

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 324**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 31/196 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/616 (2006.01)

A61K 31/635 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2013 PCT/US2013/067305**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14070767**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2013 E 13786402 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2912193**

54 Título: **Marcadores predictivos para terapias de cáncer con inhibidores de poliaminas**

30 Prioridad:

29.10.2012 US 201261719748 P

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

04.02.2019

73 Titular/es:

**ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF OF
UNIVERSITY OF ARIZONA (100.0%)
220 W. Sixth St.
Tucson, AZ 85721, US**

72 Inventor/es:

**GERNER, EUGENE;
PAZ, EDWIN;
LAFLEUR, BONNIE y
GARCIA-HUIDOBRO, JENARO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 698 324 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

Marcadores predictivos para terapias de cáncer con inhibidores de poliaminas

5 **Antecedentes de la invención**

La presente solicitud reivindica el beneficio prioritario de la solicitud provisional de Estados Unidos número 61 719.748, presentada el 29 de octubre de 2012, cuyo contenido completo se ha incorporado por referencia en el presente documento.

10 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno con las subvenciones n.º P50 CA095060 y n.º R01 CA123065 de los National Institutes of Health. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

15 **I. Campo de la invención**

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

20 **II. Descripción de la técnica anterior**

Las células cancerosas tienen la capacidad de cooptar múltiples vías para cumplir con su mayor requerimiento de metabolitos específicos (Vander Heiden, 2011). En particular, el metabolismo de las poliaminas es un proceso altamente coordinado que se asocia con actividades celulares fundamentales, incluida la proliferación y el desarrollo (Gerner y Meyskens, 2004; Zhang *et al.* 2012). Las poliaminas son esenciales tanto para el desarrollo normal como para el crecimiento neoplásico en mamíferos y los niveles elevados de poliaminas en los tejidos se asocian con frecuencia con cánceres, incluidos los del colorrecto, como resultado de oncogenes desregulados y supresores de tumores (Gerner y Meyskens, 2004). El tratamiento de pacientes con agentes que suprimen los contenidos de poliaminas colorrectales reduce drásticamente los adenomas colorrectales metacrónicos, que son precursores de los cánceres colorrectales (CCR) (Meyskens *et al.*, 2008). Además, ensayos clínicos previos de prevención del cáncer demostraron que el metabolismo de las poliaminas es un objetivo manejable para prevenir el riesgo de varios cánceres epiteliales, incluyendo los de colon, próstata y piel (Meyskens *et al.*, 2008; Bailey *et al.*, 2010; Simoneau *et al.*, 2008). Por ejemplo, se demostró recientemente la notable eficacia demostrada de la combinación inhibidora de poliaminas de D, L- α -difluorometilornitina oral a largo plazo (DFMO, eflornitina) y sulindaco en pacientes con adenoma colorrectal (ARC) (Meyskens *et al.*, 2008), además, el tratamiento se asoció con una ototoxicidad modesta subclínica (McLaren *et al.*, 2008) y un mayor número de eventos cardiovasculares entre los pacientes con riesgo cardiovascular basal alto (Zell *et al.*, 2009). Identificar características genéticas que identifiquen la idoneidad de un paciente para un régimen de tratamiento preventivo o curativo dado sería un beneficio importante.

40 Levine *et al.*, 2007, *Int. J. Cancer*, 121(1): 2279-2283 describe un estudio para evaluar la relación entre la supervivencia libre de progresión (PFS) en pacientes tratados con quimioterapia con DFMO + PCV (procarbazona, CCNU, vincristina) para gliomas malignos con actividad ornitina descarboxilasa de células tumorales (ODC) y concluyó que ese estudio sugirió que los pacientes con gliomas de alto grado (AG y GBM) que tienen una actividad de ODC media en el tumor de menos de 3,3 nmol/30 min/ μ g de proteína antes del inicio de una terapia basada en DFMO deben tener una PFS más larga que aquellos con mayores niveles de actividad ODC.

45 Thompson *et al.*, 2010, *Gastroenterology*, 139(3): 979-805 examinó el efecto de la combinación de tratamiento con DFMO/sulindaco sobre las concentraciones de poliaminas en la mucosa rectal y PGE2 como supuestos biomarcadores de respuesta farmacológica y llegó a la conclusión de que la medición de fuentes de tejido sustituto de la proporción espermidina a espermina (Spd:Spm) y PGE2 se deben considerar como posibles predictores basales de la capacidad de respuesta al fármaco.

50 El documento WO2010132817 se publicó el 18 de noviembre de 2010 y se titula "Carcinoma diagnosis and treatments, based on ODC1 genotype".

55 El documento WO 2011/135459 se publicó el 3 de noviembre de 2011 y se informa que se relaciona con los métodos, dispositivos y kits para predecir la sensibilidad de un paciente a un compuesto o tratamiento médico, incluidos los métodos para identificar biomarcadores, cuya expresión se relaciona con sensibilidad o resistencia al tratamiento dentro de una población o subpoblación de pacientes.

60 **Sumario de la invención**

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporcionan métodos de tratamiento, prevención y/o diagnóstico relacionados con la identificación del nivel de expresión de un paciente de un ARN let-7 no codificante, una proteína HMGA2 o una proteína LIN28.

65 En un aspecto, se proporciona un método para el tratamiento preventivo o curativo del cáncer en un sujeto que

comprende (a) obtener un resultado de una prueba que determina la expresión de un ARN let-7 no codificante y (b) administrar al paciente una cantidad eficaz de un inhibidor de la ornitina descarboxilasa (ODC) si el resultado de la prueba indica que el sujeto muestra un nivel de expresión reducido de un ARN let-7 no codificante, en comparación con un nivel observado en un sujeto no enfermo. En una realización, obtener un resultado puede comprender recibir un informe que contenga información de dichos niveles. En otra realización, obtener un resultado puede comprender proporcionar una muestra de dicho sujeto y evaluar un nivel de ARN let-7 no codificante en dicha muestra. La prueba puede comprender PCR cuantitativa. La muestra puede ser de sangre o tejido, tal como tejido tumoral. El sujeto puede ser un ser humano.

El cáncer puede ser cáncer colorrectal, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, un cáncer de sangre, cáncer de piel, cáncer de testículos, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de hígado o cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel no melanoma o glioblastoma. El cáncer puede ser un carcinoma. El cáncer colorrectal puede ser en etapa I, etapa II, etapa III o etapa IV. La administración puede hacer que un tumor no resecable se pueda reseca. El método puede comprender adicionalmente reseca dicho tumor.

El inhibidor de la ODC puede ser α -difluorometilornitina (DFMO). El método puede comprender adicionalmente administrar a dicho sujeto un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), tal como un inhibidor de COX-2, un inhibidor selectivo de COX-2, sulindaco, celecoxib, naproxeno, diclofenaco o aspirina. El inhibidor de la ODC y/o el AINE pueden administrarse sistémicamente, tal como por vía oral, intraarterial o intravenosa. La cantidad eficaz de DFMO puede ser de 500 mg/día. La cantidad eficaz de DFMO puede ser de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5,0 g/m²/día. La DFMO puede formularse como una cápsula dura o blanda, un comprimido o un líquido. La DFMO se puede administrar cada 12 horas o cada 24 horas. La cantidad eficaz de sulindaco puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 1500 mg/día, de aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg/día o aproximadamente 150 mg/día. El inhibidor de la ODC se puede administrar antes de dicho AINE, después de dicho AINE, o antes y después de dicho AINE. El inhibidor de la ODC puede administrarse al mismo tiempo que dicho AINE. El inhibidor de la ODC se puede administrar al menos una segunda vez. El AINE se puede administrar al menos una segunda vez.

El método puede comprender además (c) obtener resultados de una prueba que determina el nivel de expresión de un ARN let-7 no codificante en una segunda célula cancerosa de dicho sujeto. El nivel de expresión de let-7 en la segunda célula cancerosa puede representar el nivel de expresión de let-7 después de la administración de al menos una dosis del inhibidor de ODC. El método puede comprender además aumentar la cantidad de dicho inhibidor administrado a dicho sujeto si se observa ninguno o un pequeño aumento (por ejemplo, menos de 2 veces) en el ARN let-7 no codificante. El método puede comprender además medir LIN28 y/o HMGA2 en dicha célula cancerosa. La medición de LIN28 y/o HMGA2 puede comprender inmunohistoquímica (por ejemplo, IHC cuantitativa) o ELISA.

El método puede comprender además (i) obtener un resultado de una prueba que determina el genotipo del paciente en la posición +316 de al menos un alelo de un promotor del gen ODC1 y (ii) administrar al paciente una cantidad eficaz combinada de α -difluorometilornitina (DFMO) y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo que no contiene aspirina (AINE) si el resultado de la prueba indica que el genotipo del paciente en la posición +316 de al menos un alelo del promotor del gen ODC1 es G. El genotipo identificado en la posición +316 de ambos alelos de los promotores del gen ODC1 del paciente puede ser GG. El genotipo identificado en la posición +316 de ambos alelos de los promotores del gen ODC1 del paciente puede ser GA.

En otro aspecto, se proporciona un método para el tratamiento preventivo o curativo de carcinoma en un sujeto que comprende (a) obtener un resultado de una prueba que determina la expresión de una HMGA2 en una célula cancerosa de dicho sujeto y (b) administrar al paciente una cantidad eficaz de un inhibidor de la ornitina descarboxilasa (ODC) si el resultado de la prueba indica que la célula cancerosa muestra una expresión elevada de HMGA2 en comparación con un nivel observado en una célula no cancerosa. En una realización, la etapa de obtener un resultado puede comprender recibir un informe que contenga información de dichos niveles. En otra realización, obtener un resultado puede comprender proporcionar una muestra de dicho sujeto y evaluar un nivel de HMGA2 en dicha muestra. La prueba puede comprender inmunohistoquímica cuantitativa (por ejemplo, IHC cuantitativa) o ELISA. La muestra puede ser de sangre o tejido, tal como tejido tumoral. El sujeto puede ser un ser humano.

El cáncer puede ser cáncer colorrectal, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, un cáncer de sangre, cáncer de piel, cáncer de testículos, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de hígado o cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel no melanoma o glioblastoma. El cáncer puede ser un carcinoma. El cáncer colorrectal puede ser en etapa I, etapa II, etapa III o etapa IV. La administración puede hacer que un tumor no resecable se pueda reseca. El método puede comprender adicionalmente reseca dicho tumor.

El inhibidor de la ODC puede ser α -difluorometilornitina (DFMO). El método puede comprender adicionalmente administrar a dicho sujeto un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), tal como un inhibidor de COX-2, un inhibidor selectivo de COX-2, sulindaco, celecoxib o aspirina. El inhibidor de la ODC y/o el AINE pueden administrarse sistémicamente, tal como por vía oral, intraarterial o intravenosa. La cantidad eficaz de DFMO puede ser de 500

mg/día. La cantidad eficaz de DFMO puede ser de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5,0 g/m²/día. La DFMO puede formularse como una cápsula dura o blanda, un comprimido o un líquido. La DFMO se puede administrar cada 12 horas o cada 24 horas. La cantidad eficaz de sulindaco puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 1500 mg/día, de aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg/día o aproximadamente 150 mg/día. El inhibidor se puede administrar antes de dicho AINE, después de dicho AINE, o antes y después de dicho AINE. El inhibidor de la puede administrarse al mismo tiempo que dicho AINE. El inhibidor de la ODC se puede administrar al menos una segunda vez. El AINE se puede administrar al menos una segunda vez.

El método puede comprender además (c) obtener un resultado de una prueba que determina el nivel de expresión de una HMGA2 en una segunda célula cancerosa de dicho sujeto. El nivel de HMGA2 en la segunda célula cancerosa puede representar el nivel de HMGA2 después de la administración de al menos una dosis del inhibidor de ODC. El método puede comprender además aumentar la cantidad de dicho inhibidor administrado a dicho sujeto si se observa ninguna o una pequeña disminución (por ejemplo, menos de 2 veces) en HMGA2. El método puede comprender además medir LIN28. La medición de LIN28 y/o HMGA2 puede comprender inmunohistoquímica (por ejemplo, IHC cuantitativa) o ELISA.

El método puede comprender además (i) obtener un resultado de una prueba que determina el genotipo del paciente en la posición +316 de al menos un alelo de un promotor del gen ODC1 y (ii) administrar al paciente una cantidad eficaz combinada de α -difluorometilornitina (DFMO) y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo que no contiene aspirina (AINE) si el resultado de la prueba indica que el genotipo del paciente en la posición +316 de al menos un alelo del promotor del gen ODC1 es G. El genotipo identificado en la posición +316 de ambos alelos de los promotores del gen ODC1 del paciente puede ser GG. El genotipo identificado en la posición +316 de ambos alelos de los promotores del gen ODC1 del paciente puede ser GA.

En aún otro aspecto, se proporciona un método para el tratamiento preventivo o curativo de cáncer en un sujeto que comprende (a) obtener un resultado de una prueba que determina el nivel de expresión de LIN28 en una célula cancerosa de dicho sujeto y (b) administrar al paciente una cantidad eficaz de un inhibidor de la ornitina descarboxilasa (ODC) si el resultado de la prueba indica que la célula cancerosa muestra una expresión elevada de LIN28 en comparación con un nivel observado en una célula no cancerosa. En una realización, la etapa de obtener un resultado puede comprender recibir un informe que contenga información de dichos niveles. En otra realización, obtener un resultado puede comprender proporcionar una muestra de dicho sujeto y evaluar un nivel de LIN28 en dicha muestra. La prueba puede comprender inmunohistoquímica o ELISA. La muestra puede ser de sangre o tejido, tal como tejido tumoral. El sujeto puede ser un ser humano.

El cáncer puede ser cáncer colorrectal, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, un cáncer de sangre, cáncer de piel, cáncer de testículos, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de hígado o cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel no melanoma o glioblastoma. El cáncer puede ser un carcinoma. El cáncer colorrectal puede ser en etapa I, etapa II, etapa III o etapa IV. La administración puede hacer que un tumor no resecable se pueda reseca. El método puede comprender adicionalmente reseca dicho tumor.

El inhibidor puede ser α -difluorometilornitina (DFMO). El método puede comprender adicionalmente administrar a dicho sujeto un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), tal como un inhibidor de COX-2, un inhibidor selectivo de COX-2, sulindaco, celecoxib o aspirina. El inhibidor de la y/o el AINE pueden administrarse sistémicamente, tal como por vía oral, intraarterial o intravenosa. La cantidad eficaz de DFMO puede ser de 500 mg/día. La cantidad eficaz de DFMO puede ser de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5,0 g/m²/día. La DFMO puede formularse como una cápsula dura o blanda, un comprimido o un líquido. La DFMO se puede administrar cada 12 horas o cada 24 horas. La cantidad eficaz de sulindaco puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 1500 mg/día, de aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg/día o aproximadamente 150 mg/día. El inhibidor se puede administrar antes de dicho AINE, después de dicho AINE, o antes y después de dicho AINE. El inhibidor de la puede administrarse al mismo tiempo que dicho AINE. El inhibidor de la ODC se puede administrar al menos una segunda vez. El AINE se puede administrar al menos una segunda vez.

El método puede comprender además (c) obtener un resultado de una prueba que determina la expresión de LIN28 en una segunda célula cancerosa de dicho sujeto. El nivel de LIN28 en la segunda célula cancerosa puede representar el nivel de LIN28 después de la administración de al menos una dosis del inhibidor de ODC. El método puede comprender además aumentar la cantidad de dicho inhibidor administrado a dicho sujeto si se observa ninguna o una pequeña disminución (por ejemplo, menos de 2 veces) en LIN28. El método puede comprender además medir HMGA2 en dicha célula cancerosa. La medición de LIN28 y/o HMGA2 puede comprender inmunohistoquímica (por ejemplo, IHC cuantitativa) o ELISA.

El método puede comprender además (i) obtener un resultado de una prueba que determina el genotipo del paciente en la posición +316 de al menos un alelo de un promotor del gen ODC1 y (ii) administrar al paciente una cantidad eficaz combinada de α -difluorometilornitina (DFMO) y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo que no contiene aspirina (AINE) si el resultado de la prueba indica que el genotipo del paciente en la posición +316 de al menos un alelo del promotor del gen ODC1 es G. El genotipo identificado en la posición +316 de ambos alelos de los promotores

del gen ODC1 del paciente puede ser GG. El genotipo identificado en la posición +316 de ambos alelos de los promotores del gen ODC1 del paciente puede ser GA.

En otros aspectos más, se proporciona:

- 5 un método para predecir la eficacia de una terapia anticancerosa que comprende un inhibidor de la ornitina descarboxilasa (ODC) que comprende evaluar un nivel de *let-7* celular o tisular en un paciente a tratar con dicha terapia, en donde un bajo nivel de *let-7* celular o tisular predice una mayor eficacia para dicho tratamiento;
- 10 un método para predecir la eficacia de una terapia anticancerosa que comprende un inhibidor de la ornitina descarboxilasa (ODC) que comprende evaluar el nivel de HMGA2 celular o tisular en un paciente que se va a tratar con dicha terapia, en donde un nivel alto de HMGA2 celular o tisular predice una mayor eficacia para dicho tratamiento; y
- 15 un método para predecir la eficacia de una terapia anticancerosa que comprende un inhibidor de la ornitina descarboxilasa (ODC) que comprende evaluar el nivel de LIN28 celular o tisular en un paciente que se va a tratar con dicha terapia, en donde un nivel alto de LIN28 celular o tisular predice una mayor eficacia para dicho tratamiento.
- 20 En cualquiera de los aspectos anteriores, el inhibidor de la ornitina descarboxilasa (ODC) puede ser α -difluorometilornitina (DFMO) y la terapia puede comprender además un AINE (por ejemplo, un inhibidor de COX-2, un inhibidor selectivo de COX-2, sulindaco, celecoxib o aspirina). Las realizaciones anteriores también pueden comprender obtener los resultados de una prueba que determina el genotipo de dicho paciente en la posición +316 de al menos un alelo de un promotor del gen ODC1, tal como al recibir un informe que contiene dicho genotipo, tomar un
- 25 historial del paciente que revela dicho genotipo, o realizar pruebas para determinar la base de nucleótido en la posición +316 de uno o ambos alelos del promotor del gen ODC1 del paciente. El sujeto puede ser un ser humano. El cáncer puede ser un carcinoma.
- En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar un cáncer o una afección precancerosa en un paciente,
- 30 el método comprende obtener una muestra del paciente; y determinar un nivel de expresión de al menos dos marcadores seleccionados del grupo que consiste en un ARN *let-7* no codificante, una proteína LIN28 y una proteína HMGA2 en la muestra, en donde si el nivel de expresión del ARN *let-7* no codificante disminuye o si la proteína LIN28 o la proteína HMGA2 aumentan en la muestra en relación con un nivel de referencia, entonces el paciente es diagnosticado con cáncer o con una afección precancerosa.
- 35 En una realización, el nivel de referencia puede ser un nivel observado en un sujeto sin enfermedad. En una realización, la muestra puede ser una muestra de sangre, una muestra de tejido o una muestra de tumor.
- En una realización, determinar el nivel de expresión de un ARN *let-7* no codificante comprende realizar una PCR
- 40 cuantitativa. En una realización, determinar el nivel de expresión de una proteína LIN28 o HMGA2 comprende realizar inmunohistoquímica cuantitativa. En una realización, determinar el nivel de expresión de una proteína LIN28 o la proteína HMGA2 comprende la transferencia Western realizada. En una realización, se puede determinar el nivel de expresión de los tres marcadores.
- 45 En una realización, el método puede comprender proporcionar un informe escrito al paciente, a un médico, a un hospital o a un proveedor de seguros. En una realización, el método puede comprender administrar DFMO al paciente. El método puede comprender además administrar un AINE al paciente (por ejemplo, sulindaco, celecoxib, naproxeno, diclofenaco o aspirina).
- 50 El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más", "al menos uno", y "uno o más de uno".
- A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación de error
- 55 inherente para el dispositivo, el método que se está empleando para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos de estudio.
- Los términos "comprende", "tiene", e "incluye" son verbos abiertos. Las formas o los tiempos verbales de uno o más de estos verbos, como "comprende", "que comprende", "tiene", "que tiene", "incluye" y "que incluye", también son
- 60 abiertos. Por ejemplo, cualquier método que "comprende", "tiene", o "incluye" una o más etapas no se limita a poseer solo una o más de esas etapas y también cubre otras etapas no listadas.
- El término "eficaz", como se usa este término en la memoria descriptiva y/o reivindicaciones, significa adecuado para lograr un resultado deseado, esperado o previsto.
- 65 Como se usa en el presente documento, el término "IC₅₀" se refiere a una dosis inhibitoria que es el 50 % de la

respuesta máxima 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, un cerdo de guinea o especies transgénicas de los mismos. En determinadas realizaciones, el paciente o sujeto es un primate. Ejemplos no limitativos de sujetos humanos son adultos, juveniles, bebés y fetos.

"Farmacéuticamente aceptable" significa que es útil para preparar una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y ni biológicamente o de otro modo no deseada e incluye que es aceptable para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano.

"Prevención" o "que previene" 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 aún no experimenta o muestra ninguna o toda la patología o sintomatología de la enfermedad y/o (2) ralentizar la aparición de la patología o la sintomatología de una enfermedad en un sujeto o paciente que puede estar en riesgo y/o predispuesto a la enfermedad pero que aún no experimenta o no muestra ninguna o la totalidad 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 llevar a cabo dicho tratamiento contra la enfermedad.

