(s) en una composición y dosis(s) apropiada(s) para el sujeto individual. La dosificación puede ajustarse por el médico individual en caso de cualquier complicación.

50 Una cantidad eficaz normalmente variará de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 750 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, de aproximadamente 10,0 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg en una o más administraciones de dosis al día, durante uno o varios días (dependiendo por supuesto del modo de administración y los factores tratados anteriormente). Otros intervalos de dosis adecuados incluyen 1 mg a 10000 mg por día, 100 mg a 10000 mg por día, 500 mg a 10000 mg por día y 500 mg a 1000 mg por día. En algunas realizaciones particulares, la cantidad es inferior a 10.000 mg por día con un intervalo de 750 mg a 9000 mg por día.

60 La cantidad eficaz puede ser inferior a 1 mg/kg/día, inferior a 500 mg/kg/día, inferior a 250 mg/kg/día, inferior a 100 mg/kg/día, inferior a 50 mg/kg/día, inferior a 25 mg/kg/día o inferior a 10 mg/kg/día. Alternativamente puede estar en el intervalo de 1 mg/kg/día a 200 mg/kg/día. Por ejemplo, con respecto al tratamiento de pacientes diabéticos, la dosificación unitaria puede ser una cantidad que reduce la glucosa en sangre al menos el 40 % con respecto a un sujeto sin tratar. En otra realización, la dosificación unitaria es una cantidad que reduce la glucosa en sangre a un nivel que es ± 10 % del nivel de glucosa en sangre de un sujeto no diabético.

En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable en su interior. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números enumerados en el presente documento puede administrarse un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramo/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, etc., basado en los números descritos anteriormente.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente divulgación puede comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,1 % de un compuesto de la presente divulgación. En otras realizaciones, el compuesto de la presente divulgación puede comprender entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 60 %, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable en su interior.

Se contemplan dosis individuales o múltiples dosis de los agentes. Intervalos de tiempo deseados para la administración de múltiples dosis pueden determinarse por un experto habitual en la materia empleando no más que experimentación rutinaria. Como ejemplo, los sujetos pueden administrarse con dos dosis diarias a intervalos de aproximadamente 12 horas. En algunas realizaciones, el agente se administra una vez al día.

El (Los) agente(s) puede(n) administrarse en un programa rutinario. Como se usa en el presente documento, un programa rutinario se refiere a un periodo de tiempo designado predeterminado. El programa rutinario puede englobar periodos de tiempo que son idénticos o que se diferencian en longitud, en tanto que el programa esté predeterminado. Por ejemplo, el programa rutinario puede implicar administración dos veces al día, cada día, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, semanalmente, mensualmente o cualquier número fijo de días o semanas entremedias. Alternativamente, el programa rutinario predeterminado puede implicar administración dos veces al día durante la primera semana, seguido de diariamente durante varios meses, etc. En otras realizaciones, la invención proporciona que el (los) agente(s) pueda(n) tomarse por vía oral y que el momento preciso del cual es o no dependiente del consumo de alimentos. Así, por ejemplo, el agente puede tomarse cada mañana y/o cada tarde, independientemente de cuándo el sujeto haya comido o comerá.

X. Terapia de combinación

Puede lograrse terapia de combinación eficaz con una única composición o formulación farmacológica que incluye ambos agentes, o con dos composiciones o formulaciones distintas, administradas al mismo tiempo, en la que una composición incluye un compuesto de la presente invención y la otra incluye el (los) segundo(s) agente(s). Alternativamente, la terapia puede preceder o seguir al otro tratamiento del agente por intervalos que oscilan de minutos a meses.

Pueden emplearse diversas combinaciones, tales como cuando "A" representa el primer agente (es decir, DFMO) y "B" representa un agente secundario (es decir, un AINE que no contiene aspirina, por ejemplo, sulindaco), ejemplos no limitantes de los cuales se describen a continuación:

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

XI. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Debe apreciarse por aquellos expertos en la materia que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y así puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, aquellos expertos en la materia deben apreciar, en vista de la presente divulgación, que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y todavía obtener un resultado parecido o similar.

Ejemplo 1 - Estudios epidemiológicos: Asociaciones de SNP de ODC +316 con supervivencia específica de CCR

Diseño experimental: El estudio incluyó 440 casos nuevos de CCR del Estudio de genes-medioambiente de CCR familiar (diagnosticado en 1994-1996 con seguimiento hasta marzo de 2008) de UC Irvine basado en la población. El

desenlace primario fue la supervivencia específica de CCR (SE-CCR) dependiente del genotipo de ODC (GG frente a AA/GA). En líneas de células de cáncer de colon humano, la unión específica a alelos de ODC de factores de transcripción de la caja E se determinó mediante transferencia Western y ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (CHIP). La actividad del promotor específico de alelos de ODC se determinó usando construcciones de promotor en combinación con vectores que expresan tanto el activador transcripcional *c-MYC* como el represor *MAD1*.

Resultados: Las diferencias de supervivencia específica de genotipo entre casos de CCR se limitaron a casos de cáncer de colon: en comparación con casos de genotipo GG de ODC (HR=1,00, referencia), la razón de riesgo (HR) de SE-CCR ajustada fue 2,31 (1,15-4,64) para casos de GA de ODC y 3,73 (0,93-14,99) para casos de AA de ODC (tendencia de $P = 0,006$). En células de cáncer de colon, el SNP de ODC +316, flanqueado por dos cajas E, predice la actividad del promotor ODC. El activador de la caja E *-MYC* y los represores *MAD1* y *MAD4* se unen preferencialmente a los alelos A menores, en comparación con G mayores, en células cultivadas.

Población del estudio. Los presentes inventores estudiaron casos nuevos de CCR invasivo enrolados en el Estudio de genes-medioambiente de cáncer colorrectal familiar de la Universidad de California, Irvine (Peel y col., 2000; Zell y col., 2007) durante 1994-1996 con seguimiento hasta marzo de 2008. El estudio de origen se diseñó para determinar la incidencia de CCNPH en una gran cohorte basada en la población de casos de cáncer colorrectal. Los participantes se identificaron mediante los registros de cáncer basados en la población del Programa de Supervisión del Cáncer de la Organización Imperial de Orange County/San Diego para el Control del Cáncer usando el archivo de datos de abril de 2008. En el estudio de origen (Peel y col., 2000) se confirmaron todos los sujetos con CCR diagnosticados a todas las edades en Orange County, CA, de 1994 a 1996. También se confirmaron todos los sujetos diagnosticados en San Diego e Imperial Counties, CA, a edades <65 y entre 1994 y 1995. Entonces, se puso en contacto con los casos en caso de que fueran elegibles para el estudio (vivos en el momento confirmado y que tuvieran una dirección de contacto) y si sus médicos no denegaron el permiso para el contacto. En el momento de la entrada en el estudio, los casos firmaron un formulario de consentimiento que permitía extracciones de sangre y publicación de información médica. Este estudio fue autorizado por el Comité de ética médica de UC Irvine (nº 93-257). Los datos clínicos y demográficos que incluyen el estado vital y el seguimiento se obtuvieron mediante enlace con las bases de datos de registros de cáncer regionales como se ha descrito previamente (Peel y col., 2000; Zell y col., 2007; Zell y col., 2008). La determinación de la clasificación tumor, nodo, metástasis (TNM) se derivó de códigos de AJCC existentes cuando estuvieron disponibles y la conversión del grado de los códigos de enfermedad, como se ha informado previamente (Le y col., 2008). El antecedente familiar de cáncer en un pariente de primer grado se comprobó por autoevaluación durante una entrevista telefónica realizada en el enrolamiento (Zell y col., 2008; Ziogas y Anton-Culver, 2003). Se identificaron veintidós casos con cáncer de colon no polipósico hereditario (CCNPH), como se define por los criterios de Ámsterdam, y se excluyeron del análisis. El tiempo medio del diagnóstico de CCR hasta la entrada en el estudio (es decir, fecha de la entrevista de antecedentes familiares) fue 16 meses (IC del 95 % 12-23 meses).

Extracción de ADN y genotipado de SNP de ODC +316. Se extrajo ADN de muestras de 2,0 ml de coágulos de glóbulos rojos usando los kits QIAGEN QIAamp DNA Midi o Mini (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El genotipado del SNP de ODC +316 se realizó usando cebadores de oligonucleótidos diseñados para amplificar un fragmento de 172 pb que contiene la base polimórfica en +316 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se sintetizaron sondas TaqMan específicas de alelo con diferentes marcas en 5' (6-carboxifluoresceína o VIC) y el mismo colorante extintor en 3' (6-carboxitetrametilrodamina) (23). Cada reacción de PCR (5 µl totales) contuvo 10 ng de ADN de participante, 30 pmoles de cada cebador, 12,5 pmoles de cada sonda TaqMan y 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), como se ha informado previamente (Martínez y col., 2003; Guo y col., 2000).

Análisis estadístico - estudio basado en la población. El tamaño de la muestra se determinó basándose en una relación 1:1 estimada del genotipo GG de ODC con respecto al genotipo GA/AA de ODC (Martínez y col., 2003; Barry y col. 2006; Hubner y col., 2008; Guo y col., 2000). El análisis previo de los datos de 1154 casos de cáncer de colon y rectal en el Estudio de genes-medioambiente de CCR familiar de UC Irvine reveló que la supervivencia específica de CCR a los 10 años se aproximó al 66 % (Zell y col., 2008). Los inventores propusieron una diferencia del 15 % o mayor en la supervivencia específica de CCR basándose en el genotipo de ODC solo para los cálculos del tamaño de la muestra de los presentes inventores. Así, se necesitaron 315 sujetos totales para detectar la diferencia propuesta en la supervivencia específica de CCR a los 10 años entre dos grupos al 5 % de nivel de significancia con el 80 % de potencia: 55 % en el grupo 1 frente al 70 % en el grupo 2. Se genotiparon satisfactoriamente 440 de 481 muestras de ADN. 41 casos (8,5 %) produjeron un genotipo de ODC +316 indeterminado debido a la baja concentración de ADN y/o mala calidad del ADN; sin embargo, no se observaron diferencias clinicopatológicas entre los casos satisfactoriamente genotipados e insatisfactoriamente genotipados. Así, el estudio fue suficientemente potente para tratar el criterio principal de valoración.

