

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2010.05.14	(73) Titular(es): ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF OF UNIVERSITY OF ARIZONA 888 N. EUCLID AVENUE, ROOM 204 TUCSON, AZ 85721 US THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, A CALIFORNIA CORPORATION US
(30) Prioridade(s): 2009.05.14 US 216216 P 2009.06.03 US 217679 P 2009.06.03 US 217682 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2012.03.21	
(45) Data e BPI da concessão: 2014.06.25 187/2014	(72) Inventor(es): EUGENE GERNER US JASON ZELL US CHRISTINE MCLAREN US FRANK MEYSKENS US HODA ANTON-CULVER US
	(74) Mandatário: JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES RUA CASTILHO, 167 - 2.º 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **DIAGNÓSTICO E TRATAMENTOS DE CARCINOMA COM BASE NO GENÓTIPO ODC1**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA MÉTODOS E KITS PARA A) A PREDIÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DO PACIENTE COM CANCRO COLORETAL, BEM COMO A SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES PORTADORES DE OUTROS CANCROS INVASIVOS EM QUE A PROLIFERAÇÃO CELULAR E A CARCINOGENÉSE ESTÃO, EM PARTE, LIGADAS A ELEVADOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DE ODC E MAIORES TEORES DE POLIAMINA CELULAR, E B) A SELEÇÃO DAS OPÇÕES DE TRATAMENTO CORRESPONDENTES PARA TAIS PACIENTES COM BASE NA SEQUÊNCIA DE NUCLEÓTIDOS DE ALELOS, OU EM SNP NA POSIÇÃO +316 DO GENE PROMOTOR ODC1, BEM COMO MÉTODOS DE TRATAMENTO DE CANCRO QUE INCLUEM, EM CADA CASO, A DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DO PROMOTOR ODC1 NA POSIÇÃO +316, COMO UM MEIO PARA GUIAR A ESCOLHA DO TRATAMENTO.

RESUMO

**"DIAGNÓSTICO E TRATAMENTOS DE CARCINOMA COM BASE NO
GENÓTIPO ODC1"**

A presente invenção proporciona métodos e kits para a) a predição da sobrevivência do paciente com cancro colorretal, bem como a sobrevivência de pacientes portadores de outros cancros invasivos em que a proliferação celular e a carcinogénese estão, em parte, ligadas a elevados níveis de atividade de ODC e maiores teores de poliamina celular, e b) a seleção das opções de tratamento correspondentes para tais pacientes com base na sequência de nucleótidos de alelos, ou em SNP na posição +316 do gene promotor ODC1, bem como métodos de tratamento de cancro que incluem, em cada caso, a determinação do genótipo do promotor ODC1 na posição +316, como um meio para guiar a escolha do tratamento.

DESCRIÇÃO

"DIAGNÓSTICO E TRATAMENTOS DE CARCINOMA COM BASE NO GENÓTIPO ODC1"

I. Campo da invenção

A presente invenção refere-se genericamente aos campos da biologia do cancro e medicina. Mais particularmente, diz respeito a métodos para o diagnóstico, prevenção e tratamento de carcinomas e dos fatores de risco dos mesmos.

II. Descrição da tecnologia relacionada

Um dos principais obstáculos para a tradução da pesquisa de quimioprevenção do cancro na prática clínica tem sido a eficácia marginal do agente e toxicidades que excedem o benefício (Psaty e Potter, 2006; Lippman, 2006). Por exemplo, a eficácia marcada demonstrada da combinação inibitória de poliamina de *D,L*- α -difluorometilornitina (DFMO, eflornitine) e sulindac de longo prazo, por dia, por via oral, entre pacientes com adenoma colo-retal (CRA) foi recentemente demonstrada (Meyskens *et al.*, 2008), no entanto, o tratamento foi associado com ototoxicidade subclínica modesta (McLaren *et al.*, 2008), e um maior número de eventos cardiovasculares em pacientes com risco cardiovascular de linha de base elevado (Zell *et al.*, 2009). Seria de um grande benefício identificar as características genéticas que identificam a adequação de um paciente para um determinado regime de tratamento preventivo ou curativo.

Por exemplo, continua a existir uma necessidade para métodos eficazes e menos tóxicos para o tratamento e a prevenção de cancros colo-retais e de outros carcinomas. De acordo com o National Cancer Institute, em 2009 haviam cerca de 147.000 novos casos e 50.000 mortes por cancro