"Tratamiento" o "que trata" incluye (1) inhibir una enfermedad en un sujeto o paciente que experimenta o muestra la patología o sintomatología de la enfermedad (por ejemplo, detiene el desarrollo adicional de la patología y/o la sintomatología), (2) mejorar una enfermedad en un sujeto o paciente que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad (por ejemplo, revertir 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 reemplazan cualquier definición conflictiva en cualquiera de las referencias que se incorporan en el presente documento como referencia. El hecho de que se definan ciertos términos, sin embargo, no debe considerarse como indicativo de que cualquier término que no esté definido es indefinido. En su lugar, se cree que todos los términos utilizados describen la invención en términos tales que un experto en la materia puede apreciar el alcance y la práctica de la presente invención.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente divulgación serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, a la vez que indican realizaciones específicas de la invención, se proporcionan solamente a modo de ilustración, ya que serán evidentes varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención para los expertos en la materia a partir de esta descripción detallada. Téngase en cuenta que simplemente porque un compuesto en particular se atribuya a una fórmula genérica particular no significa que no pueda pertenecer a otra fórmula genérica.

Breve descripción de los dibujos

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

FIGS. 1A-D. El hecho de no mantener niveles elevados de poliaminas intracelulares inhibe la proliferación celular y altera la expresión de *let-7*. FIG. 1A, Mediciones de poliaminas intracelulares, putrescina, espermidina y espermina en cultivos tratados en presencia o ausencia de DFMO y/o putrescina durante 96 h (N = 4). Las barras representan, de izquierda a derecha, Control, Putrescina, DFMO y Putrescina+DFMO. FIG. 1B, Proliferación celular en presencia o ausencia de DFMO 5 mM. Las células HCT116 se cultivaron con putrescina 50 μ M en presencia o ausencia de DFMO 5 mM. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Cuadrados cerrados, control. Círculos cerrados, putrescina. Círculos abiertos, DFMO + putrescina. Cuadrados abiertos, DFMO. FIG. 1C, Expresión de *hsa-let-7i* en células de cáncer de colon después del tratamiento con DFMO. El factor de expresión analizado es relativo al control del vehículo utilizando el método comparativo de 2-Ct (N = 3). Barras negras, Control. Barras grises, DFMO. FIG. 1D, Análisis de la expresión génica de células tratadas con o sin DFMO 5 mM en presencia o ausencia de putrescina 50 μ M durante 72 h. Expresión analizada en relación al control del vehículo. Se muestran para todos los grupos la media \pm s.d. (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

FIGS. 2A-C. Las poliaminas regulan la familia *let-7* y alteran *HMG2* y *LIN28*. FIG. 2A, Inmunotransferencia de extractos de proteínas de células HCT116 cultivadas con o sin DFMO 5 mM. FIG. 1B, Actividad relativa de luciferasa en células de cáncer de colon transfectadas con construcciones indicadoras que contienen una versión de tipo silvestre o mutada de *Hmg2* 3'UTR, cotransfectada con LNA anti-*let-7* 25 nM o LNA aleatorio. Las transfecciones se realizaron tanto en células ricas en poliaminas como en células agotadas de poliaminas. Los cultivos se trataron sin (panel izquierdo) o con (panel derecho) DFMO 5 mM durante 48 h antes de la transfección.

La suplementación con DFMO en medios normales se continuó durante 72 h después de la transfección basada en opti-MEM. Los datos se normalizaron a células transfectadas con indicador de Hmga2 de tipo silvestre y se transfectaron de forma simulada para los LNA. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. Barras blancas, Hmga2 de tipo silvestre. Barras grises, Hmga2 mutante. FIG. 2C, Análisis de transferencia de Western de HMGA2 en células con niveles elevados de poliamina en comparación con células de agotadas de poliamina transfectadas con LNA anti-let-7 o LNA aleatorio. Los resultados son la media \pm SD. Las inmunotransferencias para cada panel son representativas de tres experimentos independientes. Las inmunotransferencias se analizaron usando densitometría y se normalizaron con respecto a los controles de actina respectivos, excepto en el panel A, experimento de suplementación con putrescina de LIN28, que muestra los resultados de un único experimento representativo que se ha replicado. Las barras de error son SD (* P <0,05).

FIGS. 3A-C. eIF5A regula LIN28 y HMGA2. FIG. 3A, Inmunotransferencias que confirman la eliminación de eIF5A1 y eIF5A2 utilizando inhibidores de selección de silenciador 25 nM (Invitrogen). Los inhibidores se transfectaron durante 48 h en células HCT116 que expresan de forma estable el marcador C-terminal eIF5A2-V5-HIS. Se evaluaron en estas inmunotransferencias tanto el antígeno transfectado V5 como los niveles de eIF5A endógenos. FIG. 3B, Inmunotransferencia de los niveles de proteína HMGA2 y LIN28 transfectadas con FNA o LNA aleatorios 25 nM dirigidos contra eIF5A1 y eIF5A2. Después de 72 h, se recogieron las células para la proteína. FIG. 3C, Las células HCT116 se cotransfectaron con LNA anti-let-7 25 nM y con ARNip de eIF5A 25 nM. La actina se muestra como un control de carga. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Las inmunotransferencias para los grupos A y B se analizaron utilizando densitometría y se normalizaron con respecto a los controles de actina respectivos, la densitometría del panel C muestra los resultados de un solo experimento representativo, que se ha replicado. Las barras de error son SD (* P <0,05).

FIG. 4. Modelo para el efecto del metabolismo de las poliaminas en el eje de señalización de LIN28/let-7 y el cáncer. Las células tumorigénicas muestran un metabolismo de poliaminas desregulado a través de niveles elevados de ODC, que está asociado con múltiples cánceres. Los niveles elevados de poliaminas, a su vez, desempeñan funciones esenciales en los procesos celulares, incluido el mantenimiento de eIF5A hipusinado para la síntesis de proteínas adecuada. El eIF5A media sus efectos a través de proteínas de unión a microARN, tal como LIN28, dando como resultado una regulación negativa de let-7, que a su vez regula factores tales como HMGA2. Cuando las células que se dividen activamente se agotan de poliaminas a través de agentes, tal como DFMO, las células no pueden proliferar manteniendo los niveles fisiológicos de let-7 en estado estable y la represión de LIN28 y HMGA2. DFMO indica el agente farmacéutico utilizado a lo largo de los estudios.

Descripción de realizaciones ilustrativas

En varios aspectos, se proporcionan métodos que comprenden predecir la idoneidad, eficacia y/o dosificación de las terapias combinadas contra el carcinoma que comprenden inhibidores de la ornitina descarboxilasa (ODC) y un medicamento antiinflamatorio no esteroideo. Dicho método se basa, al menos en parte, en la medición del nivel de expresión de un miARN let-7, una proteína HMGA2 o una proteína LIN28 en el cáncer del paciente.

I. Metabolismo de Poliaminas

El exceso de formación de poliaminas ha estado implicado durante mucho tiempo en la carcinogénesis epitelial, en particular en la carcinogénesis colorrectal. Las poliaminas son pequeñas moléculas ubicuas involucradas en diversos procesos, incluyendo, por ejemplo, transcripción, estabilización de ARN y compuerta de canales iónicos (Wallace, 2000). La ornitina descarboxilasa (ODC), la primera enzima en la síntesis de poliaminas, es esencial para el desarrollo normal y la reparación de tejidos en mamíferos, pero está regulada a la baja en la mayoría de los tejidos adultos (Gerner y Meyskens, 2004). Las múltiples anomalías en el control del metabolismo y el transporte de las poliaminas dan como resultado un aumento de los niveles de poliaminas que pueden promover la tumorigénesis en varios tejidos (Thomas y Thomas, 2003).

El metabolismo de las poliaminas está regulado al alza en los tejidos epiteliales intestinales de los seres humanos con poliposis adenomatosa familiar (FAP) (Giardiello et al., 1997), un síndrome asociado con un alto riesgo de cáncer de colon y otros. La FAP puede ser causada por mutaciones en el gen supresor de tumores de la poliposis adenomatosa coli (APC) y se ha demostrado que la señalización de APC regula la expresión de ODC tanto en células humanas (Fultz y Gerner, 2002) como en un modelo de ratón de FAP (Erdman et al., 1999).

La expresión de APC de tipo silvestre conduce a una expresión reducida de ODC, mientras que el APC mutante conduce a un aumento de la expresión de ODC. El mecanismo de regulación de ODC dependiente de APC implica factores de transcripción E-box, incluido el activador transcripcional *c-MYC* y el represor transcripcional *MAD1* (Fultz y Gerner, 2002; Martínez et al., 2003). Otros demostraron que *c-MYC* regula la transcripción de ODC (Bellofernandez et al., 1993). Varios genes involucrados en el metabolismo de las poliaminas son genes esenciales para el crecimiento óptimo en la mayoría de los organismos y están regulados a la baja en células y tejidos no proliferantes y/o adultos (Gerner y Meyskens, 2004). Las poliaminas influyen en los fenotipos celulares específicos, en parte, al afectar los patrones de expresión génica, como se revisó en otra parte (Childs et al., 2003).

Como se describe a continuación, una estrategia que involucra la inhibición de la actividad de ODC (es decir, la enzima limitante de la velocidad de la síntesis de poliaminas) y/o la reducción de los niveles de poliaminas celulares ha

demostrado una eficacia notable en la prevención de la recurrencia de pólipos colorrectales en seres humanos. Los resultados epidemiológicos y experimentales demuestran la regulación condicional de la homeostasis de las poliaminas por polimorfismo genético en ODC, y sugieren un modelo en el que el SNP en +316 de *ODC* puede ser protector para la recurrencia de adenoma de colon y perjudicial para la supervivencia después del diagnóstico de

5 cáncer de colon. Esta información se puede usar para determinar el pronóstico del cáncer de colon. La identificación de pacientes con mayor riesgo de progresión/recurrencia del cáncer permite la implementación temprana de estrategias de gestión de prevención terciaria. Adicionalmente, esta investigación se puede utilizar para identificar pacientes con cáncer colorrectal locorregional de alto riesgo pero tratados de manera óptima que se beneficiarían de las terapias terciarias de prevención del cáncer.

10 Dependiendo de la dieta del paciente, los problemas asociados con el exceso de poliaminas pueden agravarse por el hecho de que las poliaminas, por ejemplo, putrescina, están presentes en muchos alimentos comunes, como el zumo de naranja, que contiene aproximadamente 400 ppm de putrescina. A este respecto, una dieta con alto contenido de poliaminas está contraindicada y para algunas de las realizaciones proporcionadas en el presente documento, debe evitarse dicha dieta.

15 Las poliaminas son oncometabolitos que regulan la expresión de la proteína de unión a microARN LIN28 y varios microARN, incluido let-7, que son reguladores clave del desarrollo y la proliferación (Viswanthan *et al.*, 2008; 2010). El agotamiento de las poliaminas causado por el tratamiento con difluorometilornitina (DFMO) suprime la expresión de LIN28 y HMGA2, que son proteínas conocidas reguladas por let-7. La neutralización de la familia let-7 utilizando oligonucleótidos antisentido de ácido nucleico bloqueado (LNA) (Obad *et al.*, 2011) rescata la expresión de HMGA2 en presencia de DFMO. La anulación de las isoformas 1 y 2 del factor 5A de inicio de la traducción eucariótica modificada con poliaminas (eIF5A) suprime tanto la expresión de LIN28 como la de HMGA2. Sin quedar ligado a teoría alguna, estos hallazgos indican que las poliaminas regulan la proliferación y los factores asociados a la pluripotencia, tal como HMGA2, en parte a través de eIF5A y la represión de la traducción mediada por microARN. La aplicación de estas observaciones a entornos clínicos identifica mejor los subconjuntos de pacientes que se beneficiarán de las terapias dirigidas con poliaminas, lo que permite una intervención terapéutica a medida basándose en la capacidad del sujeto para responder a tales terapias.

30 II. Poliposis Adenomatosa Familiar

La poliposis adenomatosa familiar (FAP), un síndrome de poliposis hereditario, puede ser el resultado de una mutación de la línea germinal en el gen supresor de tumores de la poliposis adenomatosa coli (*APC*) (Su *et al.*, 1992). Esta afección autosómica dominante con expresión variable se asocia con el desarrollo de cientos de adenomas de colon, que progresan uniformemente a adenocarcinoma a los cuarenta años de edad, dos décadas antes de la edad media para el diagnóstico de cáncer de colon esporádico (Bussey, 1990). En estudios previos de individuos pre-sintomáticos con FAP, se han detectado niveles aumentados de las poliaminas espermidina y espermina, y su precursor de diamina putrescina en biopsias colorrectales de aspecto normal en comparación con los controles de miembros de la familia normales (Giardiello *et al.*, 1997). La actividad de la ornitina descarboxilasa (*ODC*), la primera enzima y limitante de la velocidad en la síntesis de poliaminas de mamíferos, también es elevada en las biopsias de mucosa colónica aparentemente normales de pacientes con FAP (Giardiello *et al.*, 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*, utilizando el inhibidor irreversible DFMO activado por enzimas, inhibe la carcinogénesis de colon en roedores tratados con carcinógeno (Kingsnorth *et al.*, 1983; Tempero *et al.*, 1989).

45 El ratón Min (neoplasia intestinal múltiple), que comparte un genotipo *APC/apc* mutado con FAP, sirve como un modelo animal experimental útil para pacientes humanos con FAP (Lipkin, 1997). El ratón Min puede desarrollar más de 100 adenomas/adenocarcinomas gastrointestinales en todo el tracto gastrointestinal a los 120 días de vida, lo que lleva a sangrado GI, obstrucción GI y muerte. Una terapia de combinación de DFMO y sulindaco es eficaz para reducir los adenomas en estos ratones (Patente de Estados Unidos 6.258.845; Gerner y Meyskens, 2004).

III. Neuroblastoma

55 Los resultados proporcionados en el presente documento también tienen relevancia para enfermedades distintas del carcinoma colorrectal que muestran una expresión de let-7 desregulada, tal como el neuroblastoma (Buechner *et al.*, 2011). De hecho, los datos preclínicos indican que las terapias dirigidas a las poliaminas pueden ser eficaces contra el neuroblastoma (Hogarty *et al.*, 2008). De hecho, DFMO ha mostrado citotoxicidad de agente único contra líneas celulares de neuroblastoma (Samal *et al.*, 2013, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). Específicamente, Se encontró que DFMO tiene concentraciones de IC₅₀ entre 20,76 y 33,3 mM contra tres líneas celulares de neuroblastoma (SMS-KCNR, SH-SY5Y y BE(2)-C) después de 48 h de tratamiento. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento pueden usarse para tratar pacientes con neuroblastoma.

65 IV. Polimorfismo de Ornitina Descarboxilasa-1

La actividad de la ornitina descarboxilasa (*ODC*), la primera enzima en la síntesis de poliaminas, se requiere para el

crecimiento normal y es elevada en muchos cánceres, incluyendo el cáncer colorrectal. Se examinaron las asociaciones del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) +316 de ODC con la supervivencia específica de cáncer colorrectal (CCR) entre los casos de CCR y se investigó su importancia funcional en las células de cáncer de colon.

5 Un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el intrón 1 del gen ODC1 humano afecta la transcripción de ODC1 (Guo *et al.*, 2000), y se ha investigado como un marcador genético para el riesgo de adenoma colorrectal (CRA) (Martínez *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2006; Hubner *et al.*, 2008). La frecuencia del alelo menor A presentada es de aproximadamente el 25 % y, a pesar de las diferencias entre raza/etnia, la distribución del genotipo *ODC1* se encuentra en el equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de cada raza (O'Brien *et al.*, 2004; Zell *et al.*, 2009a). Los individuos homocigotos para el alelo A menor de *ODC1* tienen un riesgo reducido de recurrencia de adenoma en comparación con aquellos con el alelo mayor G (Martínez *et al.*, 2003; Hubner *et al.*, 2008). Además, se han asociado el alelo A de *ODC1* (genotipo AA o GA, pero no el genotipo GG) y el uso informado de aspirina con una reducción de la recurrencia de pólipos en el colon (Martínez *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2006; Hubner *et al.*, 2008), y una reducción estadísticamente significativa del 50 % del riesgo de adenomas avanzados (Barry *et al.*, 2006).

15 Se investigó la unión específica a alelos de ODC de los factores de transcripción de E-box y se evaluó la importancia funcional del SNP +316 de ODC, ubicada entre dos E-box (E-box 2 y 3). Se encontró que las células HT29 contenían al menos un alelo A de *ODC*. Se encontró que las células HCT116 contenían solo alelos G de *ODC*.

20 Se analizó la expresión de proteínas de unión a E-box específicas, incluido el activador transcripcional c-MYC y varios represores transcripcionales en células HT29 y HCT116 (por ejemplo, MAD1 y MAD4). El análisis de inmunoprecipitación de cromatina (CHIP) de la región que rodea a +316 del promotor de *ODC* se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra estas proteínas. Estos resultados indicaron que la unión de c-MYC, MAD1 y MAD4 a la región de SNP de ODC fue 4-14 veces mayor en las células HT29, que contenían un alelo A de *ODC*, en comparación con las células HCT116, que contenían solo alelos G de *ODC*.

30 Se evaluó la actividad del promotor específico de alelo de *ODC*. La expresión de c-MYC tuvo el mayor efecto estimulante sobre los promotores que contenían tres E-box consenso y el alelo A de *ODC*. La delección del E-box cadena arriba redujo la actividad del promotor, pero la expresión de c-MYC continuó estimulando esta actividad. 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 un E-box consenso flanqueante de 5' intacta. La mutación de E-box consenso flanqueante de 5' en combinación con el alelo G de *ODC* redujo adicionalmente la actividad del promotor.

35 Cuando se cotransfectó MAD1, en lugar de c-MYC, con los indicadores del promotor específicos de alelos de *ODC*, el represor solo pudo reducir la actividad del promotor de *ODC* que contenía los tres E-box y el alelo de tipo silvestre A +316. La delección del E-box aguas arriba redujo significativamente el efecto de MAD1 en la actividad del promotor de *ODC*. La sustitución de G por A en la posición +316 hacía que los promotores que contenían dos o tres E-box no respondieran a la supresión de MAD1.

40 V. Difluorometilornitina (DFMO)

45 La DFMO, También conocida como eflornitina, tiene la siguiente designación química: 2- (difluorometil) -*dl*-ornitina. Es un inhibidor irreversible activado por enzimas de la ornitina descarboxilasa (ODC), la enzima limitante de la velocidad de la vía biosintética de la poliamina. Como resultado de esta inhibición de la síntesis de poliamina, el compuesto es eficaz para 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.

50 La DFMO disminuye la tumorigénesis intestinal dependiente de APC en ratones (Erdman *et al.*, 1999). La DFMO oral administrada diariamente a seres humanos inhibe la actividad de la enzima ODC y los contenidos de poliamina en varios tejidos epiteliales (Love *et al.*, 1993; Gerner *et al.*, 1994; Meyskens *et al.*, 1994; Meyskens *et al.*, 1998; Simoneau *et al.*, 2001; Simoneau *et al.*, 2008). Cabe destacar que, la DFMO en combinación con el fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) sulindaco redujo notablemente las tasas de recurrencia de adenoma entre individuos con adenomas de colon en comparación con el tratamiento con placebo en un ensayo clínico aleatorizado (Meyskens *et al.*, 2008).

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

- Enfermedad del sueño africana. Forma de dosificación IV sistémica de altas dosis. No comercializado (Sanofi /OMS).
- 60 • Forma de dosificación tópica para hirsutismo (crecimiento excesivo de vello inducido por andrógenos).

Actualmente no se aprueban formulaciones orales.

5 La DFMO y su uso en el tratamiento de la hipertrofia benigna de próstata se describen en dos patentes, patentes de Estados Unidos n.º 4.413.141 y n.º 4.330.559. La Patente de Estados Unidos n.º 4.413.141 describe la DFMO como un potente inhibidor de la ODC, tanto *in vitro* como *in vivo*. La administración de DFMO causa una disminución en las concentraciones de putrescina y espermidina en las células en las que estas poliaminas normalmente se producen activamente. Adicionalmente, la DFMO fue capaz de ralentizar la proliferación de células neoplásicas cuando se probó en modelos tumorales convencionales. La Patente de Estados Unidos n.º 4.330.559 describe el uso de DFMO y derivados de DFMO para el tratamiento de la hipertrofia benigna de próstata. La hipertrofia benigna de próstata, al igual que muchos estados de enfermedad caracterizados por la rápida proliferación celular, se acompaña de una elevación anormal de las concentraciones de poliaminas. El tratamiento descrito en esta referencia puede administrarse a un paciente por vía oral o parenteral.

15 La DFMO se puede administrar potencialmente de manera continua con efectos antitumorales significativos. Este fármaco es relativamente no tóxico a dosis bajas de 0,4 g/m²/día para los seres humanos mientras que produce inhibición de la síntesis de putrescina en tumores. Los 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 del tumor sin suprimir los recuentos de plaquetas periféricas.