Se hicieron comparaciones de variables demográficas, clínicas y patológicas entre casos de colon y rectales usando la prueba estadística de chi al cuadrado de Pearson o exacta de Fisher para variables nominales y la prueba de la *t* de Student para variables continuas. La supervivencia específica del cáncer colorrectal se definió como mortalidad del propio CCR, y se produjo censura de datos en los siguientes casos: vivos al final de seguimiento, pérdida del

seguimiento, o muerte de cualquier causa distinta de CCR. La supervivencia global (OS) se definió con mortalidad de cualquier causa. Se construyeron curvas de supervivencia para casos de cáncer de colon y rectal usando el procedimiento de Kaplan-Meier y se analizaron con la prueba del orden logarítmico para análisis unifactoriales. Se realizó modelado de riesgos proporcionales de Cox para todos los casos de CCR, casos de cáncer de colon y casos de cáncer rectal usando el tiempo desde el diagnóstico hasta perfilar el riesgo ajustado de la muerte global y específica de CCR basándose en el genotipo de ODC. Los efectos del genotipo de ODC (GG, GA o AA) sobre la supervivencia se analizaron en los modelos de Cox con ajuste para las siguientes covariables: edad, sexo, etnicidad, antecedente familiar de CCR, estadio de TNM en el diagnóstico, sitio tumoral dentro del colon, subtipo histológico, tratamiento con cirugía, radioterapia y quimioterapia. Cada variable en el modelo se codificó usando variables ficticias. Todos los análisis se realizaron usando el software estadístico SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC). La significancia estadística se asumió para un valor de P bilateral <0,05.

Ejemplo 2 - Estudios experimentales: Regulación de SNP de ODC +316 en células de cáncer de colon

Cultivo celular. Se mantuvieron líneas de células de cáncer colon humano HT29 y HCT116 en medio McCoy's 5A (Invitrogen, Carlsbad, CA). Todos los medios usados se complementaron con 10 % de SBF más 1 % de solución de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂.

Ensayo de genotipado. Muestras de ADN de células HT29 y HCT116 se sometieron a un procedimiento de PCR-RFLP para detectar el sitio PstI polimórfico. Las secuencias se amplificaron por PCR usando los siguientes cebadores: 5'-TCTGCGCTTCCCCATGGGGCT-3' (SEC ID N°: 1) y 5'-TTTCCCAACCCTTCG-3' (SEC ID N°: 2). Cada reacción contuvo - 1 µl de ADN, 4 pmoles de cada cebador, 12,5 µl 2x tampón PreMixes de PCR "G" (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI) y 0,5 unidades de Taq ADN polimerasa, en un volumen final de 25 µl. El tamaño esperado del producto de PCR fue 351 pb. Después de la amplificación, 10-20 µl del producto de PCR se digirieron con 10 unidades de PstI en 30 µl durante 2 horas a 37 °C. El ADN de células HT29 (GA), que contiene el sitio PstI, dio dos fragmentos de 156 y 195 pb.

Análisis de transferencia Western. Se recogieron células, se lisaron y las proteínas se separaron sobre un gel al 12,5 % de SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron por electroforesis sobre una membrana Hybond-C. La membrana se bloqueó con Blotto A (5 % de leche en polvo de calidad para bloqueo en solución de TTBS) y se sondó usando diluciones 1:300 de anticuerpos primarios (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) en Blotto A. Se incubaron anticuerpos primarios a 4 °C durante la noche, seguido de incubación con un anticuerpo secundario marcado con HRP apropiado (dilución 1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó detección quimioluminiscente usando reactivo de detección ECL Western (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se expuso sobre película Biomax XAR (Kodak).

Inmunoprecipitación de cromatina (CHIP). Se realizaron ensayos CHIP usando un kit comercial, como se recomienda por el fabricante (Upstate Biotech, Lake Placid, NY, EE.UU.). Brevemente, las células se trataron con 1 % de formaldehído para reticular ADN y proteínas, y los complejos de ADN-proteína se rompieron por sonicación a longitudes entre 200 y 1000 pb. Los lisados se diluyeron 10 veces con tampón de dilución de inmunoprecipitación (IP) que contenía inhibidores de proteasas. Se usaron anticuerpos para c-MYC, MAD1 y MAD4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) para precipitar cromatina, mientras que se dejó muestra adicional como control de anticuerpo menos (-Ab). Las muestras se inmunoprecipitaron durante la noche a 4 °C con rotación. Se obtuvieron inmunocomplejos añadiendo 60 µl de suspensión de ADN de esperma de salmón / proteína A agarosa e incubando durante una hora a 4 °C con rotación seguido de centrifugación suave (1000 rpm, 1 min). Los sedimentos de proteína A agarosa se lavaron con tampón bajo en sal, tampón alto en sal, tampón LiCl y tampón TE. Entonces, los complejos se eluyeron añadiendo 250 µl de tampón de elución (NaHCO₃ 0,1 M, 1 % de SDS) dos veces y las reticulaciones de ADN-proteína se invirtieron con NaCl 0,2 M calentando a 65 °C durante 4 horas para todas las muestras, que incluyen el ADN de entrada y los controles de ADN de -Ab. El ADN se resuspendió en 30 µl de ddH₂O. Para la visualización del producto de PCR y su tamaño se llevaron a cabo reacciones de PCR convencionales. Las secuencias de cebadores de ODC usados para la PCR fueron 5'-CCTGGGCGCTCTGAGGT-3' (SEC ID N°: 3) (17-mero) y 5'-AGGAAGCGGCGCCTCAA-3' (SEC ID N°: 4) (17-mero). Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real usando el kit de ensayo de expresión génica TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un sistema de detección de secuencias ABI7700. Los detalles para el cálculo de la unión relativa pueden encontrarse en el sitio web del fabricante (<http://www.appliedbiosystems.com/>).

Transfecciones transitorias. Se realizaron transfecciones transitorias usando el reactivo Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) según el protocolo del fabricante, como se detalla en el archivo complementario. Células HCT116 y HT29 se transfectaron con 1 µg de plásmidos pGL3-ODC/A o pGL3-ODC/G (Martínez y col., 2003) junto con 0,01 µg de plásmido Renilla-TK. El plásmido Renilla-TK se compró de Promega (Madison, WI) y se usó como control de eficiencia de la transfección en todos los experimentos de transfección del indicador del promotor. Para los experimentos de c-MYC, los plásmidos pGL3 de ODC se co-transfectaron con tanto el vector de expresión pcDNA 3.0 como CMV-c-MYC (OriGene, Rockville, MD). Para experimentos de MAD1, los plásmidos de ODC se co-transfectaron con tanto pcDNA 3.1 como pcDNA-MAD1. Para la co-transfección de c-MYC y MAD1 se prepararon construcciones de indicador del promotor ODC que contenían los primeros 1,6 Kb del gen ODC clonado en un vector

pGL3. Las construcciones incluyeron la caja E 1 (-485 a -480 pb) intacta (caja E 1 nt) o deletcionada (caja E 1 mut). Adicionalmente, se usaron ambas variantes del SNP ODC +316, creando un total de 4 construcciones diferentes. Después de 6 horas de incubación, las células se complementaron con medio completo que contenía 20 % de SBF y se dejaron cultivar durante la noche. Al día siguiente después de la transfección, medio completo que contenía 20 % de SBF se sustituyó con el medio que contenía 10 % de SBF. 48 horas después de la transfección, las células se lavaron con PBS y se lisaron en tampón de lisis pasivo del kit de ensayo de luciferasa dual (Promega, Madison, WI). Las actividades de luciferasa dual se midieron usando un luminómetro TD-20/20 de Turner Designs, como se describe por el fabricante, y se presentaron como unidades relativas de luciferasa (URL). Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos 2 veces.

Análisis estadístico - estudios experimentales. Para los experimentos de transfección transitoria se usaron pruebas de la t de dos muestras (Microsoft Excel Microsoft Corp., Redmond, WA). El efecto de la expresión de c-MYC sobre la actividad del promotor específico de alelos de ODC se examinó en células HT29 de cáncer de colon usando construcciones del promotor ODC que se diferenciaban por la presencia del primer elemento de caja E: (a) caja E 1 natural (nt) +316 G, (b) caja E 1 mutante (mut) +316 G, (c) caja E 1 nt +316 A, y (d) caja E 1 mut +316 A. Para cada construcción del promotor se usaron pruebas de la t de dos muestras para comparar la actividad del promotor entre células co-transfectadas con el plásmido pcDNA3.0 frente a aquellas transfectadas con el vector de expresión CMV-c-MYC. Similarmente, para examinar el efecto de la expresión de *MAD1* sobre la actividad del promotor específico de alelos de ODC se usaron pruebas de la t de dos muestras para comparar el efecto de la actividad del promotor en construcciones de promotor co-transfectadas con el plásmido pcDNA3.1 frente a aquellas transfectadas con el plásmido pcDNA-MAD1. Se supuso significancia estadística para un valor de P bilateral <0,05.

Ejemplo 3 - Efectos diferenciales del genotipo de *ODC1*

Este estudio implica el análisis de datos de pacientes del ensayo de prevención de adenoma de colon de fase III multicéntrico (Meyskens y col., 2008). Se enrolaron 375 pacientes, y el estudio fue parado por el Comité de Vigilancia de Datos y Seguridad (CVDS) después de que 267 pacientes completaran las colonoscopias del fin del estudio (debido a que el estudio cumplió sus criterios de valoración de eficacia). El CVDS monitorizó todos los criterios de valoración de seguridad y eficacia. Se recogieron especímenes de sangre de los 228 pacientes del estudio que dieron consentimiento para el análisis del genotipado después de noviembre de 2002 (incluyendo 159 de los 246 pacientes aleatorizados antes, y 69 de los 129 pacientes aleatorizados después de esta fecha), cuando el protocolo se modificó en vista de los datos que demostraban la importancia del SNP de *ODC1* (2). Se realizó el genotipado de *ODC1* (rs2302615) en ADN genómico derivado de pacientes usando sondas TaqMan específicas de alelo como se ha descrito previamente (Guo y col., 2000). El contenido de poliamina de tejido rectal se determinó como se ha descrito previamente (Meyskens y col., 1998; Seiler y Knodgen, 1980), usando 3 de los 8 especímenes de biopsia de mucosa rectal aleatoriamente seleccionados. Se realizó respuesta de poliamina de tejido para valores de respuesta que oscilan del 25 % al 45 %.