20 Los efectos secundarios observados con DFMO incluyen efectos en la audición a dosis altas de 4 g/m²/día que se resuelven cuando se suspende. Estos efectos en la audición no se observan a dosis más bajas de 0.4 g/m²/día cuando se administran hasta por un año (Meyskens *et al.*, 1994). Además, se observan algunos casos de mareo/vértigo que se resuelven cuando se suspende el fármaco. Se ha informado de trombocitopenia predominantemente en estudios que utilizaron altas dosis "terapéuticas" de DFMO (> 1.0 g/ m²/día) y principalmente en pacientes con cáncer que habían sido sometidos previamente a quimioterapia o pacientes con médula ósea comprometida. Aunque la toxicidad asociada con el tratamiento con DFMO no es, en general, tan grave como otros tipos de quimioterapia, se ha encontrado en ensayos clínicos limitados que promueve una trombocitopenia relacionada con la dosis. Además, los estudios en ratas han demostrado que la infusión continua de DFMO durante 12 días reduce significativamente los recuentos de plaquetas en comparación con los controles. Otras investigaciones han realizado observaciones similares en las que la trombocitopenia es la principal toxicidad de la aplicación i.v. de forma continua. Terapia DFMO. Estos hallazgos sugieren que la DFMO puede inhibir significativamente la actividad ODC de los precursores de la médula ósea de los megacariocitos. La DFMO puede inhibir los procesos de reparación proliferativos, como la cicatrización de heridas epiteliales.

35 Un ensayo clínico de fase III evaluó la recurrencia de pólipos adenomatosos después del tratamiento durante 36 meses con difluorometilornitina (DFMO) más sulindaco o placebos pareados. La pérdida de audición temporal es una toxicidad conocida del tratamiento con DFMO, por lo que se desarrolló un enfoque integral para analizar los audiogramas de conducción aérea en serie. El método de la ecuación de estimación generalizada estimó la diferencia de medias entre los grupos de tratamiento con respecto al cambio en los umbrales de tonos puros de conducción aérea al tiempo que explica la correlación dentro del sujeto debido a las mediciones repetidas en las frecuencias. No hubo diferencias significativas en la proporción de sujetos en el grupo DFMO más sulindaco que experimentaron una pérdida auditiva clínicamente significativa en comparación con el grupo placebo. El riesgo atribuible estimado de ototoxicidad por exposición al fármaco es del 8,4 %. Hay una diferencia de <2 dB en el umbral medio para los pacientes tratados con DFMO más sulindaco en comparación con los tratados con placebo. Los resultados de este estudio se discuten con mayor detalle en McLaren *et al.* (2008), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

VI. AINE

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

60 Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), que incluyen aspirina, ibuprofeno, piroxicam (Reddy *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 1994), indometacina (Narisawa, 1981) y sulindaco (Piazza *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1995), inhiben eficazmente la carcinogénesis de colon en el modelo de ratas tratadas con AOM. Los AINE también inhiben el desarrollo de tumores que albergan un Ki-ras activado (Singh y Reddy, 1995). Los AINE parecen inhibir la carcinogénesis a través de la inducción de la apoptosis en células tumorales (Bedi *et al.*, 1995; Lupulescu, 1996; Piazza *et al.*, 1995; Piazza *et al.*, 1997b). Varios estudios sugieren que las propiedades quimiopreventivas de los AINE, incluyendo la inducción de la apoptosis, son una función de su capacidad para inhibir la síntesis de prostaglandinas (revisado en DuBois *et al.*, 1996; Lupulescu, 1996; Vane y Botting, 1997). Sin embargo, los estudios indican que los

AINE pueden actuar a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de las prostaglandinas (Alberts *et al.*, 1995; Piazza *et al.*, 1997a; Thompson *et al.*, 1995; Hanif, 1996). La sulindaco sulfona, un metabolito del AINE sulindaco, carece de actividad inhibitoria de la COX pero induce apoptosis en células tumorales (Piazza *et al.*, 1995; Piazza *et al.*, 1997b) e inhibe el desarrollo de tumores en varios modelos de carcinogénesis en roedores (Thompson *et al.*, 1995; Piazza *et al.*, 1995, 1997a).

Varios AINE han sido examinados por sus efectos en ensayos clínicos en seres humanos. Se completó un ensayo de fase IIa (un mes) de ibuprofeno e incluso a una dosis de 300 mg/día, se observó una disminución significativa en los niveles de prostaglandina E₂ (PGE₂) en la mucosa plana. Una dosis de 300 mg de ibuprofeno es muy baja (las dosis terapéuticas varían de 1200-3000 mg/día o más) y es poco probable que se observe toxicidad, incluso a largo plazo. Sin embargo, en modelos de quimioprevención con animales, el ibuprofeno es menos eficaz que otros AINE.

A. Aspirina

La aspirina, también conocida como ácido acetilsalicílico, es un fármaco de salicilato, a menudo usado como un analgésico para aliviar dolores y molestias menores, como un antipirético para reducir la fiebre y como un medicamento antiinflamatorio. La aspirina fue aislada por primera vez por Felix Hoffmann, un químico de la compañía alemana Bayer en 1897. El ácido salicílico, el principal metabolito de la aspirina, es una parte integral del metabolismo humano y animal. Mientras que en los humanos gran parte de esto es atribuible a la dieta, una parte sustancial se sintetiza endógenamente. En la actualidad, la aspirina es uno de los medicamentos más utilizados en el mundo, con un consumo estimado de 40.000 toneladas cada año. En los países donde la Aspirina es una marca registrada propiedad de Bayer, el término genérico es ácido acetilsalicílico (AAS).

La aspirina también tiene un efecto antiplaquetario al inhibir la producción de tromboxano, que en circunstancias normales se une a las moléculas de plaquetas para crear un parche sobre las paredes dañadas de los vasos sanguíneos. Debido a que el parche de plaquetas puede llegar a ser demasiado grande y también bloquear el flujo sanguíneo, localmente y aguas abajo, la aspirina también se usa a largo plazo, en dosis bajas, para ayudar a prevenir ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares y formación de coágulos en personas con alto riesgo de desarrollar coágulos sanguíneos. También se ha establecido que se pueden administrar dosis bajas de aspirina inmediatamente después de un ataque cardíaco para reducir el riesgo de otro ataque cardíaco o de la muerte del tejido cardíaco. La aspirina puede ser eficaz para prevenir ciertos tipos de cáncer, particularmente el cáncer colorrectal.

Los principales efectos secundarios indeseables de la aspirina administrada por vía oral son úlceras gastrointestinales, sangrado estomacal y tinnitus, especialmente a dosis más altas. En niños y adolescentes, la aspirina ya no está indicada para controlar los síntomas gripales o los síntomas de la varicela u otras enfermedades virales, debido al riesgo de síndrome de Reye.

La aspirina es parte de un grupo de fármacos llamados antiinflamatorios no esteroideos (AINE), pero se diferencia de la mayoría de los otros AINE en el mecanismo de acción. Aunque ella, y otros en su grupo llamados salicilatos, tienen efectos similares (antipiréticos, antiinflamatorios, analgésicos) a los otros AINE e inhiben la misma enzima ciclooxigenasa, la aspirina (pero no los otros salicilatos) lo hace de manera irreversible y, a diferencia de otros, afecta más a la variante COX-1 que a la variante COX-2 de la enzima.

B. Sulindaco, Sulindaco Sulfona y Sulindaco Sulfuro

Sulindaco es un derivado de indeno antiinflamatorio no esteroideo con la siguiente designación química: ácido (Z)-5-fluoro-2-metil-1-((4(metilsulfonil) fenil) metileno)1H-indeno-3-acético (Physician's Desk Reference, 1999). El resto sulfonilo 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 Estados Unidos n.º 6.258.845, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. El sulindaco, que también inhibe la activación de Ki-ras, se metaboliza a dos moléculas diferentes que difieren en su capacidad para inhibir la COX, pero ambas son capaces de ejercer efectos quimiopreventivos a través de la inducción de la apoptosis. La sulindaco sulfona carece de actividad inhibitoria de COX, y lo más probable es que facilite la inducción de la apoptosis de manera independiente a la síntesis de prostaglandinas. La evidencia disponible indica que el derivado de sulfuro es al menos uno de los compuestos biológicamente activos. Basándose en esto, el sulindaco puede considerarse un profármaco.

Sulindaco (Clinoril®) está disponible, por ejemplo, en comprimidos de 150 mg y 200 mg. La dosis más común para adultos es de 150 a 200 mg dos veces al día, con una dosis diaria máxima de 400 mg. Después de la administración oral, se absorbe alrededor del 90 % del fármaco. Los niveles plasmáticos máximos se alcanzan en aproximadamente 2 h en pacientes en ayunas y en 3-4 h cuando se administra con alimentos. La semivida media de sulindaco es de 7,8 h. La semivida media del metabolito del sulfuro es de 16,4 h. Las patentes de EE.UU. n.º 3.647.858 y n.º 3.654.349 cubren preparaciones de sulindaco y ambas se incorporan por referencia en el presente documento en su totalidad.

El sulindaco está indicado para el alivio agudo y a largo plazo de los signos y síntomas de la osteoartritis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, gota aguda, y dolor agudo del hombro. Los efectos analgésicos y antiinflamatorios ejercidos por el sulindaco (400 mg por día) son comparables a los logrados 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). Los efectos secundarios del sulindaco incluyen efectos gastrointestinales leves en casi el 20 % de los pacientes, con dolor abdominal y náuseas como las quejas más frecuentes. Los efectos secundarios del sistema nervioso central se observan en hasta el 10 % de los pacientes, siendo la somnolencia, el dolor de cabeza y el nerviosismo los más frecuentes informados. La erupción cutánea y el prurito ocurren en el 5 % de los pacientes. El tratamiento crónico con sulindaco puede provocar una grave toxicidad gastrointestinal, como hemorragia, ulceración y perforación.

El uso potencial de sulindaco para la quimioprevención de los cánceres, y en particular los pólipos colorrectales, ha sido bien estudiado. Dos patentes recientes de Estados Unidos n.º 5.814.625 y n.º 5.843.929, detallan los posibles usos quimiopreventivos del sulindaco en seres humanos. Ambas patentes se incorporan en el presente documento en su totalidad. Las dosis de sulindaco reivindicadas en la patente de EE.UU. n.º 5.814.625 varían de 10 mg a 1500 mg por día, con dosis preferidas de 50 mg a 500 mg por día. Sin embargo, en las dosis más altas, el mayor problema con el uso de sulindaco como agente único en la quimioprevención es su toxicidad conocida y su riesgo de intolerancia moderadamente alto. Los ancianos parecen ser especialmente vulnerables, ya que la incidencia de efectos secundarios es mayor en los mayores de 60 años. Se observa que este grupo de edad tiene más probabilidades de desarrollar cáncer colorrectal y, por lo tanto, es más probable que se beneficie de la quimioprevención. Se ha demostrado que el sulindaco produce regresión de adenomas en pacientes con poliposis adenomatosa familiar (FAP) (Muscat *et al.*, 1994), aunque al menos un estudio en adenomas esporádicos no mostró tal efecto (Ladenheim *et al.*, 1995). El sulindaco y su metabolito de sulfona exisulind se han probado y continúan siendo probados clínicamente para la prevención y el tratamiento de varios tipos de cáncer.

C. Piroxicam

El piroxicam es un agente antiinflamatorio no esteroideo que está bien establecido en el tratamiento de la artritis reumatoide y la osteoartritis con la siguiente designación química: 1,1-dióxido de 4-hidroxi-2-metil-N-2-piridil-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida. Su utilidad también se ha demostrado en el tratamiento de trastornos musculoesqueléticos, dismenorrea y dolor postoperatorio. Su vida media larga le permite ser administrado una vez al día. El fármaco ha demostrado ser eficaz si se administra por vía rectal. Las molestias gastrointestinales son los efectos secundarios más frecuentes informados.

Se ha demostrado que el piroxicam es un agente eficaz de quimioprevención en modelos animales (Pollard y Luckert, 1989; Reddy *et al.*, 1987), aunque demostró efectos secundarios en un ensayo reciente IIb. Un gran metaanálisis de los efectos secundarios de los AINE también indica que el piroxicam tiene más efectos secundarios que otros AINE (Lanza *et al.*, 1995).

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

D. Celecoxib

El celecoxib es un agente antiinflamatorio no esteroideo que está bien establecido en el tratamiento de la osteoartritis, artritis reumatoide, dolor agudo, espondilitis anquilosante y para reducir el número de pólipos de colon y recto en pacientes con FAP con la siguiente designación química: 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1-il]bencenosulfonamida. El celecoxib se comercializa bajo las marcas Celebrex, Celebra y Onsenal por Pfizer. Celecoxib es un inhibidor selectivo de COX-2. Los efectos secundarios del celecoxib incluyen un aumento del 30 % en las tasas de enfermedades de corazón y de vasos sanguíneos. Adicionalmente, el riesgo de efectos secundarios gastrointestinales es superior al 80 %.

E. Combinaciones de AINE

Las combinaciones de varios AINE también se utilizan para diversos fines. Al utilizar dosis más bajas de dos o más AINE, es posible reducir los efectos secundarios o las toxicidades asociadas con dosis más altas de AINE individuales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede usar sulindaco junto con celecoxib. En algunas realizaciones, uno o ambos AINE son inhibidores selectivos de COX-2. Los ejemplos de AINE que se pueden usar solos o en combinación incluyen, pero sin limitación, los siguientes: ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina, indometacina, sulindaco, etodolaco, diclofenaco, piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam, isoxicam, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido tolfenámico, celecoxib rofecoxib valdecoxib parecoxib, lumiracoxib o etoricoxib.

VII. Terapia de combinación Eflornitina/Sulindaco

Los estudios preclínicos de fármacos de quimioprevención administrados en combinación a dosis bajas muestran una eficacia notable en la prevención de adenomas con pocas toxicidades adicionales, lo que sugiere una estrategia para

mejorar las relaciones de riesgo a beneficio para prevenir los adenomas recurrentes.

Como se ha señalado anteriormente, el ratón *Min* (neoplasia intestinal múltiple), que comparte un genotipo *APC/apc* mutado con *FAP*, sirve como un modelo animal experimental útil para pacientes humanos con *FAP* (Lipkin, 1997). El ratón *Min* puede desarrollar más de 100 adenomas/adenocarcinomas gastrointestinales en todo el tracto gastrointestinal a los 120 días de vida, lo que lleva a sangrado GI, obstrucción y muerte. Una terapia de combinación de DFMO y sulindaco demostró ser efectiva para reducir los adenomas en estos ratones (Patente de Estados Unidos 6.258.845; Gerner *et al.*, 2004).

Además, se detectó una interacción estadísticamente significativa para el genotipo *ODC1* y el tratamiento en un modelo completo de recurrencia de adenoma, de manera que el patrón de recurrencia de adenoma entre los pacientes con placebo fue: GG 50 %, GA 35 %, AA 29 % frente a pacientes con eflornitina/sulindaco: GG 11 %, GA 14 %, AA 57 %. El efecto inhibitorio de adenoma de eflornitina y sulindaco fue mayor entre aquellos con el genotipo de *ODC1* homocigótico G mayor, en contraste con informes anteriores que muestran un riesgo menor de adenoma recurrente entre los pacientes con CRA que recibieron aspirina y que portan al menos un alelo A (Martínez *et al.*, 2003 Barry *et al.*, 2006; Hubner *et al.*, 2008). Estos resultados demuestran que los portadores de alelos *ODC1 A* difieren en respuesta a la exposición prolongada con eflornitina y sulindaco en comparación con los pacientes con genotipo GG, con portadores de alelos A que experimentan menos beneficios en términos de recurrencia de adenomas y el potencial de riesgo elevado de desarrollar ototoxicidad, especialmente entre los AA homocigotos.

VIII. Eficacia de la Terapia Inhibidora de poliaminas Basada en el Perfil del Paciente

Se demostró la eficacia de una combinación inhibitoria de poliaminas de *D, L-α*-difluorometilornitina oral diaria a largo plazo (DFMO, eflornitina) y sulindaco en pacientes con CRA (Meyskens *et al.*, 2008), pero el tratamiento se asoció con ototoxicidad moderada subclínica (McLaren *et al.*, 2008), y un mayor número de eventos cardiovasculares en pacientes con alto riesgo cardiovascular basal (Zell *et al.*, 2009b). Sin embargo, el genotipo *ODC1* de un paciente afecta de manera diferencial a la recurrencia de adenoma, a las respuestas de poliamina tisular y a los perfiles de toxicidad después del tratamiento con eflornitina y sulindaco en comparación con el placebo.

Los pacientes (n = 375) con antecedentes de adenomas resecados (> o = 3 mm) se asignaron al azar para recibir DFMO oral (500 mg) y sulindaco (150 mg) una vez al día o placebos pareados durante 36 meses, estratificados por el uso a baja dosis de aspirina (81 mg) basal y en el sitio clínico. Este estudio incluyó el análisis de datos de pacientes de un ensayo de prevención de adenoma de colon en fase III multicéntrico. Comparando el resultado en pacientes que recibieron placebos con los que recibieron intervención activa, (a) la recurrencia de uno o más adenomas fue de 41,1 % y 12,3 %; (b) el 8,5 % frente al 0,7 % tuvo uno o más adenomas avanzados; y (c) 17 (13,2 %) pacientes frente a 1 paciente tuvieron múltiples adenomas (> 1) en la colonoscopia final. Por lo tanto, los pólipos adenomatosos recurrentes pueden reducirse notablemente mediante una combinación de dosis orales bajas de DFMO y sulindaco. Los detalles de este estudio se discuten en Meyskens *et al.* (2008), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

A. Distribución del genotipo *ODC1*

Un total de 440 casos de cáncer colorrectal (CRC) identificados a partir del estudio gen-ambiente de CRC de Irvine de la UC se utilizaron en un análisis de casos solamente. La distribución del genotipo *ODC1* +316 entre todos los casos de CRC fue de 53 % GG, 41 % GA y 7 % AA. La distribución del genotipo *ODC* +316 fue similar entre los casos de CRC con y sin antecedentes familiares. No hubo diferencias significativas en la distribución del genotipo *ODC1* por edad, género, antecedentes familiares, lugar dentro del colorrecto, histología, o grado tumoral. La distribución del genotipo *ODC1* no difirió significativamente por etapa en el momento del diagnóstico: etapa I (49 % GG, 42 % GA, 8 % AA), etapa II (56 % GG, 38 % GA, 6 % AA), etapa III (51 % GG, 43 % GA, 6 % AA), etapa IV (59 % GG, 37 % GA, 4 % AA). La distribución del genotipo *ODC1* por etnia reveló diferencias significativas: Caucásico (382 casos: 53 % GG, 41 % GA, 6 % AA, frecuencia del alelo menor A = 26 %), Africano-Americano (7 casos: 71 % GG, 29 % GA, 0 % AA, frecuencia del alelo menor A = 15 %), Hispanos (21 casos: 57 % GG, 43 % GA, 0 % AA, frecuencia del alelo menor A = 21 %), y Asiáticos (27 casos: 33 % GG, 41 % GA, 26 % AA, frecuencia del alelo menor A = 46 %). Sin embargo, dentro de cada raza, la distribución del genotipo *ODC1* estaba en el equilibrio de Hardy-Weinberg.

B. Recurrencia de adenoma

La distribución del genotipo *ODC1* fue: 126 GG (55 %), 87 GA (38 %) y 15 AA (7 %). Se detectó una interacción estadísticamente significativa para el genotipo *ODC1* y el tratamiento en un modelo completo de recurrencia de adenoma, de manera que el patrón de recurrencia de adenoma entre los pacientes con placebo fue: GG 50 %, GA 35 %, AA 29 % frente a pacientes con eflornitina/sulindaco: GG 11 %, GA 14 %, AA 57 %. El genotipo *ODC1* no se asoció significativamente con una respuesta de putrescina tisular o con una respuesta de relación espermidina:espermina. No hubo asociaciones significativas entre el tratamiento y el grupo genotipo *ODC1* con respecto a los eventos adversos cardiovasculares o gastrointestinales.

El efecto inhibitorio de adenoma de eflornitina y sulindaco fue mayor entre aquellos con el genotipo *ODC1* homocigótico

G mayor, en contraste con informes anteriores que muestran un riesgo menor de adenoma recurrente entre los pacientes con CRA que recibieron aspirina y que portan al menos un alelo A (Martínez *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2006; Hubner *et al.*, 2008). La distribución del genotipo *ODC1* fue similar a la informada en ensayos previos basados en aspirina (Martínez *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2006; Hubner *et al.*, 2008) y el alelo A se asoció con un menor riesgo de adenoma recurrente no significativo en el grupo de placebo, consistente con los informes anteriores (Martínez *et al.*, 2003; Hubner *et al.*, 2008). Estos resultados demuestran que los portadores de alelos *ODC1* A difieren en respuesta a la exposición prolongada con eflornitina y sulindaco en comparación con los pacientes con genotipo GG, con portadores de alelos A que experimentan menos beneficios en términos de recurrencia de adenomas y el potencial de riesgo elevado de desarrollar ototoxicidad, especialmente entre los AA homocigotos.

C. Análisis de supervivencia

De los 440 casos de CRC, 138 (31 %) fallecieron en el momento del análisis. Sesenta y cuatro (46 %) muertes ocurrieron en casos que portaban el genotipo GG, en comparación con 74 (54 %) muertes en casos con los genotipos AA/AG. El análisis de supervivencia específico de CRC por etapa reveló que no se observaron diferencias de supervivencia significativamente diferentes para los CRC en etapa I, II o IV del AJCC. Sin embargo, entre los casos con CRC en etapa III, el genotipo *ODC1* GG se asoció con una supervivencia mejorada específica de CRC a 10 años. Entre los casos de cáncer de colon, se observó un beneficio de supervivencia específico de CRC estadísticamente significativo para aquellos con genotipo *ODC1* GG en comparación con *ODC1* GA/AA; esto no se observó en los casos de cáncer de recto.