El genotipo de *ODC1* se analizó bajo un modelo dominante: pacientes AA/GA frente a GG. Se realizaron pruebas de Wilcoxon para datos independientes sobre variables continuas no normalmente distribuidas a través de dos grupos de genotipos. Se utilizaron pruebas de chi al cuadrado o la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre variables categóricas iniciales y el grupo de genotipo. Se realizó regresión logística binomial sobre el desenlace primario (reaparición de adenoma) con variables independientes: grupo de tratamiento, edad, sexo, raza (caucásica frente a otra), uso de aspirina, genotipo de *ODC1* (en el modelo dominante) y un término que representa el tratamiento por interacción de genotipo. Para los resultados secundarios (respuesta de poliamina de tejido rectal, toxicidades), los efectos del grupo de tratamiento, genotipo e interacción entre tratamiento y genotipo se examinaron usando modelos logísticos binomiales completos. Se realizaron análisis estadísticos usando el software estadístico SAS 9.2 (SAS Inc., Cary, NC). Los pacientes firmaron el consentimiento informado para la inclusión en el ensayo y la recuperación/análisis de especímenes. El estudio fue autorizado después de la revisión completa por el comité por el Comité de ética médica de UC Irvine (protocolo de IRB nº 2002-2261) y revisión por cada uno de los IRB locales en los sitios de estudio participantes.

La distribución del genotipo de *ODC1* fue: 126 GG (55 %), 87 GA (38 %) y 15 AA (7 %). Las características clínicas iniciales revelaron diferencias, como se muestra en la Tabla 1. El riesgo relativo (RR) de reaparición de adenoma relacionado con el tratamiento después del ajuste en el modelo de regresión completa fue 0,39 (IC del 95 % 0,24-0,66). Entre pacientes que reciben placebo o tratamiento, respectivamente, la ototoxicidad se produjo en el 23 % frente al 22 % de pacientes GG de *ODC1*, 20 % frente al 21 % de pacientes GA de *ODC1* y 0 % (0 de 7) frente al 57 % (4 de 7) de pacientes AA de *ODC1*.

Tabla 1. Características clínicas de todos los sujetos en el nivel inicial (n=228) por genotipo de *ODC1*.

	Genotipo AA/GA de <i>ODC1</i> (n=102)	Genotipo GG de <i>ODC1</i> (n=126)	P*
Edad media (años ± desviación estándar)	60,2 ± 8,4 DE	62,6 ± 8,7 DE	0,024 [†]
Sexo (n, %)			
Masculino	77 (75 %)	96 (76 %)	0,90
Femenino	25 (25 %)	30 (24 %)	

Raza (n, %)			
Blanca	84 (82 %)	107 (85 %)	0,007 [‡]
Negra	3 (3 %)	4 (3 %)	
Hispana	4 (4 %)	12 (10 %)	
Asiática	9 (9 %)	1 (1 %)	
Otra	2 (2 %)	2 (2 %)	
Grupo de tratamiento (n, %)			
Eflornitina + sulindaco	46 (45 %)	71 (56 %)	0,09
Placebo	56 (55 %)	55 (44 %)	
Uso de aspirina a baja dosis (n, %)			
Sí	44 (43 %)	54 (43 %)	0,97
No	58 (57 %)	72 (57 %)	
Mediana del n° (con mínimo-máximo)	2,00 (1,11)	2,00 (1,16)	0,41 [†]
Localización del mayor pólipo previo (n, %)			
Recto	26 (25 %)	23 (18 %)	0,19
Colon	76 (75 %)	103 (82 %)	
Histología del pólipo previo (n, %)			
Tubular	76 (75 %)	99 (79 %)	0,03 [‡]
Adenoma-NOS	6 (6 %)	8 (6 %)	
Tubulovelloso	10 (10 %)	17 (13 %)	
Velloso	7 (7 %)	1 (1 %)	
Carcinoma <i>in situ</i>	3 (3 %)	0 (0 %)	
Adenoma tubular, alto grado	0 (0 %)	1 (1 %)	
Displasia			
Mayor pólipo ≥1 cm (n, %)	25 (25 %)	40 (32 %)	0,23
Tratamiento prestado para el pólipo previo (n, %)	92 (90 %)	117 (93 %)	0,47
Cirugía de extirpación endoscópica completa	10 (10 %)	9 (7 %)	
Contenido de poliamina de tejido inicial [§] (mediana, nmol/mg de proteína, intervalo)			
Putrescina	0,47 (0,01-4,60)	0,56 (0,01-5,29)	0,48 [†]
Espermidina	1,99 (0,76-9,18)	2,17 (1,05-8,97)	0,08 [†]
Espermina	6,82 (2,29-19,86)	7,29 (2,72-22,85)	0,23 [†]
Relación de espermidina:espermina	0,30 (0,19-0,98)	0,31 (0,19-0,76)	0,23 [†]

*El valor de p para la prueba de χ^2 se enumera a menos que se observe de otro modo.

[†]Valor de p para la prueba de Wilcoxon para datos independientes.

[‡]Valor de p para la prueba exacta de Fisher.

[§]Datos de poliamina de tejido que faltan para 1 sujeto con genotipo GG de *ODC1* y 1 sujeto con genotipo AA/GA de *ODC1*

Tabla 2. Supervivencia global multifactorial y análisis de supervivencia específica del cáncer colorrectal para casos de cáncer colorrectal basándose en el genotipo de *ODC1*.

	Genotipo de <i>ODC1</i>		<i>P</i>
	GG	GA/AA	
Mortalidad global			
Número de acontecimientos	47	62	
Número en riesgo	208	192	
HR sin ajustar (IC del 95 %)	1 (referencia)	1,57 (1,07-2,29)	0,020
HR ajustada (IC del 95 %)*	1 (referencia)	1,58 (1,07-2,34)	0,021
Mortalidad específica de CCR			
Número de acontecimientos	22	37	
Número en riesgo	208	192	
HR sin ajustar (IC del 95 %)	1 (referencia)	1,97 (1,16-3,34)	0,012
HR ajustada (IC del 95 %)*	1 (referencia)	2,02 (1,17-3,50)	0,012

Abreviatura: IC del 95 %, intervalo de confianza del 95 %.

*Incluye estratificación para el estadio (I, II, III) y ajuste para edad (a), sexo, etnicidad, antecedente familiar de cáncer colorrectal, estadio de TNM en el diagnóstico, sitio tumoral dentro del colon-recto, subtipo histológico, tratamiento con cirugía, radioterapia y quimioterapia.

Tabla 3. Incidencia de acontecimientos después de la aleatorización y estratificado por genotipo de *ODC1* (modelo dominante).

	Placebo (n = 111)		Eflornitina/sulindaco (n = 117)		P*
	GG de <i>ODC1</i>	GA o AA de <i>ODC1</i>	GG de <i>ODC1</i>	GA o AA de <i>ODC1</i>	
Cualquier reaparición de adenoma	22/44 (50)	18/53 (34)	7/64 (11)	9/42 (21)	< 0,0001
Cualquier acontecimiento adverso – nº de pacientes con acontecimientos adversos (%)					
Acontecimientos cardiovasculares [†] , nº de pacientes (%)	8/55 (15)	8/56 (14)	13/71 (18)	9/46 (20)	0,30
Acontecimientos gastrointestinales [‡] , nº de pacientes (%)	4/55 (7)	8/56 (14)	9/71 (13)	7/46 (15)	0,54
Sordera parcial al menos 15 dB a ≥ 2 frecuencias, nº de pacientes (%)	10/44 (23)	9/52 (17)	14/63 (22)	11/41 (27)	0,26
*Valor de P para la prueba de relación de probabilidad para el efecto del tratamiento (eflornitina y sulindaco frente a placebo) sobre la reaparición de adenoma en el modelo completo que incluye edad, sexo, raza/etnicidad, uso de aspirina, tratamiento, genotipo e interacción de tratamiento y genotipo como covariables. Se detectó una interacción estadísticamente significativa en el modelo completo para reaparición de adenoma (P=0,038); no se detectó interacción para toxicidad cardiovascular, toxicidad gastrointestinal u ototoxicidad.					
[†] Acontecimientos cardiovasculares incluyeron enfermedad de las arterias coronarias, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva y dolor de pecho.					
[‡] Acontecimientos gastrointestinales incluyeron hemorragia gastrointestinal (de cualquier región) tal como hemorragia rectal, hemorragia gastrointestinal superior, hematoquecia o sangre oculta en las heces.					

Tabla 4. Eficacia y acontecimientos adversos y el SNP de *ODC1* +316.

	Placebo (N = 111)			DFMO/sulindaco (N = 117)			P
	GG de <i>ODC</i> (N=55)	GA de <i>ODC</i> (N=48)	AA de <i>ODC</i> (N=8)	GG de <i>ODC</i> (N=71)	GA de <i>ODC</i> (N=39)	AA de <i>ODC</i> (N=7)	
Cualquier reaparición de adenoma (%)	22/44 (50)	(35)	(29)	7/64 (11)	(14)	(57)	< 0,0001
Nº de acontecimientos cardiovasculares de pacientes (%)a	8/55 (15)	7/48 (15)	1/8 (13)	13/71 (18)	7/39 (18)	2/7 (29)	0,37
Nº de acontecimientos gastrointestinales de pacientes (%)b	4/55 (7)	8/48 (17)	0/8 (0)	9/71 (13)	5/39 (13)	2/7 (29)	0,45
Sordera parcial al menos 15 dB a > 2 frecuencias, nº de pacientes (%)c	10/44 (23)	9/45 (20)	0/8 (0)	14/63 (22)	7/34 (21)	4/7 (57)	0,020

5

Referencias

- Patente de EE.UU. 3.647.858
 Patente de EE.UU. 3.654.349
 10 Patente de EE.UU. 4.330.559
 Patente de EE.UU. 4.413.141
 Patente de EE.UU. 4.582.788
 Patente de EE.UU. 4.656.127
 Patente de EE.UU. 4.683.194
 15 Patente de EE.UU. 4.683.202
 Patente de EE.UU. 5.814.625
 Patente de EE.UU. 5.843.929
 Patente de EE.UU. 5.952.174
 Patente de EE.UU. 6.258.845
 20 Alberts y col., J Cell. Biochem. Supp., (22):18-23, 1995.
 AMA Drug Evaluations Annual, 1814-1815, 1994.
 Babbar y col., Biochem. J., 394:317-24, 2006.
 Babbar y col., J Biol. Chem., 278(48):47762-47775, 2003.
 Barry y col., J Natl. Cancer Inst., 98(20):1494-500, 2006.
 25 Bedi y col., Cancer Res., 55(9):1811-1816, 1995.
 Bellofernandez y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7804-8, 1993.
 Bussey, Hepatology, 12(1):175-6. 1990

Childs y col., *Cell. Molec. Life Sci.*, 60:1394-1406, 2003.
 De Arruda y col., *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2(5):487-496, 2002.
 Derynck y col., *Nature Genetics*, 29:117-29, 2001.
 DuBois y col., *Cancer Res.*, 56:733-737, 1996.
 5 Erdman y col., *Carcinogenesis*, 20:1709-13, 1999.
 Solicitud europea 201.184
 Solicitud europea 237.362
 Solicitud europea 258.017
 Solicitud europea 50.424
 10 Solicitud europea 84.796
 Solicitud francesa 2.650.840
 Fultz y Gerner, *Mol. Carcinog.*, 34:10-8, 2002.
 Gerner y Meyskens, *Nature Rev. Cancer*, 4:781-92., 2004.
 Gerner y col., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 3:325-330, 1994.
 15 Giardiello y col., *Cancer Res.*, (57):199-201, 1997.
 Guo y col., *Cancer Res.*, 60(22):6314-6317, 2000.
 Halushka y col., *Nat. Genet.*, 22(3):239-247, 1999.
 Hanif y col., *Biochemical Pharmacology*, (52):237-245, 1996.
 Hubner y col., *Clin. Cancer Res.*, 14(8):2303-9, 2008.
 20 Ignatenko y col., *Cancer Biol. Ther.*, 5(12):1658-64, 2006.
 Inazuka y col., *Genome Res*, 7(11):1094-1103, 1997.
 Iwamoto y col., *Carcinogenesis*, 21:1935-40, 2000.
 Johnson y col., *Nat. Genet.*, 29(2):233-237, 2001.
 Ke y Cardon *Bioinformatics*, 19(2):287-288, 2003.
 25 Keller y Giardiello, *Cancer Biol. Ther.*, 2(4 Suppl 1):S140-9, 2003.
 Kingsnorth y col., *Cancer Res.*, 43(9):4035-8, 1983.
 Komher, y col., *Nucl. Acids. Res.* 17:7779-7784, 1989.
 Kuppuswamy, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1143-1147, 1991.
 Kwok y Chen, *Curr Issues Mol. Biol.*, Apr;5(2):43-60, 2003.
 30 Kwok y col., *Genomics*, 23(1):138-144, 1994.
 Kwok, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2:235-258, 2001.
 Kwok y col., *Genomics*, 31 (1):123-6, 1996.
 Ladenheim y col., *Gastroenterology*, 108:1083-1087, 1995.
 Landegren, y col., *Science*, 241:1077-1080, 1988.
 35 Lanza y col., *Arch. Intern. Med*, 155:1371-1377, 1995.
 Le y col., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 17:1950-62, 2008.
 Lipkin, J. *Cell Biochem. Suppl.*, 28-29:144-7, 1997.
 Lippman, *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 3(10):523, 2006.
 Love y col., *J Natl. Cancer Inst.*, 85:732-7, 1993.
 40 Lu y col., *Eukaryot Cell.*, 3(6):1544-56, 2004.
 Luk y Baylin, *N. Engl. J. Med.*, 311(2):80-83, 1984.
 Lupulescu, *Cancer Detect. Prev.*, 20(6):634-637, 1996.
 Martinez y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:7859-64, 2003.
 Matsubara y col., *Clinical Cancer Res.*, 1:665-71, 1995.
 45 Maxam, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:560, 1977.
 McLaren y col., *Cancer Prev. Res.*, 1(7):514-21, 2008.
 Meyskens y col., *Cancer Prev. Res.*, 1(1):32-8, 2008.
 Meyskens y col., *J. Natl. Cancer Inst.*, 86(15):1122-1130, 1994.
 Meyskens y col., *J. Natl. Cancer Inst.*, 90(16):1212-8, 1998.
 50 Mullis y col., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273, 1986.
 Muscat y col., *Cancer*, 74:1847-1854, 1994.
 Narisawa y col., *Cancer Res.*, 41(5):1954-1957, 1981.
 Nickerson y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:8923-8927, 1990.
 Nyren y col., *Anal. Biochem.* 208:171-175, 1993.
 55 O'Brien y col., *Molec. Carcinog.*, 41 (2):120-3, 2004.
 Pardali y Moustakas, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1775:21-62, 2007.
 PCT Appln. WO91/02087
 PCT Appln. WO92/15712
 Peel y col., *J. Natl. Cancer Inst.*, 92:1517-22, 2000.
 60 Pegg, *Biochem.*, 234(2):249-262, 1986.
 Physician's Desk Reference, *Medical Economics Data*, Montville, N.J., 1745-1747, 1999
 Piazza y col., *Cancer Res.*, (55):311 3116, 1995.
 Piazza y col., *Cancer Res.*, (57):2452-2459, 1997a.
 Piazza y col., *Cancer Res.*, (57):2909-2915, 1997b.
 65 Pollard y Luckert, *Cancer Res.*, 49:6471-6473, 1989.
 Prezant y col., *Hum. Mutat.*, 1:159-164, 1992.

- Psaty y Potter, N. Engl. J. Med., 355(9):950-2, 2006.
 Rao y col., Cancer Res., (55):1464-1472, 1995.
 Reddy y col., Cancer Res., (50):2562-2568, 1990.
 Reddy y col., Cancer Res., 47:5340-5346, 1987.
 5 Rice y col., Mol. Cancer Ther., 2(9):885-92, 2003.
 Roberts y Wakefield, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:8621-3, 2003.
 Sanger y col., J. Molec. Biol., 94:441, 1975.
 Seiler y Knodgen, J. Chromatogr., 221(2):227-235, 1980.
 Simoneau y col., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 17:292-9, 2008.
 10 Simoneau y col., J. Natl. Cancer Inst., 93:57-9, 2001.
 Singh y Reddy, Annals. NY Acad. Sci., (768):205-209, 1995.
 Singh y col., Carcinogenesis, (15):1317-1323, 1994.
 Small y col., N. Engl. J. Med., 347:1135-1142, 2002.
 Sokolov, Nucl. Acids Res. 18:3671, 1990.
 15 Stevens y col., Biotechniques, 34:198-203, 2003.
 Strejan y col., Cell Immunol., 84(1):171-184, 1984.
 Su y col., Science, (256):668-670, 1992.
 Syvanen y col., Genomics 8:684-692, 1990.
 Taillon-Miller y col., Genome Res, 8(7):748-754, 1998.
 20 Tempero y col., Cancer Res., 49(21):5793-7, 1989.
 Thomas y Thomas, J Cell Mol. Med., 7:113-26, 2003.
 Thompson y col., J Natl. Cancer Inst., (87):125-1260, 1995.
 Ugozzoli y col., GATA 9:107-112, 1992.
 Vane y Botting, Adv Exp Med Biol., 433:131-8, 1997.
 25 Visvanathan y col., J. Urol., 171(2 Pt 1):652-5, 2004.
 Wallace, Eur. J. Clin. Invest., 30:1-3, 2000.
 Zell y col., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 17:3134-40, 2008.
 Zell y col., Cancer Prev. Res., 2(3):209-12, 2009.
 Zell y col., Clin. Cancer Res., 15(19):6208-16, 2009.
 30 Zell y col., Intl. J. Cancer, 120:459-68, 2007.
 Ziogas y Anton-Culver, Am. J Prev. Med., 24:190-8, 2003.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> GERNER, EUGENE
 ZELL, JASON
 MCLAREN, CHRISTINE
 MEYSKENS, FRANK
 40 ANTON-CULBER, HODA
 THOMPSON, PATRICIA A.

 <120> DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL CARCINOMA, BASADO EN EL GENOTIPO DE ODC1

 <130> CAPP:006WO
 45
 <140> DESCONOCIDO
 <141> 14-05-2010

 <150> 61/217682
 50 <151> 03-06-2009

 <150> 61/217679
 <151> 03-06-2009

 55 <150> 61/216216
 <151> 14-05-2009

 <160> 5
 60 <170> PatentIn versión 3.5

 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

 5 <400> 1
 tctgcgcttc cccatggggc t 21

 10 <210> 2
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 2
 tttcccaacc ctctg 15

 20 <210> 3
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 3
 cctgggcgct ctgaggt 17

 30 <210> 4
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 4
 aggaagcggc gcctcaa 17

 40 <210> 5
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 5
 50 gcacgtgtgc ggcgcgcctc gccggcctgc ggagacacgt gg 42