Entre todos los casos de CRC, las estimaciones de supervivencia específicas de CRC basadas en el genotipo *ODC1* después del ajuste por edad (años), género, etnia, antecedentes familiares de CRC, etapa de TNM en el momento del diagnóstico, lugar del tumor en el colon, subtipo histológico, tratamiento con cirugía, radioterapia y quimioterapia fueron las siguientes: ODC GG relación de riesgos (HR) = 1,00 (referente), ODC GA HR = 1,73 y genotipo ODC AA HR = 1,73. Solo entre los casos de colon, el análisis de supervivencia específico de CRC reveló que el SNP +316 de *ODC1* fue un indicador independiente de la supervivencia específica de CRC, después del ajuste para las variables clínicas anteriores. Entre los casos de cáncer de recto, el análisis de supervivencia específica de CRC reveló que el SNP +316 de *ODC1* no fue un indicador independiente de la supervivencia específica de CRC después del ajuste para las variables clínicas mencionadas anteriormente.

Basándose en este análisis basado en la población de casos de cáncer colorrectal, el SNP +316 de *ODC1* se asoció con la supervivencia específica de cáncer colorrectal entre los casos de cáncer de colon. Se observó un mayor riesgo estadísticamente significativo de mortalidad específica de CRC con cada alelo *ODC1* A adicional entre los casos de cáncer de colon, es decir, de *ODC1* GG a GA a AA, después del ajuste por edad, género, etnia, etapa tumoral, antecedentes familiares de CRC, lugar del tumor, histología, tratamiento con cirugía, radioterapia o quimioterapia.

D. Regulación específica de alelo de factores de transcripción

En las células epiteliales de cáncer de colon, el SNP +316 de *ODC1* es funcionalmente significativo, como lo demuestra el aumento de la unión de los factores de transcripción E-box a los elementos promotores que contienen alelos A, en comparación con los 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 una regulación específica de alelo de la expresión de *ODC1* mediante factores de transcripción E-box. La actividad enzimática de la proteína ODC no se ve afectada por el genotipo SNP +316 de *ODC1*.

En células de colon, la expresión condicional de *APC* de tipo silvestre, un gen expresado en la mucosa de colon normal, suprime la expresión de c-MYC y aumenta la de *MAD1* (Fultz y Gerner, 2002). Además, El *APC* de tipo silvestre puede regular la actividad del promotor de *ODC1* de una manera dependiente del SNP +316 (Martínez *et al.*, 2003). El *APC* de tipo silvestre se expresa en la mucosa de colon aparentemente normal de los individuos que no padecen FAP, mientras que la mayoría de los adenomas de colon esporádicos muestran evidencia de *APC* mutado o eliminado (Iwamoto *et al.*, 2000). MYC se expresa en niveles bajos en la mucosa intestinal normal, pero aumenta en los adenomas intestinales de ratones *APC^{Min/+}*. La eliminación condicional de la expresión de MYC en el epitelio intestinal suprime la tumorigénesis intestinal en ratones *APC^{Min/+}* (Ignatenko *et al.*, 2006). El trabajo anterior (Martínez *et al.*, 2003; Hubner *et al.*, 2008) ha demostrado un papel protector para el alelo *ODC1* A, especialmente en consumidores de aspirina, contra la recurrencia de pólipos de colon en ensayos de prevención clínica. Sin embargo, en el estudio basado en la población, el alelo *ODC1* A se asoció con una escasa supervivencia. Esta aparente contradicción puede explicarse por la idea de que tanto los activadores como los represores de E-box se unen al alelo *ODC1* A de forma selectiva. La transición del epitelio normal, expresando los represores de E-box, al epitelio neoplásico, puede retardarse en individuos con alelos *ODC1* A. Este efecto puede ser el resultado de la supresión de la síntesis de poliaminas. Sin embargo, si el epitelio transformado comienza a expresar activadores de E-box (tal como c-MYC), entonces es más probable que ocurra la progresión del cáncer en individuos con el genotipo *ODC1* A. Los resultados para el riesgo de mortalidad específica de cáncer de colon son consistentes con aquellos que muestran que el riesgo de cáncer de próstata puede estar asociado con el alelo *ODC1* A entre individuos específicos como resultado de interacciones del entorno genético (O'Brien *et al.*, 2004; Viswanathan *et al.*, 2004). Tal progresión del cáncer de colon podría deberse a la síntesis potenciada de poliamina, como ya se ha demostrado para el cáncer de próstata (Simoneau *et al.*, 2008).

Este hallazgo de que un factor, como el SNP de *ODC1*, puede tener efectos tanto estimulantes como inhibidores en la carcinogénesis no es único. Por ejemplo, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) tiene diversos roles en la carcinogénesis y progresión del cáncer (Derynck et al., 2001; Pardali y Moustakas, 2007; Roberts y Wakefield, 2003). El TGF- β en células no transformadas inhibe la proliferación celular e induce apoptosis. Sin embargo, se sobreexpresa en todos los tumores humanos y se asocia con una progresión tardía del cáncer, específicamente con la invasión tumoral y la metástasis. Un único estudio que presentó la actividad de ODC en tumores colorrectales humanos demostró que los altos niveles de expresión de ODC se asociaron significativamente con una mejor supervivencia (Matsubara et al., 1995). Esto sugiere que, aunque la sobreexpresión de ODC promueve la formación de adenomas colorrectales humanos, es posible que en las lesiones establecidas, la sobreexpresión de ODC cause una proliferación potenciada y se asocie con una mejor respuesta a los tratamientos antiproliferativos. Sin embargo, ese estudio no incluyó la estratificación por genotipo de ODC, por lo que no se sabe si estos efectos son independientes del genotipo de ODC.

15 E. Sumario

En resumen, se detectó una interacción estadísticamente significativa para el genotipo *ODC1* y el tratamiento en el modelo completo de recurrencia de adenoma ($P = 0,021$), de modo que el patrón de recurrencia de adenoma entre los pacientes con placebo fue: GG 50 %, GA 35 %, AA 29 % frente a pacientes con eflornitina/sulindaco: GG 11 %, GA 14 %, AA 57 %. El efecto inhibitorio de adenoma de eflornitina y sulindaco fue mayor entre aquellos con el genotipo de *ODC1* homocigótico G mayor, en contraste con informes anteriores que muestran un riesgo menor de adenoma recurrente entre los pacientes con CRA que recibieron aspirina y que portan al menos un alelo A (Martínez et al., 2003 Barry et al., 2006; Hubner et al., 2008). Estos resultados demuestran que los portadores de alelos *ODC1* A difieren en respuesta a la exposición prolongada con eflornitina y sulindaco en comparación con los pacientes con genotipo GG, con portadores de alelos A que experimentan menos beneficios en términos de recurrencia de adenomas y el potencial de riesgo elevado de desarrollar ototoxicidad, especialmente entre los AA homocigotos. Los detalles de este estudio se discuten en la Patente de Estados Unidos N.º 8.329.636, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

30 IX. Análisis de marcadores

La presente invención describe, en un aspecto, la identificación de una serie de marcadores que son sustitutos de la expresión de poliaminas. De hecho, parecen ser efectores cadena abajo que están más vinculados al mecanismo patológico de las células cancerosas que incluso a las poliaminas en sí mismas. Por tanto, estos presentan la oportunidad de predecir con mayor precisión los sujetos que responderán a los medicamentos moduladores de la poliaminas y de evaluar y adaptar tales terapias en un enfoque de "tiempo real".

A. Familia de ARN no codificantes *Let-7*

40 El precursor de microARN *let-7* se identificó a partir de un estudio del tiempo de desarrollo en *C. elegans* y a continuación se demostró que formaba parte de una clase mucho mayor de ARN no codificantes denominados microARN. El precursor de microARN miR-98 humano es un miembro de la familia *let-7*. Los miARN *let-7* ahora han sido predichos o confirmados experimentalmente en una amplia gama de especies. Los miARN se transcriben inicialmente en transcritos largos (hasta varios cientos de nucleótidos) llamados miARN primarios (pri-miARN), que son procesados en el núcleo por Drosha y Pasha a estructuras de horquilla de aproximadamente ~ 70 nucleótidos. Estos precursores (pre-miARN) son exportados al citoplasma por exportin5, donde son procesados posteriormente por la enzima Dicer a un miARN maduro de ~ 22 nucleótidos. La participación de Dicer en el procesamiento de miARN demuestra una relación con el fenómeno de la interferencia de ARN.

50 En el genoma humano, el grupo *llet-7a-1/let-7f-1/let-7d* está dentro de la región B en 9q22.3, con el marcador determinante *D9S280-D9S1809*. Una región mínima de LOH (pérdida de heterocigosidad), entre los loci D11S1345-D11S1316, contiene el grupo *miR-125b1/let-7a-2/miR-100*. El grupo *miR-99a/let-7c/miR-125b-2* se encuentra en una región 21p11.1 de HD (deleciones homocigotas). El grupo *let-7 g/miR-135-1* se encuentra en la región 3 en 3p21.1 - p21.2.

55 El gen *lethal-7* (*let-7*) se descubrió por primera vez en el nematodo como un regulador clave del desarrollo y se convirtió en uno de los dos primeros microARN conocidos (el otro es *lin-4*). Pronto, *let-7* se encontró en moscas de la fruta y se identificó como el primer miARN humano conocido mediante una búsqueda BLAST (herramienta de búsqueda de alineamiento local básica). La forma madura de los miembros de la familia *let-7* está altamente conservada en todas las especies. En *C. elegans*, la familia *let-7* consiste en genes que codifican nueve miARN que comparten la misma secuencia de base. Entre ellos, *let-7*, *mir-84*, *mir-48* y *mir-241* están involucrados en la vía heterocrónica de *C. elegans*, controlando secuencialmente el tiempo de desarrollo de las transiciones larvarias. La mayoría de los animales con mutación de pérdida de función de *let-7* se rompen a través de sus vulvas y mueren, y por lo tanto el mutante es letal (*let*). Los mutantes de otros miembros de la familia *let-7* tienen un fenotipo radio resistente en las células de la vulva, que puede estar relacionado con su capacidad para reprimir RAS. Hay un solo gen único *let-7* en el genoma de *Drosophila*, que tiene una secuencia madura idéntica a la de *C. elegans*. El papel de *let-7* se ha demostrado en la

regulación del tiempo de formación de la unión neuromuscular en el abdomen y el ciclo celular en el ala. Además, la expresión de *let-7* pri, pre- y madura tiene el mismo patrón rítmico con el pulso hormonal antes de cada muda cuticular en *Drosophila*.

- 5 La familia *let-7* tiene muchos más miembros en vertebrados que en *C. elegans* y *Drosophila*. Y las secuencias, el tiempo de expresión, así como el agrupamiento genómico de estos miembros de miARN se conservan en todas las especies. El papel directo de la familia *let-7* en el desarrollo de vertebrados no se ha mostrado claramente como en organismos menos complejos, sin embargo, el patrón de expresión de la familia *let-7* es de hecho temporal durante los procesos de desarrollo. Dado que los niveles de expresión de los miembros de *let-7* son significativamente más
10 bajos en los cánceres humanos y en las células madre del cáncer, la función principal de los genes *let-7* puede ser promover la diferenciación terminal en el desarrollo y la supresión de tumores.

Aunque los niveles de los miembros de *let-7* maduros no son detectables en las células indiferenciadas, los transcritos primarios y los precursores de la horquilla de *let-7* están presentes en estas células, lo que indica que los miARN *let-7* maduros pueden regularse de manera postranscripcional.
15

Como uno de los cuatro genes involucrados en la reprogramación de células madre pluripotentes inducidas (iPS), la expresión de LIN28 es recíproca a la de *let-7* maduro. LIN28 se une selectivamente a las formas primarias y precursoras de *let-7* e inhibe el procesamiento de *pri-let-7* para formar el precursor de horquilla. Esta unión se ve
20 facilitada por la secuencia de bucle conservada de los miembros primarios de la familia *let-7* y los dominios de unión a ARN de las proteínas LIN28. Por otro lado, se ha demostrado que los miARN de *let-7* en mamíferos regulan LIN28, lo que implica que *let-7* podría mejorar su propio nivel al reprimir a LIN28, su regulador negativo.

La expresión de los miembros de *let-7* está controlada por la unión de MYC a sus promotores. Se ha informado que los niveles de *let-7* disminuyen en los modelos de tumorigénesis mediada por MYC y aumentan cuando MYC es
25 inhibido por sustancias químicas. Sin embargo, hay sitios de unión a *let-7* en MYC 3'UTR según análisis bioinformático y la sobreexpresión de *let-7* en cultivo celular disminuyó los niveles de ARNm de MYC. Por lo tanto, hay un bucle de retroalimentación doble negativa entre MYC y *let-7*. Además, *let-7* podría conducir al agotamiento de *IMP1* (proteína de unión al ARNm del factor II de crecimiento similar a insulina), que desestabiliza el ARNm de MYC, formando así
30 una vía reguladora indirecta.

Se ha demostrado que *let-7* es un regulador directo de la expresión de *RAS* en células humanas. Los tres genes *RAS* en humanos, *K-*, *N-* y *H-*, tienen las secuencias de unión *let-7* predichas en sus 3'UTR. En las muestras de pacientes con cáncer de pulmón, la expresión de *RAS* y *let-7* mostró un patrón recíproco, que tiene un bajo *let-7* y alto *RAS* en
35 células cancerosas, y un alto *let-7* y bajo *RAS* en células normales. Otro oncogén, el grupo A2 de alta movilidad (*HMGGA2*), también se ha identificado como una diana de *let-7*. *Let-7* inhibe directamente *HMGGA2* al unirse a su 3'UTR. La eliminación del sitio de unión de *let-7* mediante la eliminación del 3'UTR causó la sobreexpresión de *HMGGA2* y la formación de tumores. *MYC* también se considera una diana oncogénica de *let-7*.

Los análisis de micromatrices revelaron muchos genes que regulan el ciclo celular y la proliferación celular que responden a la alteración de los niveles de *let-7*, incluidos la ciclina A2, *CDC34*, las quinasas Aurora A y B (*STK6* y
40 *STK12*), *E2F5* y *CDK8*, entre otros. Experimentos posteriores confirmaron los efectos directos de algunos de estos genes, tales como *CDC25A* y *CDK6*. *Let-7* también inhibe varios componentes de la maquinaria de replicación del ADN, factores de transcripción, incluso algunos genes supresores de tumores y reguladores de puntos de control. La apoptosis también está regulada por *let-7*, a través de la modulación de *Casp3*, *Bcl2*, *Map3kl* y *Cdk5*.
45

Let-7 ha sido implicado en el control post-transcripcional de respuestas inmunitarias innatas a agentes patógenos. Los macrófagos estimulados con bacterias vivas o componentes microbianos purificados regulan a la baja la expresión de
50 varios miembros de la familia de miARN *let-7* para disminuir la represión de las citoquinas inmuno-moduladoras IL-6 e IL-10. *Let-7* también se ha implicado en la regulación negativa de TLR4, el principal receptor inmunitario de lipopolisacárido microbiano y la regulación negativa de *let-7*, tanto en la infección por microbios como por protozoos, podría elevar la señalización y la expresión de TLR4.

Además, se ha informado que *let-7* regula la producción de citoquina IL-13 por los linfocitos T durante la inflamación alérgica de las vías respiratorias, lo que también vincula este miARN con la inmunidad adaptativa. Se cree que la modulación a la baja del regulador negativo de *let-7* Lin28b en linfocitos T humanos ocurre durante el desarrollo temprano del neonato para reprogramar el sistema inmunitario hacia la defensa. Dado el fenotipo predominante de la hiperproliferación celular y la indiferenciación por la pérdida de función de *let-7* en los nematodos, y el papel de sus
55 dianas en la determinación del destino celular, *let-7* está estrechamente asociado con el cáncer humano y actúa como un supresor de tumores.
60

Numerosos informes han demostrado que los niveles de expresión de *let-7* son frecuentemente bajos y que los grupos cromosómicos de *let-7* a menudo se eliminan en muchos tipos de cáncer. *Let-7* se expresa en niveles más altos en tumores más diferenciados, que también tienen niveles más bajos de oncogenes activados tales como *RAS* y *HMGGA2*.
65 Por lo tanto, los niveles de expresión de *let-7* podrían ser marcadores pronósticos en varios cánceres asociados con etapas de diferenciación. En cáncer de pulmón, por ejemplo, la expresión reducida de *let-7* se correlaciona

significativamente con la supervivencia postoperatoria reducida.

Let-7 también es un agente terapéutico potencial muy atractivo que puede prevenir la tumorigénesis y la angiogénesis, normalmente en los cánceres que subexpresan *let-7*. El cáncer de pulmón, por ejemplo, tiene varias mutaciones oncogénicas clave incluidas p53, RAS y MYC, parte de las cuales pueden correlacionarse directamente con la expresión reducida de *let-7*, y pueden reprimirse mediante la introducción de *let-7*. La administración intranasal de *let-7* ya se ha encontrado eficaz para reducir el crecimiento de tumores en un modelo de ratón transgénico de cáncer de pulmón. La restauración similar de *let-7* también demostró que inhibe la proliferación celular en los cánceres de mama, colon y hígado, linfoma y leiomioma uterino.

De acuerdo con la presente invención, los niveles reducidos de *let-7* indican una desregulación de las poliaminas, y por lo tanto son un indicador de que la inhibición de la síntesis de poliaminas puede ser eficaz. Los niveles bajos también pueden indicar que la dosis del inhibidor es demasiado baja para el efecto terapéutico, mientras que un aumento en *let-7* en comparación con una medición previa indica que una terapia es eficaz.

En los Ejemplos a continuación, se demostró que varios ARN no codificantes se alteraron a través del agotamiento de poliaminas. En algunas realizaciones, la familia *let-7* sirvió como una diana atractiva para mediar en los nodos de señalización involucrados en la tumorigénesis. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento pueden usarse para tratar enfermedades que presentan *let-7* desregulado, por ejemplo, no solo carcinoma colorrectal, sino también neuroblastoma. Véase Buechner *et al.*, 2011, que se incorpora en el presente documento por referencia. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento son terapias inhibitoras de poliaminas que pueden usarse para tratar neuroblastoma. Véase Hogarty *et al.*, 2008, que se incorpora en el presente documento por referencia.

B. LIN28

El homólogo A de LIN28 es una proteína que en los humanos está codificada por el gen *LIN28*. LIN28 codifica una proteína de unión a miARN que se une y mejora la traducción del mRNA de IGF-2 (factor 2 de crecimiento similar a la insulina). LIN28 también se ha demostrado que se une a pre-miARN *let-7* y bloquea la producción de miARN *let-7* maduro en células madre embrionarias de ratón.

LIN28 es un marcador de células madre embrionarias humanas no diferenciadas y se ha utilizado para mejorar la eficacia de la formación de células madre pluripotentes inducidas (iPS) a partir de fibroblastos humanos. Las estructuras cristalográficas de los complejos LIN28 *let-7* revelan que dos dominios plegados de LIN28 reconocen dos regiones distintas del ARN. Los dominios son suficientes para la inhibición de *let-7* in vivo.

De acuerdo con la presente invención, los niveles aumentados de LIN28 indican una desregulación de las poliaminas y, por lo tanto, son un indicador de que la inhibición de la síntesis de poliaminas puede ser eficaz. Los niveles altos también pueden indicar que la dosis del inhibidor es demasiado baja para el efecto terapéutico, mientras que una disminución en LIN28 en comparación con una medición previa indica que una terapia es eficaz.

C. HMGA2

El grupo de alta movilidad AT-hook 2, también conocida como HMGA2, es una proteína que, en humanos, está codificada por el gen *HMGA2*. Este gen codifica una proteína que pertenece a la familia de proteínas no histónicas del grupo de alta movilidad cromosómica (HMG). Las proteínas HMG funcionan como factores arquitectónicos y son componentes esenciales del enhanceosoma. Esta proteína contiene dominios estructurales de unión al ADN y puede actuar como un factor regulador de la transcripción. La identificación de la delección, amplificación y reordenamiento de este gen que están asociados con los lipomas sugiere un papel en la adipogénesis y la diferenciación mesenquimatosas. Un estudio de supresión del gen homólogo de ratón demostró que este gen está involucrado en la obesidad inducida por la dieta. Se han caracterizado variantes de empalme transcripcional alternativas, que codifican diferentes isoformas.

La expresión de HMGA2 en tejidos adultos se asocia generalmente con la formación de tumores tanto malignos como benignos, así como con ciertas mutaciones características que promueven el cáncer. Las proteínas homólogas con secuencias altamente conservadas se encuentran en otras especies de mamíferos, incluidos los ratones de laboratorio (*Mus musculus*).

HMGA2 contiene tres dominios básicos de unión al ADN (AT-hooks) que hacen que la proteína se una a las regiones ricas en adenina-timina (AT) del ADN nuclear. HMGA2 no promueve ni inhibe directamente la transcripción de ningún gen, sino que altera la estructura del ADN y promueve el ensamblaje de complejos de proteínas que regulan la transcripción de los genes. Con pocas excepciones, HMGA2 se expresa en seres humanos solo durante el desarrollo temprano y se reduce a niveles de transcripción indetectables o casi indetectables en tejidos adultos. El miARN *let-7* es en gran parte responsable de esta regulación dependiente del tiempo de HMGA2. La función aparente de HMGA2 en la proliferación y diferenciación de las células durante el desarrollo está respaldada por la observación de que los ratones con genes *HMGA2* mutantes son inusualmente pequeños (fenotipo pigmeo) y los estudios de asociación de

todo el genoma relacionan los SNP asociados a HMGA2 con la variación en la altura de los seres humanos.