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende α -difluorometilornitina (DFMO) y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que no contiene aspirina para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de carcinoma colorrectal o factores de riesgo del mismo en un paciente;
 5 en donde el genotipo del paciente en la posición +316 de al menos un alelo del gen promotor *ODC1* es G; y
 en donde el tratamiento de factores de riesgo de carcinoma colorrectal en el paciente previene la formación de nuevos focos de cripta aberrantes, nuevos pólipos adenomatosos o nuevos adenomas con displasia en el paciente; opcionalmente en donde el paciente es un ser humano.
- 10 2. Una composición que comprende α -difluorometilornitina (DFMO) para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de carcinoma colorrectal, o factores de riesgo del mismo como se definen en la reivindicación 1, en un paciente como se define por la reivindicación 1;
 en donde al paciente también se le administra una composición que comprende un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que no contiene aspirina, administrándose al paciente la composición que comprende el AINE que
 15 no contiene aspirina antes, al mismo tiempo o después de la administración de la composición que comprende DFMO.
- 20 3. Una composición que comprende un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que no contiene aspirina para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de carcinoma colorrectal, o factores de riesgo del mismo como se definen en la reivindicación 1, en un paciente como se define por la reivindicación 1;
 en donde al paciente también se le administra una composición que comprende α -difluorometilornitina (DFMO), administrándose al paciente la composición que comprende DFMO antes, al mismo tiempo o después de la
 25 administración de la composición que comprende el AINE que no contiene aspirina.
- 30 4. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el genotipo del paciente se determina recibiendo un informe que contiene dicho genotipo o tomando un antecedente del paciente que revela los resultados; o determinando la base nucleotídica en la posición +316 de un alelo del gen promotor *ODC1* del paciente; o determinando las bases nucleotídicas en la posición +316 de ambos alelos del gen promotor *ODC1* del paciente.
5. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el genotipo del paciente en la posición +316 de ambos alelos del gen promotor *ODC1* es GG o GA.
- 35 6. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde, antes de determinarse el genotipo del paciente, el paciente ya estaba siendo tratado con una composición que comprende DMFO y/o un AINE que no contiene aspirina, pero a una menor dosificación de la DMFO y/o el AINE que no contiene aspirina.
- 40 7. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el AINE que no contiene aspirina está seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor selectivo de la COX-2, sulindaco y celecoxib.
8. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el AINE que no contiene aspirina es sulindaco, y en la que
 45 (i) la DFMO se administra por vía oral, opcionalmente en la que la cantidad eficaz de DFMO es 500 mg/día;
 (ii) la DFMO se administra intravenosamente, opcionalmente en la que la cantidad eficaz de DFMO es de 0,05 a 5,0 g/m²/día; o
 (iii) la DFMO se administra al menos una segunda vez.
- 50 9. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el AINE que no contiene aspirina es sulindaco y en la que la cantidad eficaz de sulindaco es de 10 a 1500 mg/día, tal como de 10 a 400 mg/día, o tal como 150 mg/día; o en la que el sulindaco se administra al menos una segunda vez.
- 55 10. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho paciente tiene un tumor sólido, y el tumor sólido está reseccionado.
11. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el cáncer colorrectal está en estadio I, o estadio II, o estadio III o estadio IV.
- 60 12. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el tratamiento previene la formación de nuevas neoplasias colorrectales avanzadas (por ejemplo, nuevas neoplasias colorrectales avanzadas del lado derecho o nuevas neoplasias colorrectales avanzadas del lado izquierdo) dentro del paciente, o el tratamiento previene ototoxicidad o el riesgo de la misma dentro del paciente.
- 65 13. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el paciente ha sido identificado como que tiene

- (i) uno o más pólipos adenomatosos en el colon, el recto o el apéndice;
- (ii) una o más neoplasias colorrectales avanzadas; o
- (iii) un diagnóstico de poliposis adenomatosa familiar.

- 5 14. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el paciente tiene un antecedente de resección de uno o más adenomas colorrectales.

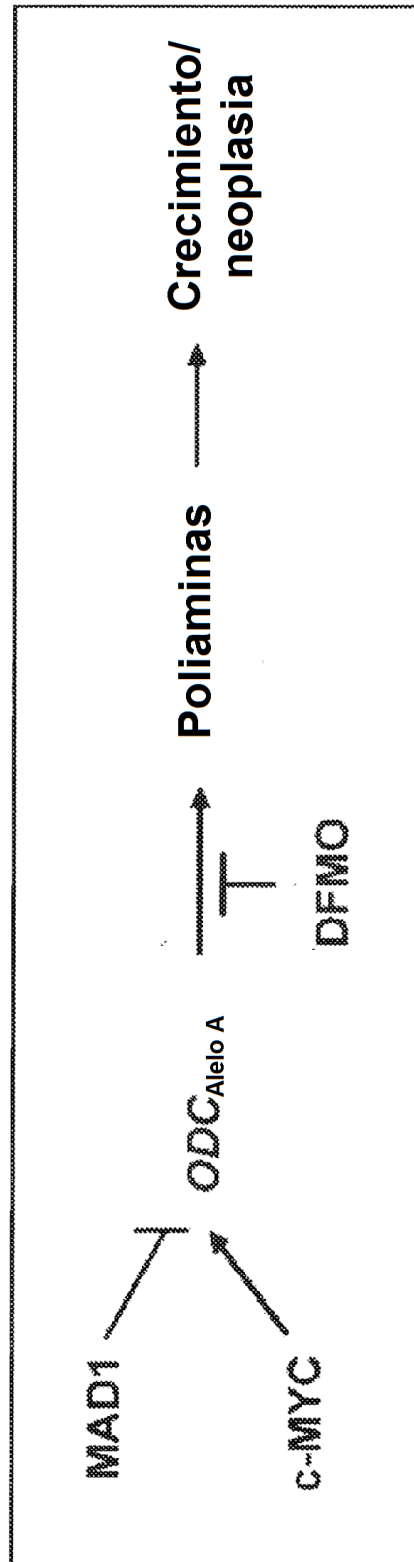


FIG. 1

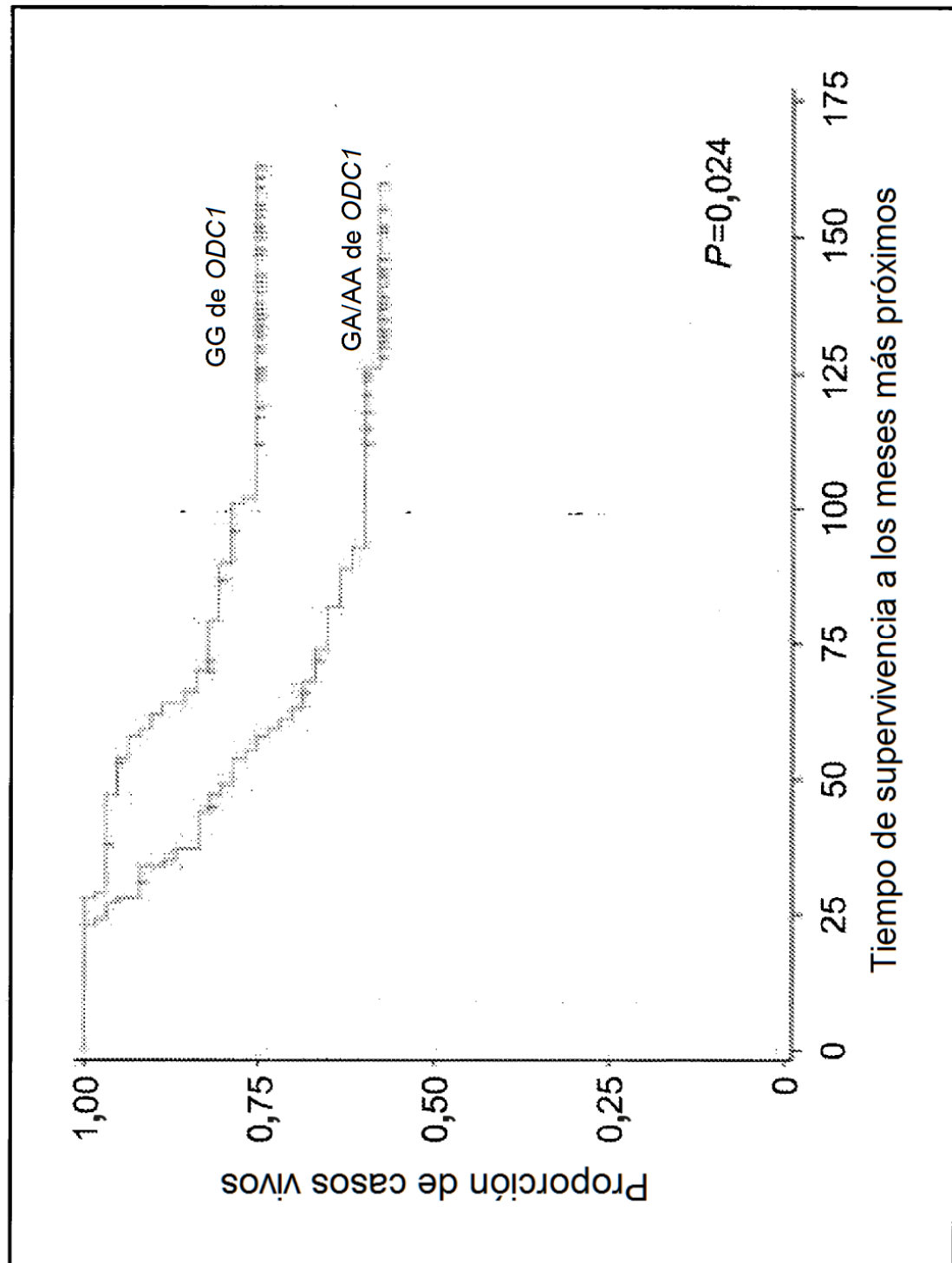


FIG. 2

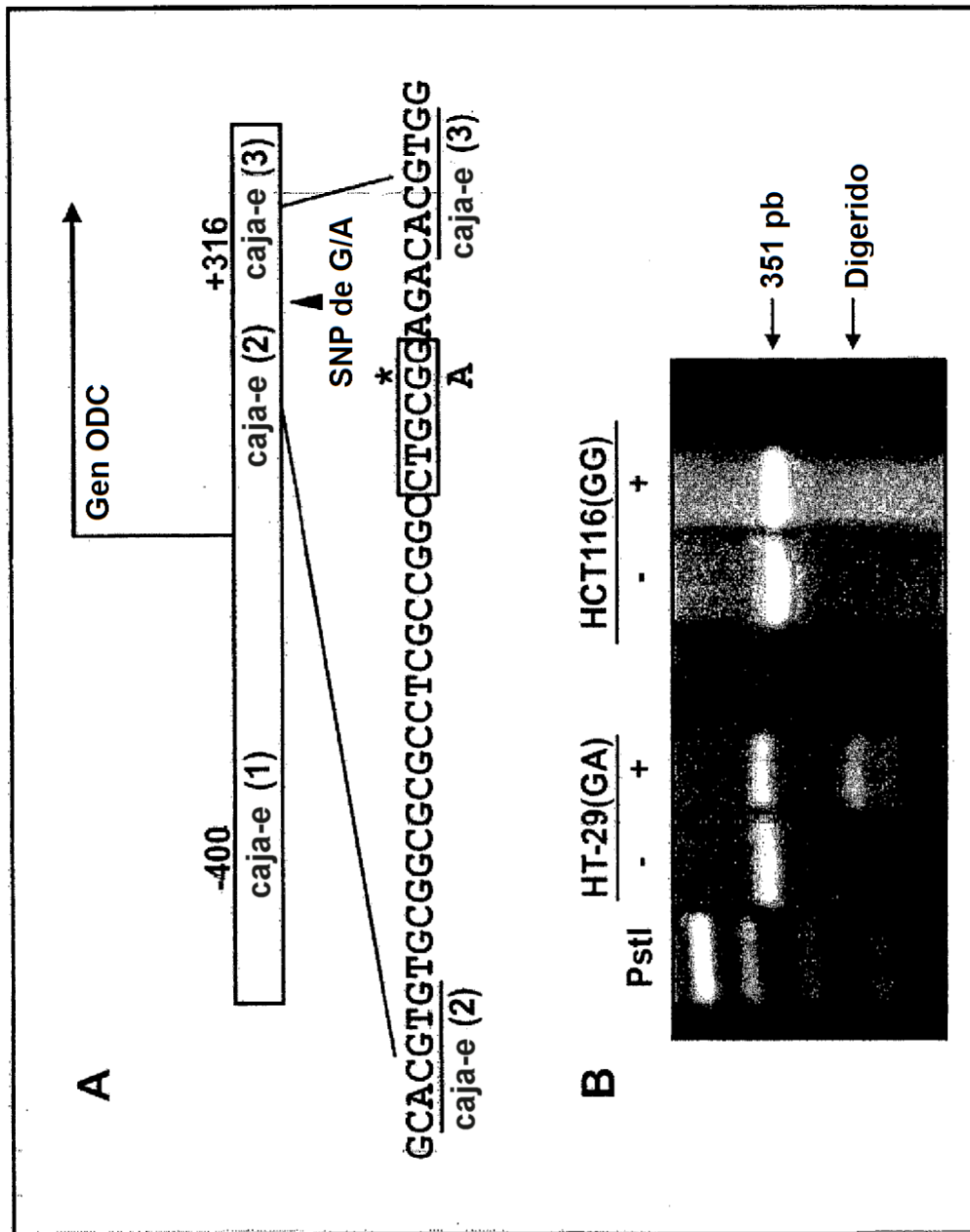


FIG. 3A y B

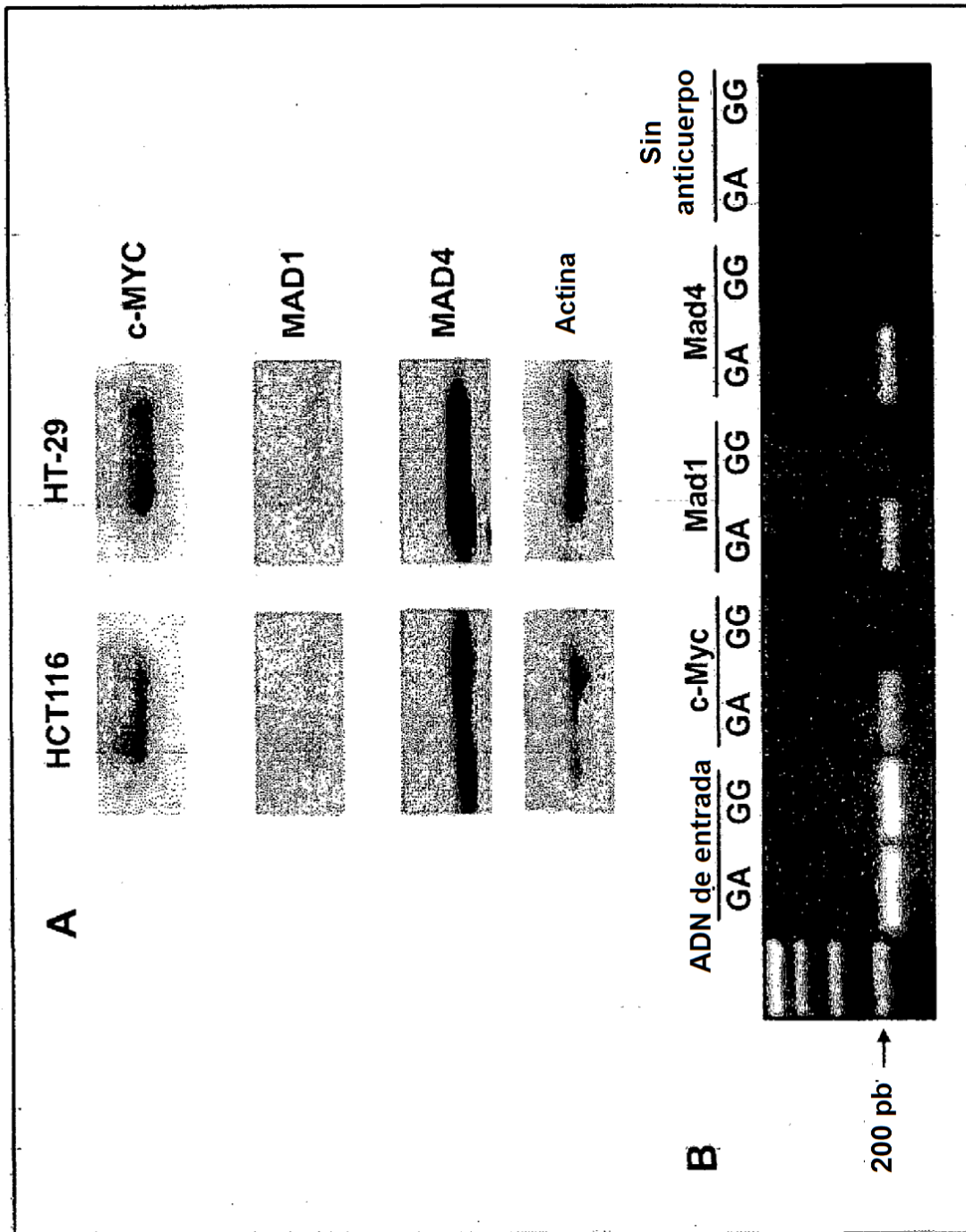