Let-7 inhibe la producción de proteínas específicas mediante la unión complementaria a sus transcritos de ARNm. El transcrito de ARNm maduro de HMGA2 contiene siete regiones complementarias o casi complementarias a *let-7* en su 3' UTR. La expresión de *let-7* es muy baja durante el desarrollo humano temprano, lo que coincide con la mayor transcripción de HMGA2. La caída dependiente del tiempo en la expresión HMGA2 es causada por un aumento en la expresión *let-7*.

La expresión aumentada de HMGA2 se encuentra en varios cánceres humanos, pero se desconoce el mecanismo preciso mediante el cual HMGA2 contribuye a la formación de cáncer. Las mismas mutaciones que conducen a adenomas pituitarios en ratones se pueden encontrar en cánceres similares en humanos. Su presencia se asocia con un mal pronóstico para el paciente, pero también con la sensibilización de las células cancerosas a ciertas formas de terapia contra el cáncer. Específicamente, los cánceres con elevada HMGA2 muestran una respuesta anormalmente fuerte a las roturas de doble cadena en el ADN causada por la radioterapia y algunas formas de quimioterapia. La adición artificial de HMGA2 a algunas formas de cáncer que no responden al daño en el ADN hace que, en cambio, respondan al tratamiento, aunque tampoco se conoce el mecanismo por el cual se produce este fenómeno. Sin embargo, la expresión de HMGA2 también se asocia con tasas aumentadas de metástasis en el cáncer de mama, y tanto la metástasis como recurrencia del carcinoma de células escamosas. Estas propiedades son responsables de los malos pronósticos de los pacientes. Al igual que con los efectos de HMGA2 en la respuesta a la radiación y la quimioterapia, se desconoce el mecanismo por el cual HMGA2 ejerce estos efectos.

Un hallazgo muy común en los cánceres con HMGA2 alto es la subexpresión de *let-7*. Esto no es inesperado, dado el papel natural de *let-7* en la regulación de HMGA2. Sin embargo, muchos tipos de cáncer se encuentran con niveles normales de *let-7* que también son altos en HMGA2. Muchos de estos cánceres expresan la proteína HMGA2 normal, pero la transcripción del ARNm maduro se trunca, faltando una parte de la 3' UTR que contiene las regiones complementarias críticas de *let-7*. Sin estas, *let-7* no puede unirse al ARNm de HMGA2 y, por lo tanto, no puede reprimirlo. Los ARNm truncados pueden surgir de una translocación cromosómica que dé como resultado la pérdida de una porción del gen *HMGA2*.

Se ha demostrado que HMGA2 interactúa con PIAS3 y NFKB1. El transporte de HMGA2 al núcleo está mediado por una interacción entre su segundo AT-hook e importina- α 2.

De acuerdo con la presente invención, los niveles elevados de HMGA2 indican una desregulación de poliaminas y, por lo tanto, son un indicador de que la inhibición de la síntesis de poliaminas puede ser efectiva. Los niveles altos también pueden indicar que la dosis del inhibidor es demasiado baja para el efecto terapéutico, mientras que una disminución en HMGA2 en comparación con una medición previa indica que una terapia es eficaz.

D. Detección de ácido nucleico

La evaluación de la expresión de un ácido nucleico puede implicar la cuantificación de ARN. Las técnicas de transferencia de Northern son bien conocidas por los expertos en la materia. La transferencia Northern implica el uso de ARN como diana. En resumen, se usa una sonda para marcar una especie de ARN que se ha inmovilizado en una matriz adecuada (por ejemplo, nitrocelulosa). Las diferentes especies deben estar separadas espacialmente para facilitar el análisis. Esto a menudo se logra mediante electroforesis en gel de especies de ácido nucleico seguido de "transferencia" en la matriz.

Posteriormente, la diana transferida se incuba con una sonda (normalmente etiquetada) en condiciones que promueven la desnaturalización y la rehibridación. Debido a que la sonda está diseñada para un par de bases con la diana, la sonda se unirá a una parte de la secuencia diana en condiciones de renaturalización. La sonda no ligada se elimina y se lleva a cabo la detección.

Los ácidos nucleicos pueden cuantificarse después de la separación del gel y la tinción con bromuro de etidio y la visualización con luz UV. Como alternativa, si el ácido nucleico resulta de una síntesis o amplificación utilizando nucleótidos integrales marcados radio o fluorométricamente, los productos pueden a continuación exponerse a una película de rayos X o visualizarse en los espectros estimulantes apropiados, después de la separación.

En una realización, la visualización se logra de forma indirecta. Tras la separación de los ácidos nucleicos, un ácido nucleico marcado se pone en contacto con la secuencia diana. La sonda se conjuga con un cromóforo o un radiomarcador. En otra realización, la sonda se conjuga con un compañero de unión, como un anticuerpo o biotina, y el otro miembro del par de unión lleva un resto detectable.

Un ejemplo de lo anterior se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.279.721, que se ha incorporado por referencia al presente documento, que desvela un aparato y un método para la electroforesis y transferencia automatizada de ácidos nucleicos. El aparato permite la electroforesis y la transferencia sin la manipulación externa del gel y es idealmente adecuada para llevar a cabo los métodos de acuerdo con la presente invención.

Además, los productos de amplificación descritos anteriormente pueden someterse a análisis de secuencia para identificar tipos específicos de variaciones utilizando técnicas de análisis de secuencia convencionales. Dentro de ciertos métodos, el análisis exhaustivo de los genes se lleva a cabo mediante análisis de secuencia utilizando conjuntos de cebadores diseñados para una secuenciación óptima (Pignon et al., 1994). La presente invención proporciona métodos mediante los cuales se puede usar cualquiera o todos estos tipos de análisis. Usando las secuencias divulgadas en el presente documento, los cebadores oligonucleotídicos pueden diseñarse para permitir la amplificación de secuencias de interés.

Se puede usar la transcripción inversa (RT) de ARN a ADNc seguida de PCR cuantitativa relativa (RT-PCR) para determinar las concentraciones relativas de especies de ARNm específicas aisladas de los pacientes. Al determinar que la concentración de una especie de ARNm específica varía, se muestra que el gen que codifica las especies de ARN específicas se expresa de manera diferencial. En la PCR, el número de moléculas del ADN diana amplificado aumenta en un factor que se aproxima a dos con cada ciclo de la reacción hasta que algún reactivo se vuelve limitante. Posteriormente, la velocidad de amplificación disminuye cada vez más hasta que no hay un aumento en la diana amplificada entre ciclos. Si se traza un gráfico en el que el número de ciclo está en el eje X y el log de la concentración del ADN diana amplificado está en el eje Y, se forma una línea curva de forma característica al conectar los puntos trazados. Comenzando con el primer ciclo, la pendiente de la línea es positiva y constante. Se dice que es la porción lineal de la curva. Después de que un reactivo se vuelve limitante, la pendiente de la línea comienza a disminuir y, finalmente, se vuelve cero. En este punto, la concentración del ADN diana amplificado se vuelve asintótica a algún valor fijo. Se dice que es la porción de meseta de la curva.

La concentración del ADN objetivo en la porción lineal de la amplificación por PCR es directamente proporcional a la concentración inicial de la diana antes de que comience la reacción. Al determinar la concentración de los productos amplificados del ADN diana en las reacciones de PCR que han completado el mismo número de ciclos y están en sus rangos lineales, es posible determinar las concentraciones relativas de la secuencia diana específica en la mezcla de ADN original. Si las mezclas de ADN son ADNc sintetizados a partir de ARN aislados de diferentes tejidos o células, se pueden determinar las abundancias relativas del ARNm específico del cual se derivó la secuencia diana para los tejidos o células respectivos. Esta proporcionalidad directa entre la concentración de los productos de la PCR y las abundancias relativas de ARNm solo es cierta en el rango lineal de la reacción de la PCR.

La concentración final del ADN diana en la porción de meseta de la curva se determina por la disponibilidad de reactivos en la mezcla de reacción y es independiente de la concentración original del ADN diana. Por lo tanto, la primera condición que debe cumplirse antes de que se pueda determinar las abundancias relativas de las especies de ARNm mediante RT-PCR para una colección de poblaciones de ARN es que las concentraciones de los productos de PCR amplificados deben muestrearse cuando las reacciones de PCR se encuentran en la parte lineal de sus curvas.

La segunda condición que debe cumplirse para que un experimento de RT-PCR determine con éxito las abundancias relativas de una especie de ARNm particular es que las concentraciones relativas de los ADNc amplificables deben normalizarse a algún patrón independiente. El objetivo de un experimento de RT-PCR es determinar la abundancia de una especie de ARNm particular en relación con la abundancia promedio de todas las especies de ARNm en la muestra, la β -actina, la asparagina sintetasa y la lipocortina II son ejemplos de ARNm que se pueden usar como patrones externos e internos con los que se compara la abundancia relativa de otros ARNm.

La mayoría de los protocolos para PCR competitiva utilizan patrones internos de PCR que son aproximadamente tan abundantes como la diana. Estas estrategias son eficaces si los productos de las amplificaciones de PCR se muestrean durante sus fases lineales. Si los productos se muestrean cuando las reacciones se acercan a la fase de meseta, entonces el producto menos abundante se vuelve relativamente sobre representado. Las comparaciones de abundancias relativas realizadas para muchas muestras de ARN diferentes, como es el caso cuando se examinan muestras de ARN en busca de expresión diferencial, se distorsionan de tal manera que las diferencias en las abundancias relativas de ARN aparecen menos de lo que realmente son. Este no es un problema importante si el patrón interno es mucho más abundante que la diana. Si el patrón interno es más abundante que la diana, entonces se pueden hacer comparaciones lineales directas entre muestras de ARN.

E. Detección de proteínas

Los anticuerpos pueden usarse para caracterizar la expresión de proteínas en células, a través de técnicas, como ELISA y transferencia de Western. Por ejemplo, los anticuerpos pueden inmovilizarse sobre una superficie seleccionada, tal como una superficie que muestra una afinidad proteica tal como los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno. Después de lavar para eliminar el material adsorbido de forma incompleta, es deseable unir o recubrir los pocillos de la placa de ensayo con una proteína no específica que se sabe que es antigénicamente neutra con respecto a los antiseros de prueba tales como albúmina de suero bovino (BSA), caseína o soluciones de leche en polvo. Esto permite el bloqueo de sitios de adsorción no específicos en la superficie de inmovilización y, por lo tanto, reduce el fondo causado por la unión no específica del antígeno a la superficie.

Después de unir el anticuerpo al pocillo, recubrir con un material no reactivo para reducir el fondo y lavar para eliminar el material no unido, la superficie de inmovilización se pone en contacto con la muestra que se va a analizar de manera

propicia para la formación del complejo inmunitario (antígeno/anticuerpo).

Después de la formación de inmunocomplejos específicos entre la muestra de prueba y el anticuerpo unido, y el lavado posterior, la aparición e incluso la cantidad de formación de inmunocomplejos se puede determinar sometiendo a los mismos a un segundo anticuerpo que tenga especificidad por la diana que difiere del primer anticuerpo. Las condiciones apropiadas incluyen diluir la muestra con diluyentes tales como BSA, globulina gamma bovina (BGG) y solución salina tamponada con fosfato (PBS)/Tween. Estos agentes agregados también tienden a ayudar en la reducción del fondo no específico. Los antisueros estratificados se dejan incubar durante aproximadamente 2-4 h, a temperaturas del orden de aproximadamente 25-27°C. Después de la incubación, la superficie en contacto con los antisueros se lava para eliminar el material no inmunocomplejado. Un procedimiento de lavado particular incluye el lavado con una solución tal como PBS/Tween o tampón borato.

Para proporcionar un medio de detección, el segundo anticuerpo puede tener una enzima asociada que generará un desarrollo de color al incubar con un sustrato cromogénico apropiado. Por lo tanto, por ejemplo, se deseará poner en contacto e incubar la segunda superficie unida al anticuerpo con una ureasa o IgG antihumana conjugada con peroxidasa durante un período de tiempo y en condiciones que favorezcan el desarrollo de la formación de inmunocomplejos (por ejemplo, incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución que contiene PBS tal como PBS/Tween).

Después de la incubación con el segundo anticuerpo etiquetado con enzimas, y posteriormente al lavado para eliminar el material no unido, la cantidad de marcador se cuantifica mediante incubación con un sustrato cromogénico como urea y bromocresol púrpura o ácido 2,2'-azino-di-(3-etil- benzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) y H₂O₂, en el caso de la peroxidasa como marcador enzimático. A continuación se logra la cuantificación midiendo el grado de generación de color, por ejemplo, utilizando un espectrofotómetro de espectro visible.

El formato anterior puede alterarse uniendo primero la muestra a la placa de ensayo. Después, el anticuerpo primario se incuba con la placa de ensayo, seguido de la detección del anticuerpo primario unido utilizando un segundo anticuerpo marcado con especificidad para el anticuerpo primario.

Las composiciones de anticuerpos de la presente invención también encontrarán uso en análisis de inmunotransferencia o transferencia Western. Los anticuerpos pueden usarse como reactivos primarios de alta afinidad para la identificación de proteínas inmovilizadas en una matriz de soporte sólido, tales como nitrocelulosa, nailon o combinaciones de las mismas. Junto con la inmunoprecipitación, seguida de electroforesis en gel, estos pueden usarse como un reactivo de un único paso para usar en la detección de antígenos contra los cuales los reactivos secundarios utilizados en la detección del antígeno causan un fondo adverso. Los métodos de detección de base inmunológica para su uso junto con transferencia de Western que incluyen anticuerpos secundarios marcados enzimáticamente, radiomarcados o marcados con fluorescencia contra el resto de toxina se consideran de uso particular a este respecto.

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden usar junto con bloques de tejido embebidos en parafina, tanto frescos congelados como, o, fijados a formalina, preparados para su estudio por inmunohistoquímica (IHC). El método de preparación de bloques de tejido a partir de estas muestras de partículas se ha utilizado con éxito en estudios previos de IHC de diversos factores pronósticos y/o es bien conocido por los expertos en la materia (Brown et al, 1990; Abbondanzo *et al.*, 1999; Allred et al., 1990).

También se contempla en la presente invención el uso de inmunohistoquímica. Este enfoque utiliza anticuerpos para detectar y cuantificar antígenos en muestras de tejido intacto. En general, las secciones congeladas se preparan mediante la rehidratación de tejido "pulverizado" congelado a temperatura ambiente en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en pequeñas cápsulas de plástico; granulando las partículas por centrifugación; resuspendiéndolas en un medio de inclusión viscoso (OCT); invirtiendo la cápsula y se granulando nuevamente por centrifugación; y congelando de forma instantánea en isopentano a -70°C; cortando la cápsula de plástico y retirando el cilindro de tejido congelado; asegurando el cilindro de tejido en una pinza de micrótopo de criostato; y cortando 25-50 secciones en serie.

Las secciones permanentes se pueden preparar por un método similar que implica la rehidratación de la muestra de 50 mg en un tubo de plástico de microcentrífuga; granulando; resuspendiendo en formalina al 10 % durante 4 h de fijación; lavando/granulando; resuspendiendo en agar cálido al 2,5 %; granulando; enfriando en agua helada para endurecer el agar; retirando del tejido/bloque de agar del tubo; infiltrando y/o incrustando el bloque en parafina; y cortando hasta 50 secciones permanentes en serie.

Con respecto a los métodos de inmunohistoquímica, en algunas realizaciones, las secciones de muestras de tejido incluidas en parafina (FFPE) fijadas con formalina se colocan en portaobjetos cargados positivamente (por ejemplo, portaobjetos X-tra, Surgipath Inc. Richmond IL). En algunas realizaciones, las secciones pueden desparafinarizarse, por ejemplo, con un sustituto de xileno (por ejemplo, Clear -Rite 3 Cardinal Health, Dublin OH). En algunas realizaciones, las secciones se rehidratan, a continuación, por ejemplo, a través de concentraciones decrecientes de 90:5:5 de alcohol etílico:metílico:isopropílico. Los anticuerpos que pueden usarse incluyen: HMGA2 (Cell Signaling,

n.º 8179), LIN28 (Abcam, n.º 46020), y eIF5A (Epitomics, n.º S2096). En algunas realizaciones, las reacciones de inmunoperoxidasa se pueden realizar utilizando un inmunotransmisor automático (por ejemplo, Ventana BenchMark Ultra, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). En algunas realizaciones, pueden realizarse otras reacciones en un Dako® Autostainer Plus o en un Ventana® BenchMark. Para las muestras teñidas con el Autostainer Dako®, el tratamiento previo se realiza con la solución de recuperación diana Dako®, pH 6 (Dako, Inc.) en una olla a presión durante 5 minutos. Para las muestras teñidas con la Ventana® BenchMark, entre los pasos automatizados se incluye el tratamiento previo automático con Solución de Acondicionamiento Celular 2, un tampón de recuperación de antígeno tamponado con citrato de pH 6. Para ambos, los pasos automatizados pueden incluir el bloqueo de la peroxidasa endógena, la reacción con el anticuerpo primario, la reacción con el anticuerpo secundario y el enlace con la peroxidasa. En algunas realizaciones, el cromógeno puede ser diaminobencidina. En algunas realizaciones, los controles negativos pueden realizarse de la misma manera, excepto que el anticuerpo primario puede estar sustituido con una inmunoglobulina no específica (por ejemplo, ratón).

F. Predicción de respuesta a la terapia de inhibición de poliaminas

Teniendo en cuenta cualquiera o todos los marcadores tratados anteriormente, un médico puede predecir aquellos sujetos que pueden responder favorablemente a una terapia basada en la inhibición de la síntesis de poliaminas. A este respecto, el médico puede optar por comparar los niveles de marcadores en el sujeto con uno o más patrones diferentes, que son niveles en sangre o células normales (del paciente o un sujeto diferente), en sangre o células cancerosas que se ha demostrado que responden o que no responden a los inhibidores de la síntesis de poliaminas o niveles preestablecidos que tengan en cuenta cualquiera o todos los anteriores.

G. Ajuste de la terapia de inhibición de poliaminas

Otra aplicación de la presente invención implica el uso de niveles de marcadores durante el curso de una terapia para (a) determinar si un sujeto está respondiendo a una terapia con inhibidores de poliaminas, o (b) ajustar la dosis de una terapia para aumentar la respuesta. A este respecto, el médico puede optar por comparar los niveles de marcadores en el sujeto con uno o más patrones diferentes, que son niveles en sangre o células normales (del paciente o un sujeto diferente), en sangre o células cancerosas del sujeto o un paciente antes de la terapia que se ha demostrado que responden o que no responden a los inhibidores de la síntesis de poliaminas o niveles preestablecidos que tengan en cuenta cualquiera o todos los anteriores.

X. Formulaciones farmacéuticas y vías de administración

Los compuestos terapéuticos de la presente divulgación se pueden administrar mediante diversos métodos, por ejemplo, oralmente o mediante inyección (p.ej., subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, *etc.*). Dependiendo de la vía de administración, los compuestos activos se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y de otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. También pueden administrarse por perfusión/infusión continua de una enfermedad o sitio de la herida.

Para administrar el compuesto terapéutico por una vía distinta a la administración parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto o administrarlo conjuntamente con, un material para impedir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto terapéutico se puede administrar a un paciente en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas y soluciones acuosas tamponadas. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan et al., 1984).

El compuesto terapéutico también puede administrarse por vía parenteral, intraperitoneal, intraespinal o intracerebral. Se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (en los casos donde sean hidrosolubles) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que pueda inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (tales como, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede lograrse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o polialcoholes tales como manitol y sorbitol, en la composición. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto terapéutico en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtrado. En general, las dispersiones se preparan mediante la
5 incorporación del compuesto terapéutico en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización, lo que proporciona un polvo del principio activo (es decir, el compuesto terapéutico) más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución esterilizada por filtración de los mismos.

10 EL compuesto terapéutico puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un transportador comestible asimilable. El compuesto terapéutico y otros ingredientes también puede atraparse en una cápsula de gelatina de vaina dura o blanda, compactarse formando comprimidos o incorporarse directamente a la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica por vía oral, el compuesto terapéutico puede incorporarse con excipientes y usarse
15 en la 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 de compuesto terapéutico en tales composiciones terapéuticamente útil es tal que se obtendrá una dosificación adecuada.

20 Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto terapéutico calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosis unitaria
25 de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto terapéutico y del efecto terapéutico concreto que se vaya a lograr y de (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formar compuestos de dicho compuesto terapéutico para el tratamiento de una afección seleccionada en un paciente.

30 El compuesto terapéutico también puede administrarse por vía tópica a la piel, ojos o mucosa. Como alternativa, Si se desea un suministro local a los pulmones, el compuesto terapéutico puede administrarse por inhalación en una formulación en polvo seco o en aerosol.

35 Los compuestos activos se administran en una dosis terapéuticamente eficaz suficiente para tratar un síntoma asociado con una afección en un paciente. Por ejemplo, la eficacia de un compuesto se puede evaluar en un sistema modelo animal que puede ser predictivo de la eficacia en el tratamiento de la enfermedad en humanos, como los sistemas modelo que se muestran en los ejemplos y dibujos.

40 La cantidad de dosificación real 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 la edad, el sexo, el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, las intervenciones terapéuticas anteriores o concurrentes, la idiopatía del sujeto y la vía de administración. Estos factores pueden ser determinados por un experto en la materia. El facultativo responsable de la administración determinará la concentración de principio activo (o principios activos) en una composición y la(s) dosis adecuada(s)
45 para el sujeto individual. La dosis puede ser ajustada por el cada médico 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 diarias, durante uno o varios días (dependiendo, por supuesto, del modo de administración y los factores mencionados 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.