FIG. 4A y B

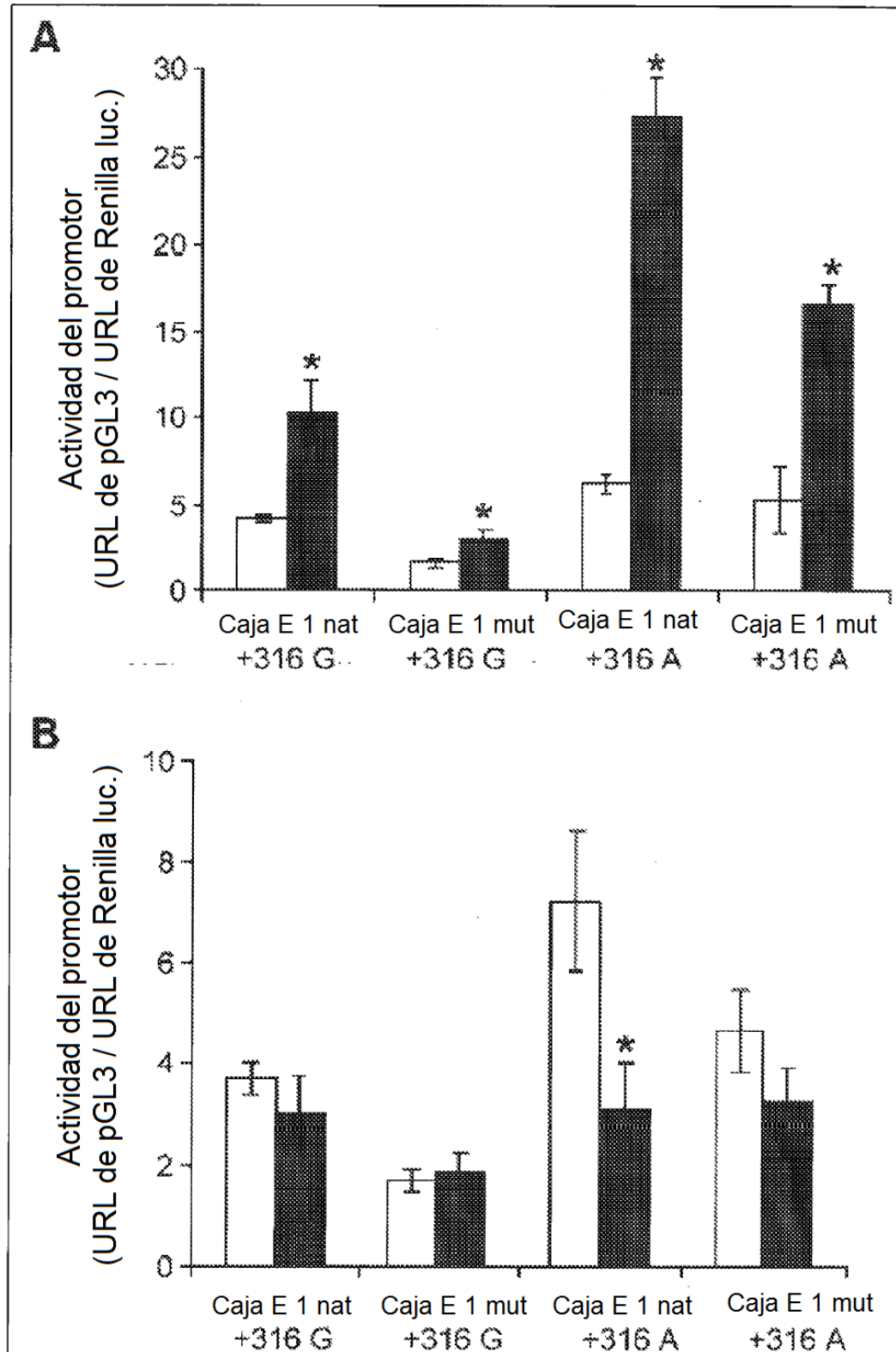


FIG. 5A y B

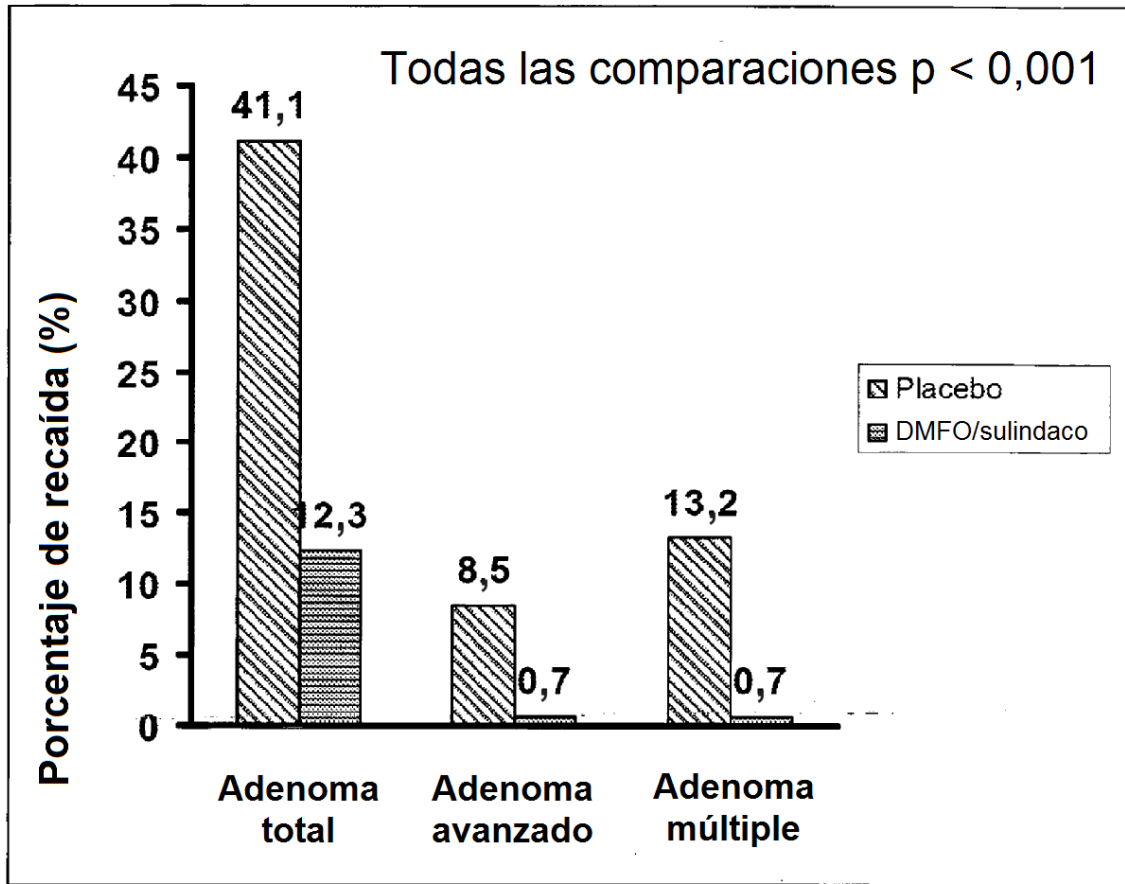


FIG. 6

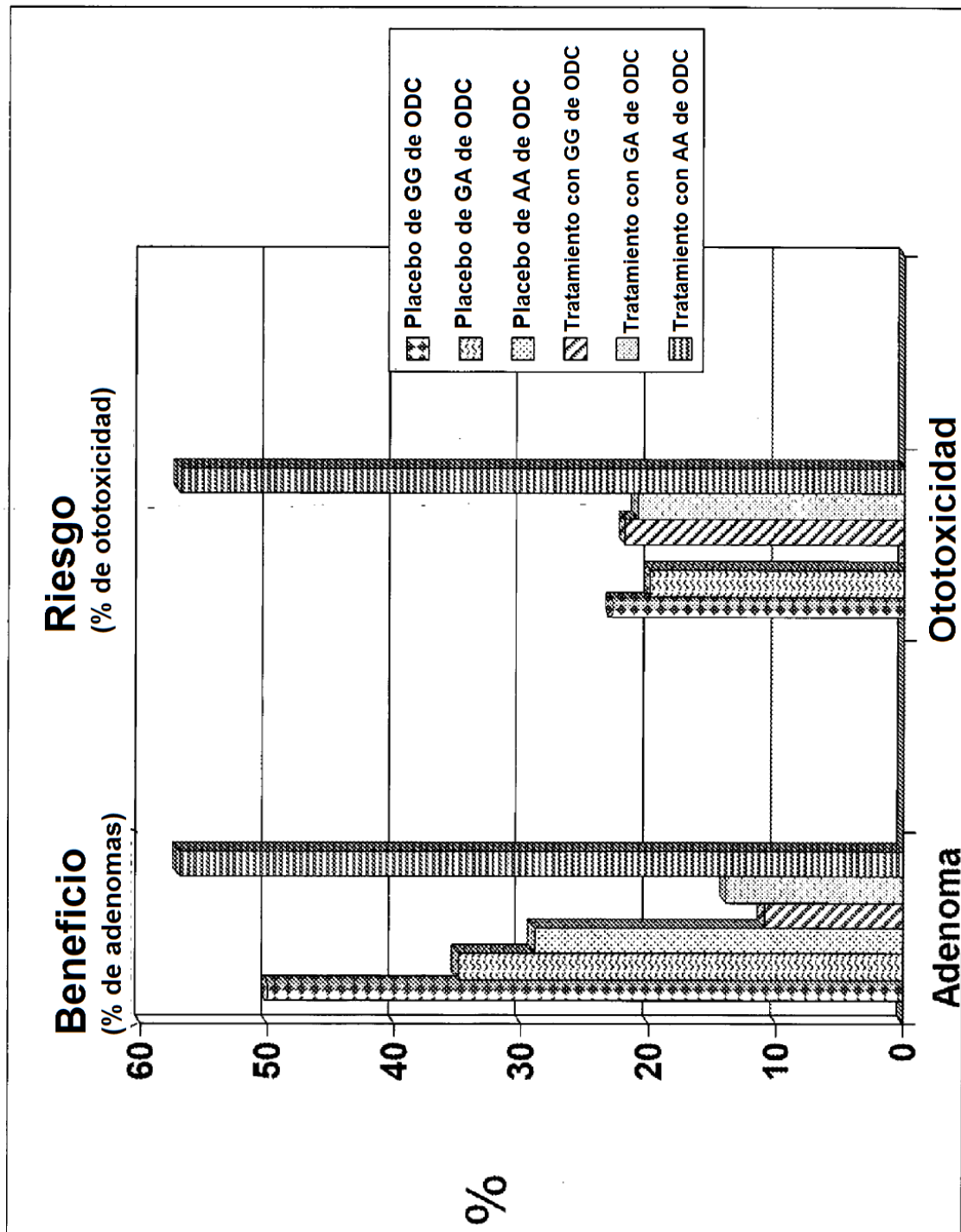


FIG. 7