55 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 dosis unitaria puede ser una cantidad que reduce la glucosa en sangre en al menos un 40 % en comparación con un sujeto no tratado.

60 En otra realización, la dosis unitaria es una cantidad que reduce la glucosa en sangre a un nivel que es de ± 10 % del nivel de glucosa en sangre de un sujeto no diabético.

65 En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg/peso corporal,

aproximadamente 200 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/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 de peso corporal o más por administración y cualquier intervalo que pueda derivarse a partir de los mismos. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números listados en el presente documento, pueden administrarse un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, etc., basándose en los números descritos anteriormente.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación también comprende, 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 derivado de la misma.

Se contemplan dosis únicas o múltiples de los agentes. Los intervalos de tiempo deseados para la administración de dosis múltiples se pueden determinar por un experto en la materia que no emplee más que la experimentación rutinaria. Como ejemplo, a los sujetos se les pueden administrar dos dosis diarias a intervalos de aproximadamente 12 h. En algunas realizaciones, el agente se administra una vez al día.

El(los) agente(s) se puede(n) administrar en un programa de rutina. Como se usa en el presente documento, un programa de rutina se refiere a un período de tiempo designado predeterminado. El programa de rutina puede abarcar períodos de tiempo idénticos o que difieran en longitud, siempre que el horario esté predeterminado. Por ejemplo, el programa de rutina puede implicar la 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 un número determinado de días o semanas entre ellos. Como alternativa, el programa de rutina predeterminado puede incluir la administración dos veces al día durante la primera semana, seguido de una frecuencia diaria durante varios meses, etc. En otras realizaciones, la invención establece que el agente o los agentes pueden tomarse por vía oral y cuyo momento depende o no de la ingesta de alimentos.etc. Por lo tanto, por ejemplo, el agente puede tomarse todas las mañanas y o todas las noches, independientemente de cuándo el sujeto haya comido o vaya a comer.

XI. Terapia de combinación

La terapia de combinación efectiva se puede lograr con una composición única o una formulación farmacológica que incluya ambos agentes, o con dos composiciones o formulaciones distintas, administradas al mismo tiempo, en donde una composición incluye un compuesto de esta invención, y la otra incluye el(los) segundo(s) agente(s). Como alternativa, la terapia puede preceder o seguir el tratamiento del otro agente por intervalos que van desde minutos a meses.

Se pueden emplear diversas combinaciones, tal como donde "A" representa el primer agente (por ejemplo, DFMO) y "B" representa un agente secundario (por ejemplo, sulindaco), cuyos ejemplos no limitativos 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
 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

XII. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas divulgadas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por el inventor para que funcionen bien en la práctica de la invención, y por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y aún así obtener un resultado similar o parecido sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

Materiales y métodos

Resumen de métodos. Las células HCT116 se cultivaron en medios DMEM suplementados con suero bovino fetal al 10 % y se cultivaron a 37 °C. Para la transcripción inversa, se extrajo el ARN total utilizando el kit de aislamiento de ARN mirVana y la transcripción inversa se realizó utilizando ensayos de ARN pequeño de Taqman con un cebador prediseñado específico para *let-7* maduro (Applied Biosystems). Para la micromatriz, se extrajo el ARN total de cuatro

- réplicas de células HCT116 tratadas y no tratadas con DFMO cada una después de 96 h de incubación y se envió a Asuragen Inc. para su procesamiento. Las transferencias Western se realizaron utilizando anti-HMGA2 (Cell Signaling), LIN28 (abcam), anti-V5 (Invitrogen), eIF5A1 (Epitomics) y Actina (Sigma). Los oligos antisentido de ácido nucleico bloqueado (LNA) se adquirieron de Exiqon y se dirigieron contra la región de base de *let-7* como se describe anteriormente (Obad et al., 2011). Los ARNip Silencer Select prediseñados (Invitrogen) se obtuvieron específicamente para eliminar las isoformas eIF5A. Todas las transfecciones se realizaron con Lipofectamine 2000 como lo describe el fabricante hasta por 48 h. Todas las barras muestran la media \pm s.d y se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba t de Student (* P <0,05; **P < 0,01, *** P < 0,001).
- 5
- 10 **Cultivo de tejidos y vectores.** Las células HCT116 se mantuvieron en medios DMEM suplementados con FBS al 5 % sin antibióticos. El eIF5A2 de longitud completa se clonó en el vector pcDNA6/V5 His (Invitrogen). Las células HCT116 transfectadas de manera estable que sobreexpresan eIF5A2-V5-His se generaron y se mantuvieron en DMEM que contenía suero en presencia de blasticidina.
- 15 **Mediciones del contenido de poliaminas intracelulares.** Las células se homogeneizaron en HClO₄ 0,2 N. Se utilizaron fracciones solubles en ácido e insolubles en ácido para determinar el contenido de proteínas y poliaminas intracelulares, respectivamente. La fracción soluble en ácido que contenía poliaminas se separó usando HPLC de par iónico de fase inversa como se describe anteriormente (Simoneau et al., 2008).
- 20 **Proliferación celular.** Las células HCT116 se sembraron en placas de 6 pocillos o placas de 100 mm y se trataron con o sin diversas concentraciones de putrescina y DFMO. Para los datos mostrados, las células se trataron con putrescina 50 μ M y DFMO 5 mM. En cada punto temporal, las células se tripsinizaron con 500 μ l de tripsina y se resuspendieron con 1,5 ml de DMEM suplementado con FBS. A continuación se cargó un mililitro de la resuspensión y se analizó con un contador Beckman-Coulter Vi-Cell. La viabilidad celular se midió a través del ensayo de exclusión de azul tripán.
- 25
- Aislamiento de ARN y RT-PCR cuantitativa en tiempo real.** El ARN total se extrajo de las células con el kit de aislamiento de ARN miRVana (Ambion) y se midió con NanoDrop 2000 de Thermo Scientific. Los niveles de miARN se midieron con un instrumento de PCR 7500 HT de Applied Biosystems con kits de ensayo de microARN de Taqman. Las reacciones controladas se confirmaron al excluir la transcriptasa inversa para confirmar la amplificación del ADNc. Los resultados se analizaron utilizando el método de Ct comparativo entre células no tratadas y tratadas. El análisis estadístico se realizó utilizando las pruebas t de Student de dos colas.
- 30
- Micromatrices de ARN no codificante.** Las muestras para los estudios de perfiles de miARN se procesaron por Asuragen Services (Austin, TX), de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de la compañía. Después de la evaluación del control de calidad (QC) de la muestra entrante, los extremos 3' de las moléculas de ARN en las muestras de ARN total se marcaron con biotina de acuerdo con el protocolo estándar de la compañía. El ARN marcado (100 ng de ARN total por muestra) se purificó e hibridó con matrices de miARN de Affymetrix GeneChip® (Affymetrix, Santa Clara, CA). La hibridación, los lavados, la tinción, la obtención de imágenes y la extracción de señales se realizaron de acuerdo con los procedimientos recomendados por Affymetrix. Las matrices se escanearon en un escáner 3000 7G de Affymetrix GeneChip®.
- 35
- Procesamiento de señales.** El procesamiento de señales implementado para Affymetrix miRChip es un proceso de varios pasos que implica interpretaciones de detección de señales específicas de sonda, estimación y corrección de fondo. Para cada sonda, se realiza una corrección de fondo global utilizando el método *robust multichip average* (RMA) con el resumen de mediana refinada (Median Polish). Las matrices dentro de un experimento de análisis específico se normalizan juntas utilizando la normalización de cuantiles. Las interpretaciones de detección se basan en una prueba de suma de rangos de Wilcoxon de la señal de sonda de miARN en comparación con la distribución de señales de sondas antigenómicas coincidentes con contenido de GC. Los datos brutos de la expresión génica (archivos .cel) se convirtieron en valores de expresión utilizando miRNAQCTool, un paquete de código abierto disponible a través de Affymetrix. Este software permite opciones comunes para convertir los datos de nivel de la sonda en valores de expresión, estas opciones incluyen: (1) corrección de fondo, (2) normalización (3) corrección de fondo específica de la sonda (por ejemplo, resta de sondas de discrepancia) y (4) resumen del conjunto de valores de la sonda en una medida de expresión. La selección por RMA se utilizó como un método de normalización. Los valores P de permutación se calcularon, a continuación, para la comparación de la prueba t entre las placas de placebo tratadas con DFMO y las no tratadas. A continuación, se clasificaron estos valores P y se compiló una lista de genes candidatos, utilizando la tasa de descubrimiento falso (FDR), los valores de corte ajustados del valor P obtenidos por el método de incremento lineal descrito por Benjamini y Hochberg (1995).
- 45
- 50
- 55
- 60 **Análisis de inmunotransferencia y cuantificación de los resultados de transferencia Western.** Las células HCT116 se trataron con o sin DFMO y putrescina 50 μ M, se recogieron mediante tripsinización y se granularon a 1000 g durante 5 min a 4 °C. A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS frío y a continuación, se resuspendieron en tampón de lisis RIPA (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, dodecilsulfato de sodio al 0,1 %, desoxicolato de sodio al 0,5 %, TritonX-100 al 1 % y comprimidos con inhibidor de la proteasa Mini completa y PhosphoSTOP; Roche). Las concentraciones de proteínas se determinaron usando el ensayo de proteína BCA (Pierce). Se separaron 25-40 μ g de lisado de células completas utilizando cualquier KD o geles mini-Protean TGX al
- 65

10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF durante 1 hora a 100 V, y se transfirieron con los anticuerpos apropiados de la siguiente manera: HMGA2 (Cell Signaling, n.º 8179), LIN28 (Abcam, n.º 46020), Actina (Sigma), V5 (Invitrogen), eIF5A (Epitomics, n.º S2096). Las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos y, posteriormente, los anticuerpos secundarios se incubaron con anticuerpos conjugados de peroxidasa de rábano picante anti-ratón y anti-conejo (Santa Cruz Biotechnologies). Las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL de Amersham Plus (GE Healthcare). Las bandas se cuantificaron a través del análisis de transferencia Western aplicando el análisis de software ImageJ. La cantidad de señal específica para las proteínas respectivas se corrigió para la carga de la muestra en los diagramas mostrados. En resumen, las áreas bajo las curvas se evaluaron para cada banda específica y las comparaciones se calcularon estableciendo los valores de control correspondientes al 100 % y cada condición se corrigió con actina.

Oligonucleótidos. Las sondas de LNA se adquirieron de Exiqon y se sintetizaron utilizando un eje de fosforotioato. Para los experimentos de transfección de LNA, se pretrataron células HCT116 con DFMO durante 48 h y luego se transfirieron con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en placas de 6 pocillos con LNA 5 nM, 25 nM o 50 nM (LNA anti-Let7: ACTACCTC (**SEQ ID NO: 1**) o LNA aleatorio: TCATACTA (**SEQ ID NO: 2**)). Después de 48 h, se preparó el lisado de células enteras y se analizó mediante transferencia Western.

Para la eliminación específica de eIF5A, los ARNip Silencer Select se adquirieron de Invitrogen y se dirigieron a eIF5A1 y eIF5A2. Los ARNip se transfirieron de manera óptima a 25 nM usando Lipofectamine 2000 durante 8 h en Opti-MEM. Los medios se reemplazaron después de 8 h de transfección y se suplementaron con suero que contenía DMEM. La proteína se recogió 48 h después de la transfección.

F. Ensayos de indicador de luciferasa. Los plásmidos indicadores Hmga2 3' UTR se obtuvieron de Addgene (plásmido 14785) y se han caracterizado en estudios anteriores (Mayr *et al.*, 2007). También se obtuvo un plásmido indicador Hmga2 mutado con sitios complementarios *let-7* interrumpidos (Plásmido Addgene 14792). Las células HCT116 se transfirieron en placas de 6 pocillos con 1,5 µg de luciferasa de luciérnaga y 1,5 µg de plásmidos indicadores de luciferasa de Renilla Hmga2. Para el análisis funcional, se transfirieron LNA 25 nM dirigidos contra la familia *let-7* con plásmidos apropiados. Las luciferasas de luciérnaga y renilla se midieron 48 h después de la transfección utilizando un Ensayo de Luciferasa Dual (Promega). Los resultados se normalizaron a continuación a luciferasa de luciérnaga. Los resultados son la media ± SD.

Ejemplo 1: El agotamiento de poliaminas suprime el crecimiento y altera los niveles de ARN no codificantes.

Para abordar las cuestiones que rodean la función de las poliaminas en el cáncer, se razonó que las poliaminas podrían interactuar iónicamente con cualquier número de macromoléculas, pero podrían hacerlo fuertemente con el ARN (Watanabe *et al.*, 1991), y covalentemente con el factor de traducción supuesto eIF5A (Saini *et al.*, 2009). Se planteó la hipótesis de que las poliaminas, actuando de forma independiente o a través de eIF5A, podrían afectar los niveles de ARN no codificantes. Se estableció por primera vez que la intervención de DFMO afectaba a las poliaminas intracelulares, lo que daba como resultado agrupaciones de poliaminas intracelulares agotadas. DFMO es un inhibidor de suicidio irreversible de la ornitina descarboxilasa (ODC) que inhibe la carcinogénesis en ambos modelos de ratón como de seres humanos. Por lo tanto, las células de cáncer de colon se trataron con DFMO y se midieron los grupos de poliaminas intracelulares utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El tratamiento con DFMO dio como resultado el agotamiento de la putrescina y la espermidina en células de cáncer de colon después de 96 h de tratamiento (Figura 1A). Para abordar la cuestión de los efectos fuera de la diana provocados por el tratamiento con DFMO, las células se complementaron con putrescina exógena, que demostró restablecer los niveles de poliaminas intracelulares, incluida la espermidina, precursora de la hipusina, en células tratadas con DFMO que dieron como resultado niveles de poliaminas comparables a las células de control de vehículo (FIG. 1A).

A continuación, se midió la proliferación celular en células HCT116. Se descubrió que el agotamiento de las poliaminas intracelulares reduce la proliferación celular, mientras que la suplementación con putrescina de células HCT116 tratadas con DFMO dio lugar a tasas de proliferación similares a los niveles de control (Figura 1B). También se midió la proliferación de células de cáncer de colon Caco2 y SW480 y células HeLa. Los niveles de viabilidad celular no se alteraron por el tratamiento con DFMO. Estos hallazgos indicaron que se requieren niveles elevados de grupos de poliaminas intracelulares para la proliferación, pero que la supresión de estos niveles no reduce la viabilidad de estas células. Además, el retraso del crecimiento se rescató mediante la suplementación con putrescina exógena de células HCT116 tratadas con DFMO, lo que indica que los efectos retardantes del crecimiento de DFMO se deben al agotamiento de las poliaminas y no a algún efecto desconocido del fármaco fuera de la diana.

A continuación, el mecanismo por el cual las poliaminas modulan la oncogénesis y los efectos del agotamiento de poliaminas en los niveles de ARN no codificante se investigó mediante el uso de una plataforma de micromatrices de ARN no codificante que contenía 15.644 sondas, que incluyó 1105 miARN maduros humanos. Los microARN (miARN) son pequeñas especies de ARN endógeno que se sabe que modulan la señalización celular predominantemente uniéndose a la región 3' no traducida (UTR) de las especies de ARN.

La unión de los miARN a su diana afín generalmente da como resultado la desestabilización o la represión de la traducción del ARNm (Filipowicz *et al.*, 2008). Como resultado de la capacidad de los miARN para modular las redes

de señalización involucradas tanto en el desarrollo como en las enfermedades neoplásicas, los miARN sirven como dianas atractivas para la intervención de enfermedades. Informes anteriores han demostrado un papel para *let-7* en el desarrollo de *C. elegans* (Reinhart et al., 2000), en el desarrollo de tumorigénesis y en el de cáncer (Kumar et al., 2008; Johnson et al., 2007). Curiosamente, las poliaminas también están implicadas en muchos procesos fundamentales que afectan el crecimiento normal y neoplásico (Gerner y Meyskens, 2004), que también se han visto afectados por *let-7*, incluida su función en la regulación de factores asociados con el cáncer como HMGA2, KRAS y MYC (Roush y Slack, 2008).

Se identificaron múltiples ARN no codificantes que están involucrados tanto en enfermedades neoplásicas y metabólicas así como en el desarrollo de células madre como modulados de una manera dependiente de poliaminas (Yang et al., 2008). Hubo 129 sondas con valores de permutación $P \leq 0,05$, 65 de ellas fueron miARN humanos, y hubo 14 que permanecieron significativas después del ajuste para la FDR; siete sondas fueron reguladas al alza y siete fueron reguladas a la baja (Tabla 1). Los miembros de la familia *let-7*, incluido *let-7i*, y varios otros ARN no codificantes se alteraron significativamente por el agotamiento de la poliaminas.

Los efectos pleiotrópicos superpuestos de las poliaminas y *let-7* sugirieron fuertemente que la familia *let-7* podría ser parte del mecanismo que explica la acción farmacéutica de la inhibición de la ODC. Al usar la PCR en tiempo real, se encontró que los niveles de miARN *let-7i* aumentaron después de 96 h de inhibición de ODC por el tratamiento con DFMO de una manera estadísticamente relevante. Por lo tanto, se dilucidó el papel de las poliaminas en la familia *let-7*.

Tabla 1. Lista de ARN no codificantes (ARNnc) afectados por el agotamiento de las poliaminas en células de cáncer colorrectal

Sonda	Nivel de expresión medio (SD)		Valor de p*	Factor de cambio
	Placebo	Tratamiento		
U50B x st	11,15 (0,05)	9,86 (0,09)	0,0276	-2,44
U50B st	11,96 (0,08)	10,72 (0,18)	0,0263	-2,35
U13 st	11,00 (0,10)	9,81 (0,26)	0,0294	-2,29
U8 st	10,07 (0,15)	8,90 (0,23)	0,0288	-2,26
U8 x st	9,79 (0,17)	8,86 (0,17)	0,0267	-1,90
hsa-miR-193b st	9,48 (0,06)	8,79 (0,15)	0,0282	-1,61
hsa-miR-494 st	13,18 (0,14)	12,64 (0,05)	0,0289	-1,45
hsa-miR-517a st	1,00 (0,09)	1,47 (0,09)	0,0287	1,38
hsa-miR-720 st	14,00 (0,15)	14,63 (0,09)	0,0273	1,55
hsa-miR-221 st	11,68 (0,10)	12,50 (0,11)	0,027	1,77
hsa-let-7i st	9,68 (0,11)	10,74 (0,13)	0,026	2,08
hsa-miR-886-3p st	10,17 (0,24)	11,26 (0,15)	0,0313	2,13
hsa-miR-22 st	8,39 (0,29)	10,38 (0,09)	0,0268	3,96
hsa-miR-200a-star st	2,33 (0,33)	4,89 (0,59)	0,029	5,88

Placebo es el nivel de expresión medio para el replicado no tratado; Tratamiento es el nivel de expresión medio para el grupo tratado con DFMO; Factor de cambio es Tratamiento frente a Placebo; SD es la desviación estándar; * Valor P permutacional no ajustado por FDR.

Para confirmar los resultados de las micromatrices, se realizó un análisis de PCR cuantitativo en células ricas en poliaminas y en células agotadas de poliaminas. Se encontró un aumento de la expresión de *let-7i* maduro en células HCT116 tratadas con DFMO de una manera dependiente del tiempo, con una expresión máxima que se produce a las 96 h después del inicio del tratamiento en comparación con el control (Figura 1C). Se midieron los efectos de las poliaminas en otra isoforma de *let-7*, *let-7a*, y se encontraron respuestas similares, lo que indicaba que los múltiples miembros indicados de la familia de *let-7* estaban, de hecho, regulados por el metabolismo de las poliaminas. Para verificar que la intervención farmacéutica fue un efecto específico de poliaminas y no debido a efectos fuera de la diana, las células HCT116 se trataron con putrescina después de la administración de DFMO, se aisló ARN total y se midió la expresión de *let-7i*. La putrescina exógena rescató los niveles aumentados de *let-7i* en células tratadas con DFMO, mientras que no tuvo un efecto observable en cultivos no tratados con el fármaco (Figura 1D). En conjunto, estos datos indicaron que los miembros de la familia *let-7* están modulados por poliaminas intracelulares y que estas aminoras influyen en los niveles de microARN específicos.

Ejemplo 2 - La pérdida de la función de *let-7* anula los efectos mediados por poliaminas en HMGA2.

Para determinar si las poliaminas estaban influyendo en la expresión génica específica a través de los mecanismos

mediados por *let-7*, se examinaron varios genes diana de *let-7* supuestos. El factor A2 del grupo de alta movilidad (HMGA2) es una diana previamente validada de *let-7* (Mayr et al., 2007; Lee y Dutta, 2007) que se asocia con una escasa supervivencia en el cáncer colorrectal (Wang et al., 2011). Además, la familia HMGA se expresa ampliamente durante la embriogénesis y en tumores benignos y malignos (Fusco y Fedele, 2007). Con el fin de identificar si las poliaminas modulaban los niveles de proteína HMGA2, las poliaminas celulares se agotaron y se realizaron transferencias Western, que documentaron un agotamiento fuerte de la HMGA2 en 72 h de tratamiento con DFMO, así como niveles reducidos de LIN28, el regulador negativo corriente arriba de la familia *let-7* (FIG. 2A). A continuación, si los efectos observados eran específicos de poliaminas se examinaron suplementando el medio de las células tratadas con DFMO con putrescina. La suplementación con putrescina no alteró los niveles de proteína de LIN28 en células no tratadas con el fármaco. Sin embargo, La suplementación con putrescina en células tratadas con DFMO dio como resultado niveles de LIN28 comparables al control con vehículo (Figura 2A), lo que confirma que LIN28 se expresa de una manera dependiente de poliaminas en células derivadas de cáncer de colon.

Para determinar el mecanismo de la reducción inducida por DFMO de HMGA2, se utilizó un ensayo de indicador en el que la 3' UTR de *Hmga2* se colocó cadena abajo de la luciferasa como se indica anteriormente (Mayr et al., 2007). Adicionalmente, un informe anterior demostró la capacidad de silenciar las familias de miARN, tales como *let-7*, con pocos efectos fuera de la diana al dirigirse a la región de base utilizando oligonucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA) (Obad et al., 2011). Para evaluar los efectos de las poliaminas sobre la represión traduccional mediada por *let-7* de HMGA2, las células se transfectaron con el indicador de luciferasa HTRGA 3' UTR de *Hmga2* que contiene sitios de unión *let-7* intactos o mutados. Las células de cáncer de colon transfectadas con un indicador que contiene elementos de unión de *let-7* intactos demostraron una actividad indicadora disminuida en comparación con aquellas células transfectadas con indicadores que contienen secuencias mutantes en la 3' UTR de *Hmga2*. La cotransfección de estos plásmidos con LNA anti-*let-7* 25 nM, invirtió las actividades de luciferasa en indicadores que contienen elementos de unión de *let-7* intactos, pero no para indicadores que contienen elementos de unión mutantes (Figura 2B). Se observaron resultados similares cuando las reservas de poliaminas se agotaron con DFMO, lo que indica que el mecanismo de supresión de HMGA2 por *let-7* es funcional tanto en las células agotadas de poliaminas como en las repletas de poliaminas. En su conjunto, la 3' UTR de *Hmga2* mostró una actividad luciferasa mejorada cuando los oligonucleótidos de LNA anti-*let-7* se transfectaron tanto en células HCT116 tratadas como no tratadas, pero no en células control transfectadas con LNA aleatorio 25 nM. Se cotransfectó un indicador de luciferasa mutante 3' UTR de *Hmga2* portador de supuestos sitios diana *let-7* mutagenizados y se observó que la actividad de luciferasa 3' UTR de *Hmga2* mutada exhibía niveles más altos de actividad en comparación con el indicador de luciferasa de tipo silvestre. Cuando las células sin tratar simuladas se compararon con las células simuladas tratadas con DFMO, se observó una reducción en la luciferasa de HMGA2. Además, los LNA dirigidos contra *let-7* no tuvieron ningún efecto observable en el vector 3' UTR *Hmga2* mutado que recapitulaba claramente los informes anteriores, así como la validación de la especificidad de los experimentos de LNA independientemente de los niveles de poliaminas (Figura 2B). Los indicadores de la luciferasa confirmaron que los mecanismos moleculares de la represión de la traducción mediada por microARN no se ven afectados ni en las células ricas en poliaminas ni en las pobres en poliaminas, lo que sugiere que los aumentos en la expresión de *let-7* debido al agotamiento de las poliaminas dan lugar a una disminución fuerte de HMGA2.

Para confirmar los datos del indicador de HMGA2 que se muestran en la FIG. 2B, se transfectaron células simuladas y tratadas con fármaco con LNA antisentido dirigido a la familia *let-7* y se midieron los niveles de proteína HMGA2 (Figura 2C). Las células tratadas con DFMO y transfectadas con LNA aleatorio expresaron niveles más bajos de HMGA2, en comparación con las células no tratadas. Los LNA dirigidos a *let-7* indujeron un aumento en los niveles de proteína HMGA2 en las células tratadas de forma simulada, mientras que los LNA dirigidos a *let-7*, pero no LNA aleatorios, rescataron la reducción inducida por DFMO en la proteína HMGA2. Estos resultados indicaron que la expresión de HMGA2 depende de las poliaminas y que el mecanismo de la expresión dependiente de las poliaminas depende de *let-7* (Figuras 2A-C). Los resultados en las FIGS. 2B-C también resaltan la función intacta de la represión de la traducción mediada por *let-7* en cultivos agotados de poliaminas.

Para comprender mejor el mecanismo molecular mediante el cual las poliaminas alteran la expresión de los niveles maduros de *let-7i* y la expresión de HMGA2, se evaluó el efecto del agotamiento de las poliaminas en la expresión del regulador de *let-7*, LIN28. LIN28 es un factor de pluripotencia que se une a microARN *let-7* precursores e induce la uridilación y la represión de la familia *let-7* (Heo et al., 2009). El agotamiento de las poliaminas dio lugar a una reducción significativa de la proteína LIN28 después de 72 h de tratamiento con el fármaco (Figura 2A). La disminución inducida por DFMO en LIN28 fue rescatada por putrescina exógena indicando adicionalmente la especificidad de la intervención farmacéutica (Figura 2A).

Ejemplo 3- eIF5A regula HMGA2 y LIN28.

Se identificaron los efectores del metabolismo de las poliaminas que podrían explicar los cambios generalizados observados. Las poliaminas influyen en la síntesis de proteínas, en parte, a través de una nueva modificación postraduccional de eIF5A24. La eIF5A es la única proteína conocida que sufre una modificación única llamada hipusinación. La hipusinación se produce a través de un mecanismo de dos pasos que incluye la transferencia de un grupo 4-aminobutilo de la poliamina espermidina a un resto de lisina conservado evolutivamente en eIF5A, seguido de b-hidroxilación del intermedio de desoxihipusina. Además, el agotamiento de la espermidina precursora de hipusina

por el tratamiento con DFMO causa un correspondiente agotamiento en la proteína eIF5A hipusinada (Park et al., 2005). Los vertebrados codifican dos isoformas de eIF5A con diferentes patrones de expresión tisular. La isoforma eIF5A1 se expresa de forma ubicua, pero eIF5A2 se encuentra solamente en tejidos específicos y en algunos cánceres (Caraglia et al., 2011).

5 Por lo tanto, se evaluó la posibilidad de que las poliaminas regulen la vía LIN28/ let-7 a través de eIF5A. Dado que las isoformas de eIF5A comparten una homología de secuencia de aminoácidos considerable y que DFMO dirige la hipusinación de eIF5A, se generó una línea celular estable de HCT116 que sobreexpresa eIF5A2 con un epítipo V5 C-terminal para diferenciar específicamente entre ambas isoformas de eIF5A y para probar adicionalmente los posibles efectos en LIN28/let-7. EL tratamiento durante setenta y dos horas con ARNip 25 nM dirigidos a eIF5A1 o eIF5A2 fue óptimo para la eliminación específica de estas proteínas (Figura 3A). Estas condiciones se usaron para determinar si la eliminación específica de eIF5A1 o eIF5A2, o ambas, afectó la señalización de LIN28 let-7 en células HCT116 parentales. La eliminación simultánea de las isoformas eIF5A1 y eIF5A2 dio como resultado consistentemente el agotamiento tanto de HMGA2 como de LIN28 (FIG. 3B). La supresión óptima de estas dos proteínas parecía estar asociada con la eliminación de las formas iso tanto eIF5A1 como eIF5A2. Los LNA dirigidos a let-7 aumentaron los niveles de proteína HMGA2, y este aumento no se vio afectado por la eliminación de eIF5A1 o eIF5A2 (Figura 3C). Por el contrario, los LNA anti-let-7 tuvieron poco efecto en la expresión de LIN28 y no alteraron la disminución en LIN28 asociada con los LNA dirigidos a eIF5A1 o eIF5A2. Estos datos son consistentes con la interpretación de que las poliaminas influyen en la expresión de genes específicos, incluyendo HMGA2, por un mecanismo que involucra los efectos dependientes de eIF5A en la represión de la traducción mediada por microARN. Estos hallazgos sugieren un modelo, representado en la FIG. 4, en el que las poliaminas son cometabolitos que regulan la expresión de LIN28 a través de eIF5A, y LIN28, a su vez, regula los niveles de let-7 que afectan a la represión traduccional HMGA2 en células HCT116.

25 REFERENCIAS

- Patente de los Estados Unidos 3.647.858
 Patente de los Estados Unidos 3.654.349
 Patente de los Estados Unidos 4.330.559
 30 Patente de los Estados Unidos 4.413.141
 Patente de los Estados Unidos 5.814.625
 Patente de los Estados Unidos 5.843.929
 Patente de los Estados Unidos 6.258.845
 Alberts et al., *J. Cell. Biochem. Supp.*, (22): 18-23, 1995.
 35 AMA Drug Evaluations Annual, 1814-1815, 1994.
 Babbar et al., *Biochem. J.*, 394:317-24, 2006.
 Bailey et al., *Cancer Prev Res (Phila)* 3, 35-47, 2010.
 Barry et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 98(20): 1494-500, 2006.
 Bedi et al., *Cancer Res.*, 55(9): 1811-1816, 1995.
 40 Bellofernandez et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7804-8, 1993.
 Buechner et al., *Br J Cancer* 105, 296-303, 2011.
 Caraglia et al., *Amino Acids*, epub el 3 de diciembre de 2011.
 Childs et al., *Cell. Molec. Life Sci.*, 60:1394-1406, 2003.
 Derynck et al., *Nature Genetics*, 29:117-29, 2001.
 45 DuBois et al., *Cancer Res.*, 56:733-737, 1996.
 Erdman et al., *Carcinogenesis*, 20:1709-13, 1999.
 Filipowicz, et al., *Nat Rev Genet* 9, 102-14, 2008.
 Fultz y erner, *Mol. Carcinog.*, 34:10-8, 2002.
 Fusco, A. & Fedele, M., *Nat Rev Cancer* 7, 899-910, 2007.
 50 Gerner, E.W. & Meyskens, F.L., Jr., *Nat Rev Cancer* 4, 781-92, 2004.
 Gerner et al., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 3:325-330, 1994.
 Giardiello et al., *Cancer Res.*, (57): 199-201, 1997.
 Guo et al., *Cancer Res.*, 60(22):6314-6317, 2000.
 Hanif et al., *Biochemical Pharmacology*, (52):237-245, 1996.
 55 Heo et al., *Cell* 138, 696-708, 2009.
 Hogarty et al., *Cancer Res* 68, 9735-45, 2008.
 Hubner et al., *Clin. Cancer Res.*, 14(8):2303-9, 2008.
 Ignatenko et al., *Cancer Biol. Ther.*, 5(12): 1658-64, 2006.
 Iwamoto et al., *Carcinogenesis*, 21:1935-40, 2000.
 60 Johnson et al., *Nat. Genet.*, 29(2):233-237, 2001.
 Johnson et al., *Cancer Res* 67, 7713-22, 2007.
 Kingsnorth et al., *Cancer Res.*, 43(9):4035-8, 1983.
 Kumar et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 3903-8, 2008.
 Ladenheim et al., *Gastroenterology*, 108:1083-1087, 1995.
 65 Landau et al., *J Biol Chem* 285, 12474-81, 2010.
 Lanza et al., *Arch. Intern. Med.*, 155:1371-1377, 1995.

- Lee, Y.S. & Dutta, A., *Genes Dev* 21, 1025-30, 2007.
 Lipkin, J. *Cell Biochem. Suppl.*, 28-29:144-7, 1997.
 Love et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 85:732-7, 1993.
 5 Luk y Baylin, N. *Engl. J. Med.*, 311(2):80-83, 1984.
 Lupulescu, *Cancer Detect. Prev.*, 20(6):634-637, 1996.
 Martinez et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:7859-64, 2003.
 Matsubara et al., *Clinical Cancer Res.*, 1:665-71, 1995.
 Mayr et al., *Science* 315, 1576-9, 2007.
 McLaren et al., *Cancer Prev. Res.*, 1 (7):514-21, 2008.
 10 Meyskens et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 86(15): 1122:-1130, 1994.
 Meyskens et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 90(16): 1212:-8, 1998.
 Meyskens et al., Difluorometilornitina más sulindaco para la prevención de adenomas colorrectales esporádicos: un placebo controlado aleatorizado, ensayo a doble ciego. *Cancer Prev Res (Phila)* 1, 32-8, 2008.
 Muscat et al., *Cancer*, 74:1847-1854, 1994.
 15 Narisawa et al., *Cancer Res.*, 41(5): 1954:-1957, 1981.
 Obad et al., *Nat Genet* 43, 371-8, 2011.
 O'Brien et al., *Molec. Carcinog.*, 41(2): 120:-3, 2004.
 Pardali y Moustakas, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1775:21-62, 2007.
 Park et al., *Amino Acids* 38, 491-500, 2009.
 20 Pegg, *Biochem.*, 234(2):249-262, 1986.
 Physician's Desk Reference, Medical Economics Data, Montville, N.J., 1745-1747, 1999
 Piazza et al., *Cancer Res.*, (55):311 3116, 1995.
 Piazza et al., *Cancer Res.*, (57):2452-2459, 1997a.
 Piazza et al., *Cancer Res.*, (57):2909-2915, 1997b.
 25 Pollard y Luckert, *Cancer Res.*, 49:6471-6473, 1989.
 Rao et al., *Cancer Res.*, (55): 1464:-1472, 1995.
 Reddy et al., *Cancer Res.*, (50):2562-2568, 1990.
 Reddy et al., *Cancer Res.*, 47:5340-5346, 1987.
 Reinhart et al., *Nature* 403, 901-6, 2000.
 30 Roberts y Wakefield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:8621-3, 2003.
 Roush, S. & Slack, F.J., *Trends Cell Biol* 18, 505-16, 2008.
 Saini et al., *Nature* 459, 118-21, 2009.
 Samal et al., *Int. J. Cancer*, 133:1323-1334, 2013.
 Simoneau et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 93:57-9, 2001.
 35 Simoneau et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 292-9, 2008.
 Singh y Reddy, *Annals. NY Acad. Sci.*, (768):205-209, 1995.
 Singh et al., *Carcinogenesis*, (15): 1317:-1323, 1994.
 Sporn, M.B. & Hong, W.K., *Nat Clin Pract Oncol* 5, 628-9, 2008.
 Strejan et al., *Cell Immunol.*, 84(1): 171:-184, 1984.
 40 Su et al., *Science*, (256):668-670, 1992.
 Tempero et al., *Cancer Res.*, 49(21):5793-7, 1989.
 Thomas y Thomas, *J. Cell Mol. Med.*, 7:113-26, 2003.
 Thompson et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, (87): 125:-1260, 1995.
 Vander Heiden, M.G. *Nat Rev Drug Discov* 10, 671-84, 2011.
 45 Vane y Botting, *Adv Exp Med Biol.*, 433:131-8, 1997.
 Viswanathan et al., *J. Urol.*, 171(2 Pt 1):652-5, 2004.
 Viswanathan, S.R. & Daley, G.Q., *Cell* 140, 445-9, 2010.
 Viswanathan et al., *Science* 320, 97-100, 2008.
 Wallace, *Eur. J. Clin. Invest.*, 30:1-3, 2000.
 50 Wang et al., *Clin Cancer Res* 17, 2570-80, 2011.
 Watanabe et al., *J Biol Chem* 266, 20803-9, 1991.
 Yang et al., *Cancer Res* 68, 10307-14, 2008.
 Zhang et al., *Genes Dev* 26, 461-73, 2012.
 Zell et al., *Cancer Prev. Res.*, 2(3):209-12, 2009a.
 55 Zell et al., *Clin. Cancer Res.*, 15(19):6208-16, 2009b.
 Zender et al., *Cell* 135, 852-64, 2008. Zhu et al., *Cell* 147, 81-94, 2011.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 60 <110> Gerner, Eugene Paz, Edwin Lafleur, Bonnie Garcia-Huidobro, Jenaro
 <120> MARCADORES PREDICTIVOS PARA TERAPIAS DE CÁNCER CON INHIBIDOR DE POLIAMINA
 <130> CAPP.P0011WO
 65 <140> SIN ASIGNACIÓN, AÚN

<141> 29/10/2013
<150> US 61/719.748
<151> 29/10/2012
5 <160> 2
<170> PatentIn versión 3.5
10 <210> 1
<211> 8
< 212 > ADN
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<223> LNA sintético
<400> 1
20 actacctc 8
<210> 2
<211> 8
< 212 > ADN
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> LNA sintético
<400> 2 tcatacta 8
30

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un inhibidor de la ornitina descarboxilasa (ODC), para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de cáncer en un paciente, en donde el cáncer del paciente presenta: (i) un nivel reducido de expresión de ARN *let-7* no codificante en comparación con un nivel de expresión de referencia de ARN *let-7* no codificante; o, (ii) un nivel de expresión de proteína HMGA2 elevado en comparación con un nivel de expresión de proteína HMGA2 de referencia o un nivel de expresión de proteína LIN28 elevado en comparación con un nivel de referencia.
2. Un método para predecir la eficacia de una terapia anticancerosa que comprende un inhibidor de la ornitina descarboxilasa (ODC), que comprende evaluar un nivel de ARN *let-7* no codificante celular o tisular, o un nivel de proteína HMGA2, o un nivel de proteína LIN28 en una muestra de un paciente a tratar con la terapia, en donde un nivel de ARN *let-7* no codificante celular o tisular bajo predice una mayor eficacia para el tratamiento, o un nivel de proteína HMGA2 celular o tisular alto predice una mayor eficacia para el tratamiento, o un nivel de proteína LIN28 celular o tisular alto predice una mayor eficacia para el tratamiento.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde el nivel de referencia es un nivel observado en un sujeto no enfermo o un nivel observado en una célula no cancerosa del paciente.
4. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en donde el nivel se proporciona en un informe que contiene información de dicho nivel o tomando un historial del paciente que revela los resultados, o evaluando un nivel de expresión de un ARN *let-7* no codificante, un nivel de proteína HMGA2 o un nivel de proteína LIN28 en una célula cancerosa de una muestra.
5. Las composición o el método de la reivindicación 4, en donde la evaluación de ARN *let-7* no codificante comprende PCR cuantitativa, o transferencia Northern, o la evaluación del nivel de proteína HMGA2 o el nivel de proteína LIN28 comprende inmunohistoquímica, o transferencia Western, o ELISA.
6. Las composición o el método de la reivindicación 4, en donde la muestra es una muestra de sangre, o una muestra de tejido o una muestra de tejido tumoral.
7. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en donde el cáncer es cáncer colorrectal, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, un cáncer de sangre, cáncer de piel, cáncer de testículos, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de hígado o cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel no melanoma o glioblastoma.
8. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en donde el inhibidor de ODC es α -difluorometilornitina (DFMO); opcionalmente, en donde:
- una cantidad eficaz de DFMO son 500 mg/día; o
 - una cantidad eficaz de DFMO es de 0,05 a 5,0 g/m²/día; o
 - la DFMO se formula como una cápsula dura o blanda, un comprimido o un líquido; o
 - la DMFO se administra cada 12 horas; o
 - la DMFO se administra cada 24 horas.
9. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en donde la composición o la terapia anticancerosa comprende además un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE); opcionalmente, en donde el AINE es un inhibidor de COX-2, sulindaco, celecoxib, naproxeno, diclofenaco o aspirina.
10. Las composición o el método de la reivindicación 9, en donde el inhibidor de la ODC o el AINE se administra por vía oral, intraarterial o intravenosa; o el inhibidor de la ODC y el AINE se administran por vías distintas.
11. Las composición o el método de la reivindicación 9, en donde una cantidad eficaz de sulindaco es de 10 a 1500 mg/día, tal como 10 a 400 mg/día, tal como 150 mg/día.
12. Las composición o el método de la reivindicación 9, en donde el inhibidor de la ODC se administra antes del AINE, o en donde el inhibidor de la ODC se administra después del AINE, o en donde el inhibidor de la ODC se administra antes y después del AINE, o en donde el inhibidor de la ODC se administra al mismo tiempo que el AINE.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 2, que además comprende obtener resultados de una prueba que determina que el genotipo del paciente en la posición +316 de al menos un alelo del promotor del gen ODC1 es G.

14. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en donde el paciente es un ser humano.