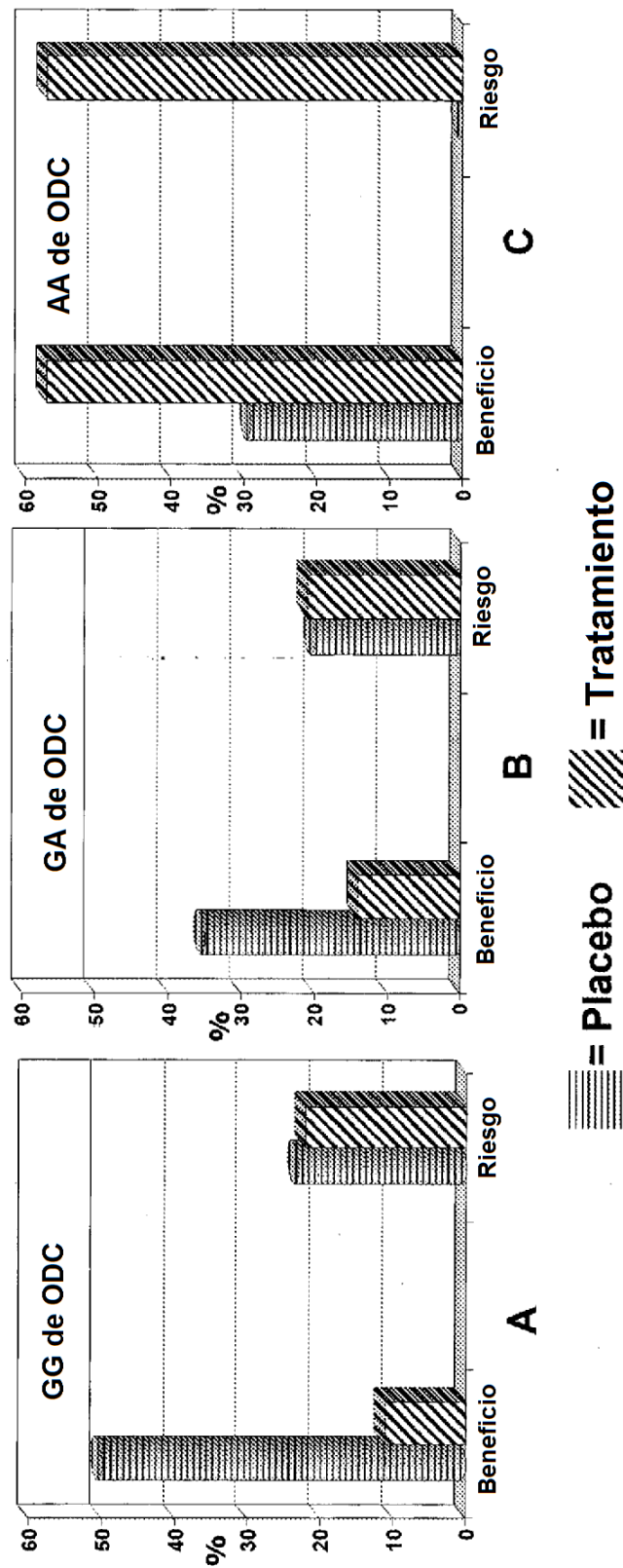


FIG. 8A-C

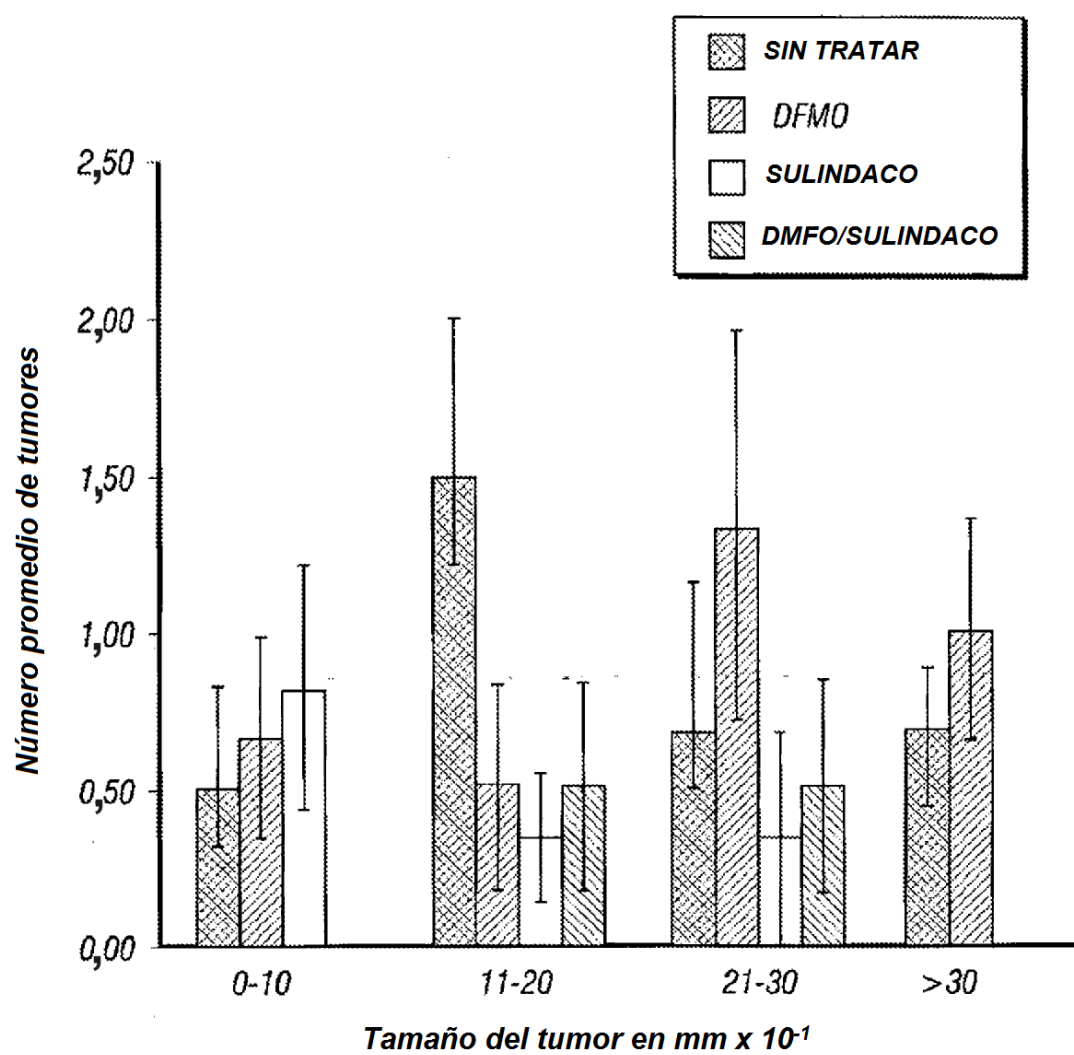


FIG. 9

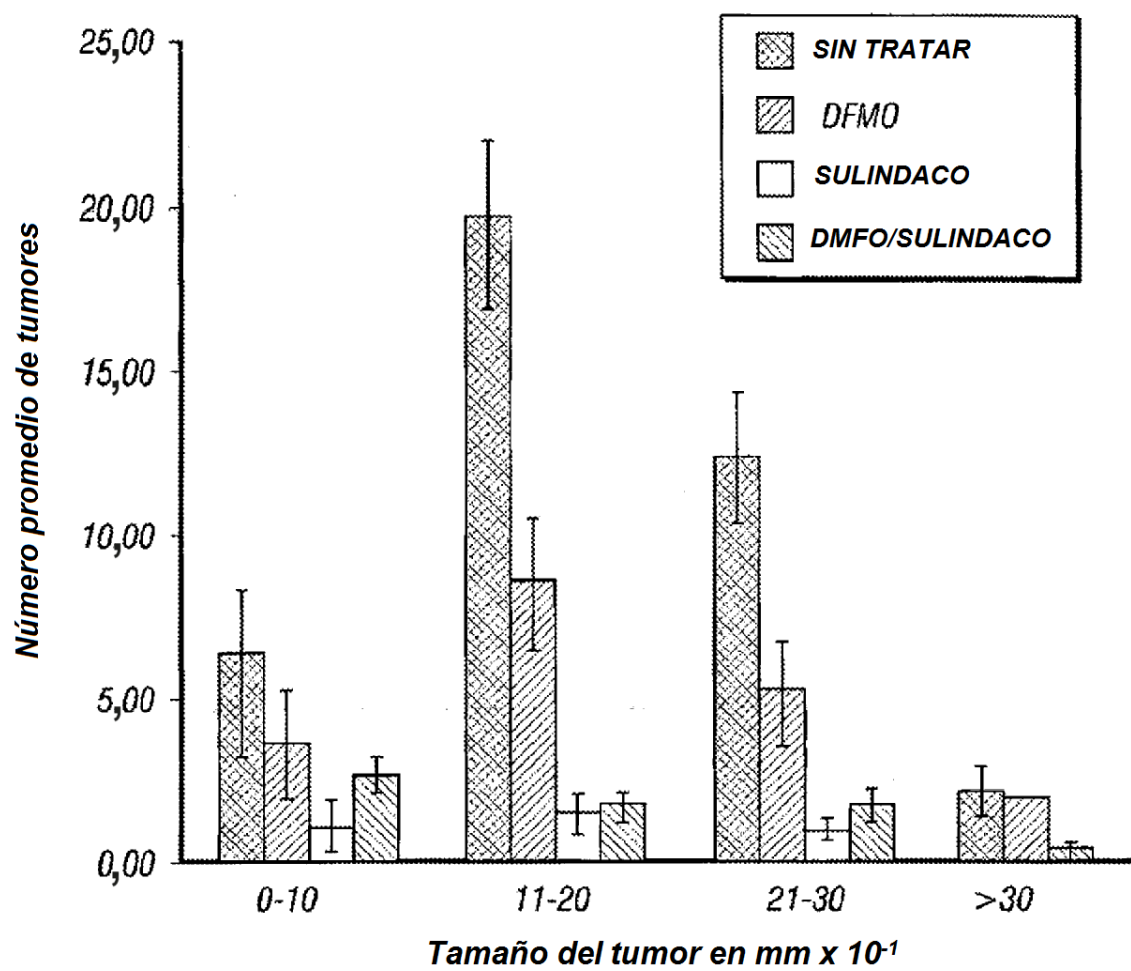


FIG. 10

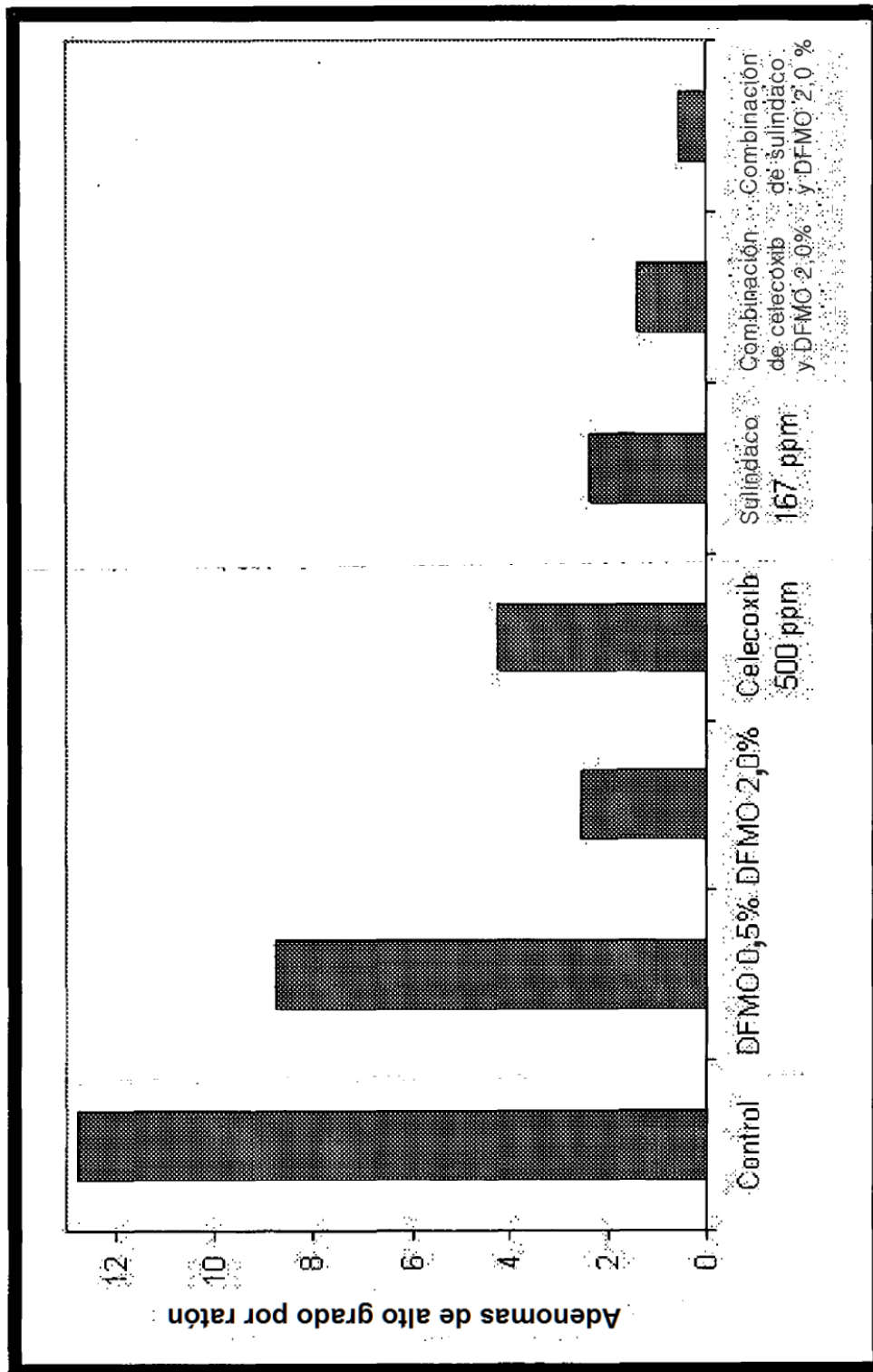


FIG. 11