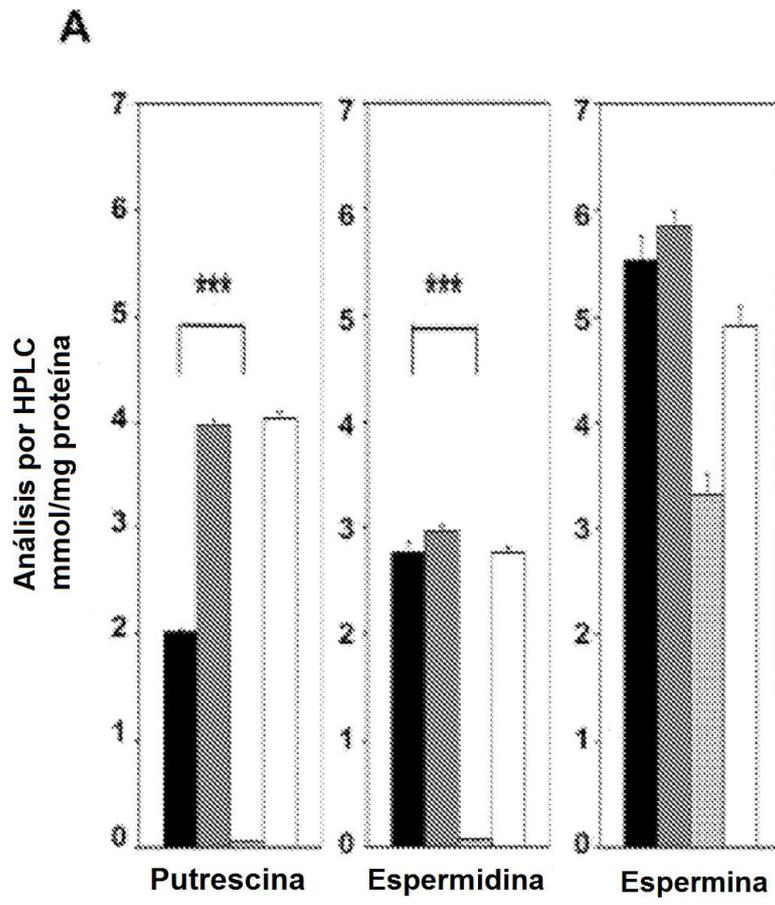


FIG. 1A

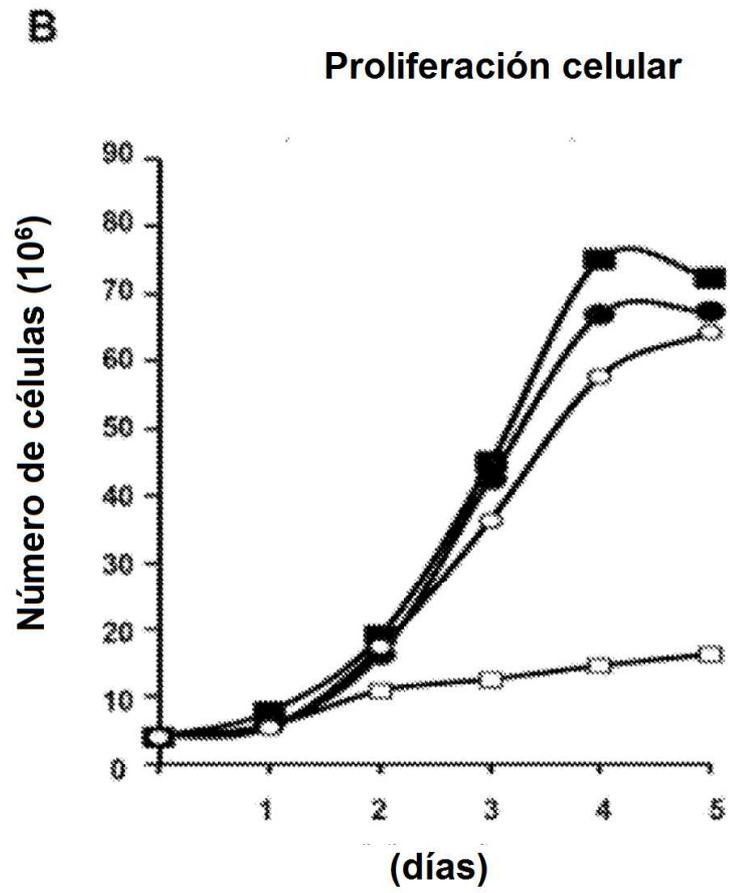


FIG. 1B

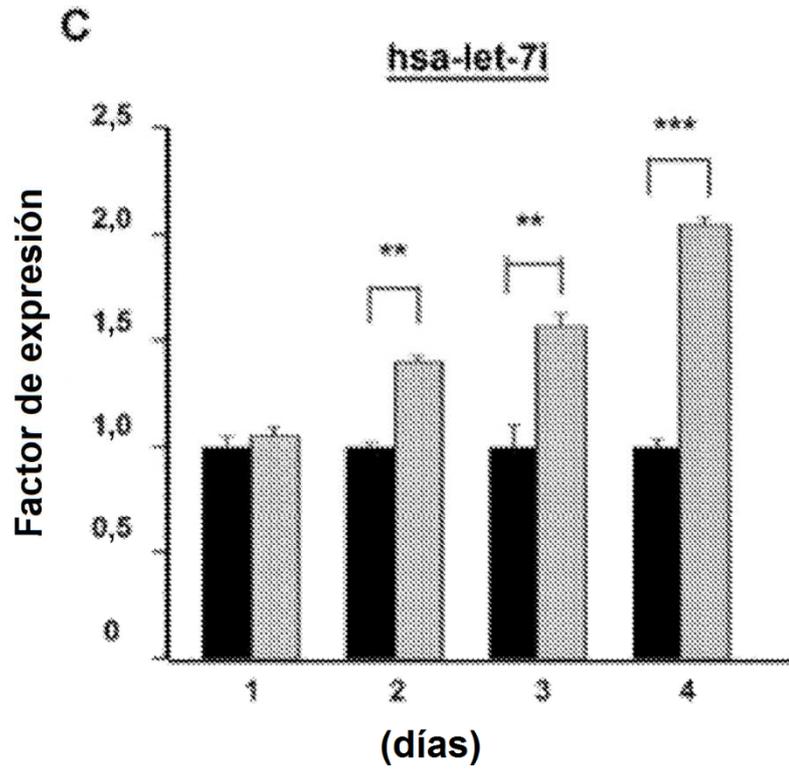


FIG. 1C

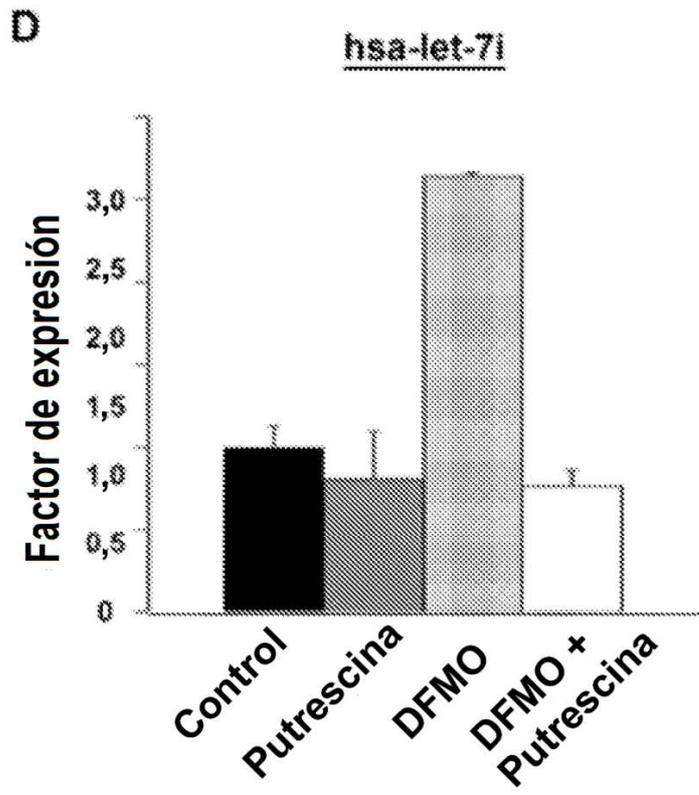


FIG. 1D

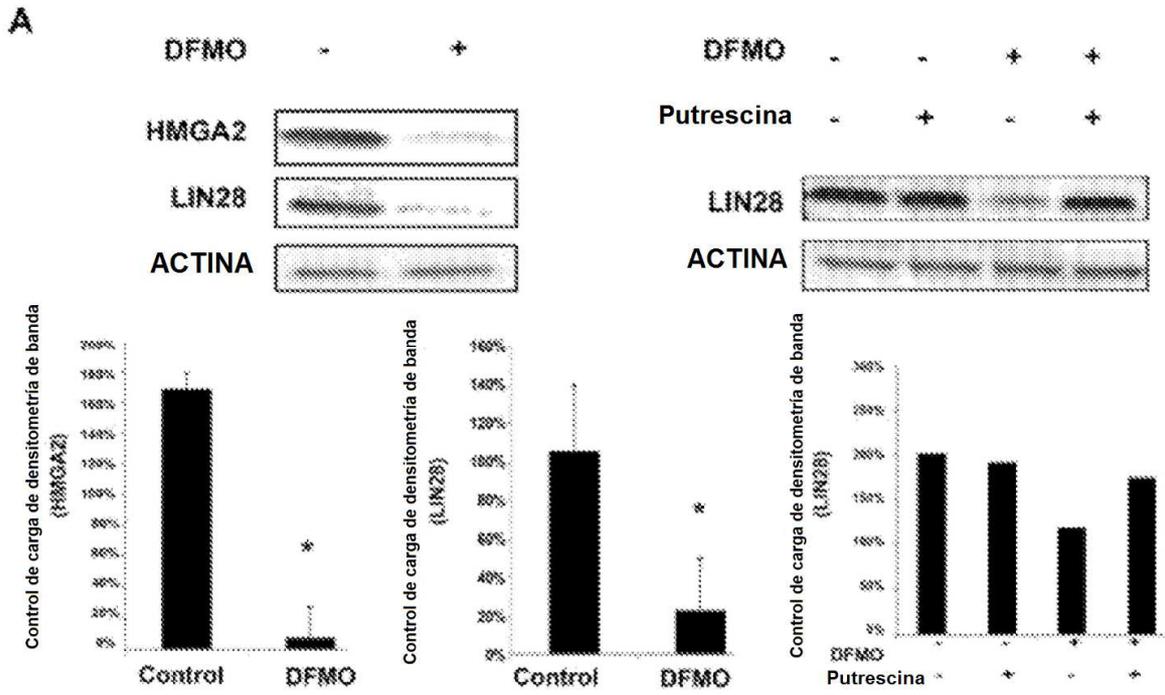


FIG. 2A

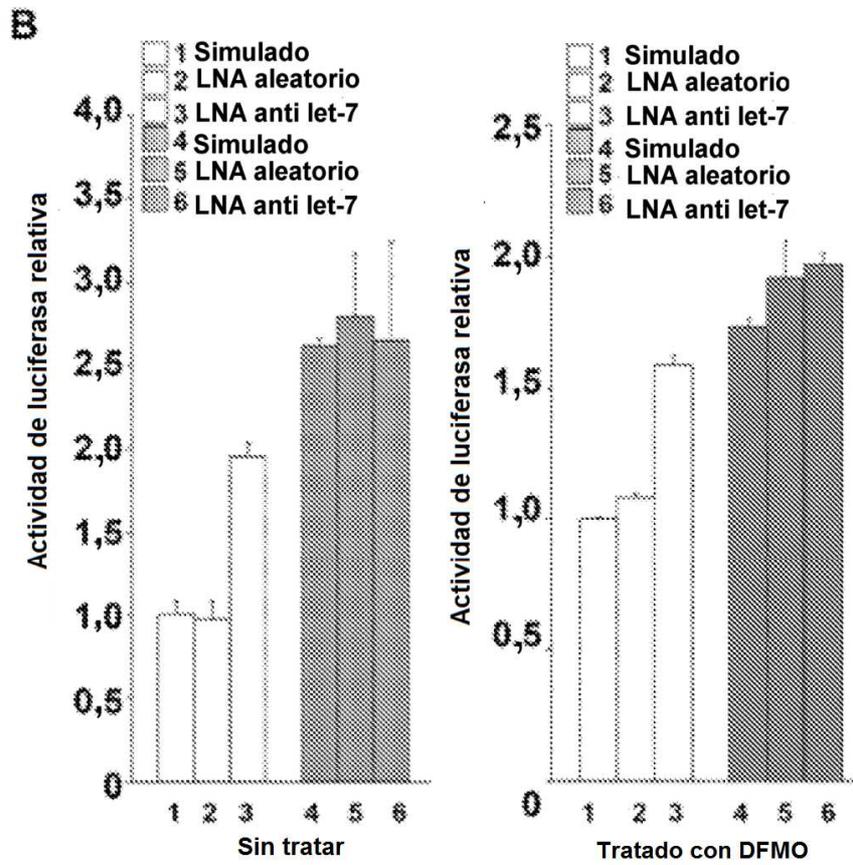


FIG. 2B

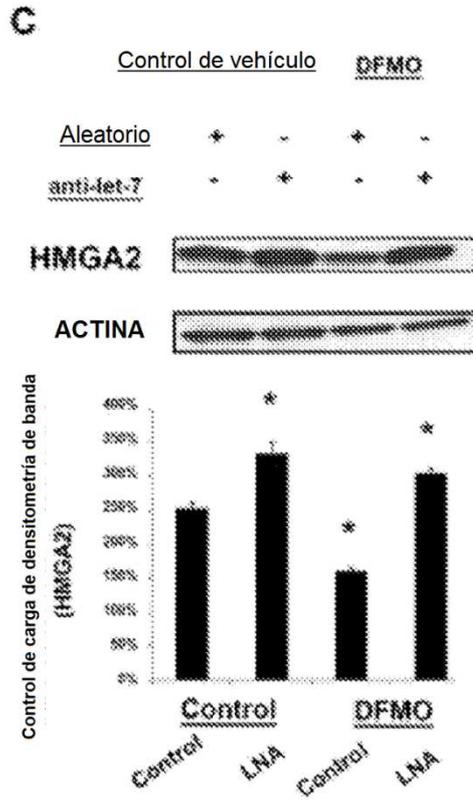


FIG. 2C

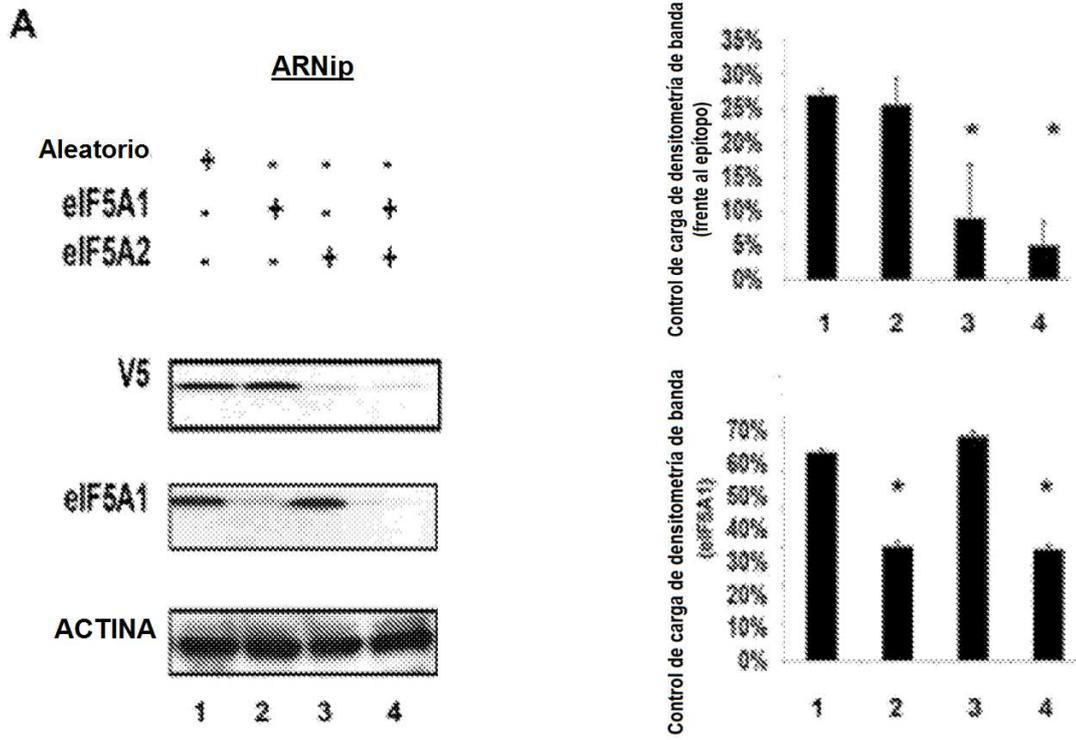


FIG. 3A

B

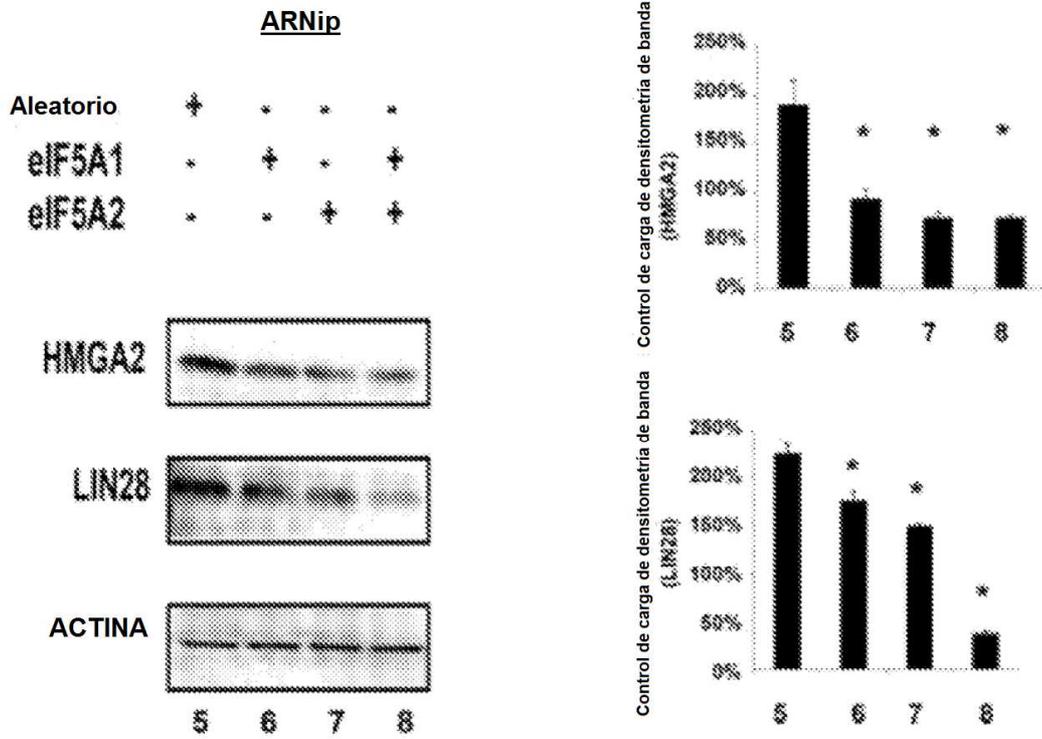


FIG. 3B

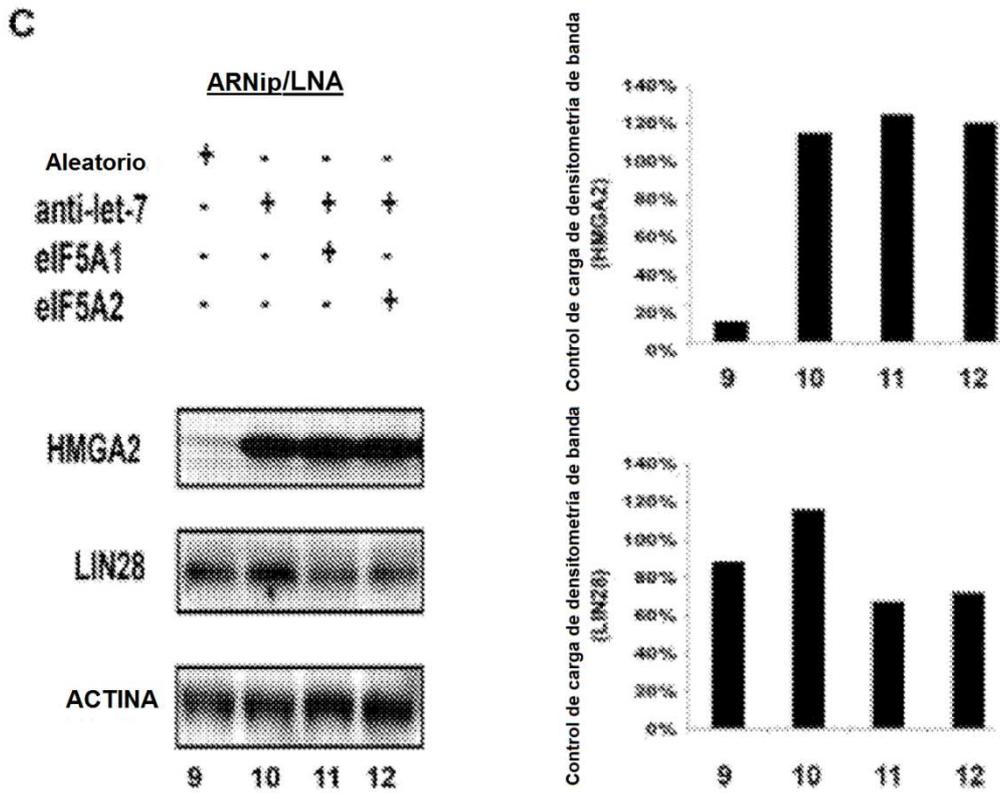


FIG. 3C

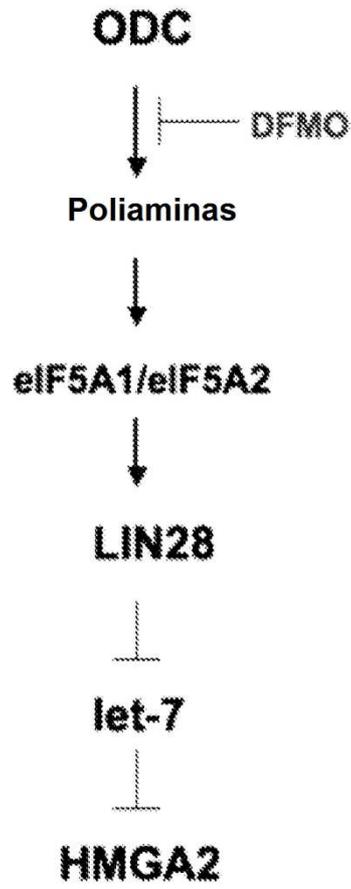


FIG. 4