colo-retal nos Estados Unidos. Os protocolos de tratamento atuais, especialmente aqueles para os cancros do cólon e pólipos, incluem a ressecção do tumor, a quimioterapia e a radioterapia. Um polimorfismo de nucleótido único (SNP) no intrão 1 do gene *ODC1* humano afeta a transcrição de *ODC1* (Guo *et al.*, 2000), e tem sido investigado como um marcador genético para o risco de adenoma colorretal (CRA) (Martinez *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2006; Hubner *et al.*, 2008). A frequência relatada do menor alelo-A é de aproximadamente 25 %, e, apesar de diferenças entre a raça / etnia, a distribuição do genótipo *ODC1* está no equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro de cada raça (O'Brien *et al.*, 2004; Zell *et al.*, 2009). Os indivíduos homozigóticos para o menor alelo-A de *ODC1* têm uma redução do risco da recorrência de adenoma em comparação com aqueles com o maior alelo-G (Martinez *et al.*, 2003; Hubner *et al.*, 2008). Para além disso, o alelo-A de *ODC1* (genótipo AA ou GA, mas não o genótipo GG) e o uso relatado de aspirina, têm sido associados com uma recorrência reduzida de pólipos do cólon (Martinez *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2006; Hubner *et al.*, 2008), e uma redução estatisticamente significativa de 50 % de redução do risco de adenomas avançados (Barry *et al.*, 2006). Seria uma grande vantagem se o genótipo *ODC1* afeta diferencialmente a recorrência de adenoma, as respostas do tecido a poliamina, os perfis de toxicidade, e como pode ser usado para determinar a adequação de tratamentos preventivos e curativos. Gerner e Meyskens (Clin. Cancer Res., 2009, 15 (3): 758-761) divulgam uma combinação de DFMO e de um NSAID para a prevenção do cancro do cólon.

Sumário da invenção

Assim, o presente pedido descreve as utilizações dirigidas para o tratamento, a prevenção e/ou o diagnóstico relacionado com a identificação do genótipo do paciente na posição +316 de pelo menos um alelo do gene promotor de

ODC1.

Num primeiro aspeto, a presente invenção proporciona uma composição que compreende a α -difluorometilornitina (DFMO) e um fármaco anti-inflamatório não-esteróide que não contém aspirina (NSAID), para o uso no tratamento preventivo ou curativo de carcinoma colo-retal ou de fatores de risco do mesmo num paciente, em que o genótipo do paciente na posição +316 de pelo menos um alelo do gene promotor de *ODC1* é G; e em que o tratamento dos fatores de risco do carcinoma colo-retal no paciente evita a formação de novos focos de criptas aberrantes, novos pólipos adenomatosos ou novos adenomas com displasia no paciente; opcionalmente, em que o paciente é um ser humano.

Num segundo aspeto, a presente invenção proporciona uma composição que compreende a α -difluorometilornitina (DFMO) para o uso no tratamento preventivo ou curativo de carcinoma colo-retal, ou de fatores de risco do mesmo, tal como definido em relação ao primeiro aspeto, num paciente, tal como definido em relação ao primeiro aspeto; em que o paciente é também administrado com uma composição que compreende um fármaco anti-inflamatório não-esteróide que não contém aspirina (NSAID), sendo ao paciente administrada a composição que compreende um NSAID que não contém aspirina antes, ao mesmo tempo, ou depois da administração da composição que compreende a DFMO.

Num terceiro aspeto, a presente invenção proporciona uma composição que compreende um fármaco anti-inflamatório não-esteróide que não contém aspirina (NSAID), para o uso no tratamento preventivo ou curativo de carcinoma colo-retal, ou fatores de risco do mesmo, tal como em relação ao primeiro aspeto, num paciente, tal como definido em relação ao primeiro aspeto; em que o paciente é também administrado com uma composição que compreende a α -difluorometilornitina (DFMO), sendo ao paciente administrada a composição que compreende a DFMO antes, ao mesmo tempo, ou após a

administração da composição que compreende o NSAID que não contém aspirina.

Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o NSAID que não contém aspirina aumenta a expressão de N^1 -acetiltransferase espermidina / espermina no paciente.

Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o genótipo do paciente na posição +316 de pelo menos um alelo do gene promotor de *ODC1* pode ter sido determinado pela receção de um relatório que contém o genótipo referido, ou tendo sido realizada uma história de paciente que revela os resultados. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, é determinado o genótipo do paciente na base do nucleótido na posição +316 de um alelo do gene promotor de *ODC1* do paciente. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, é determinado o genótipo do paciente na posição +316 de ambos os alelos do gene promotor de *ODC1*. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o genótipo do paciente na posição +316 de ambos os alelos do gene promotor de *ODC1* é GG. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o genótipo do paciente na posição +316 de ambos os alelos do gene promotor de *ODC1* é GA.

Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, as utilizações definidas compreendem ainda o aumento da dosagem da DFMO ou do NSAID que não contém aspirina, se o paciente já estava a ser tratado com a terapia farmacêutica, mas a uma dose mais baixa, antes de obter os resultados do teste. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, as utilizações definidas compreendem ainda o aumento da dosagem da DFMO e do NSAID que não contém aspirina, se o paciente já estava a ser tratado com a

terapia farmacêutica, mas a uma dose mais baixa, antes da obtenção dos resultados do teste.

Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o NSAID que não contém aspirina é um inibidor seletivo de COX-2. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o NSAID que não contém aspirina é sulindac ou celecoxib. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o NSAID que não contém aspirina é sulindac.

Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a utilização definida previne a formação de novos focos de criptas aberrantes no paciente. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a utilização definida previne a formação de novos pólipos adenomatosos no paciente. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a utilização definida previne a formação de novos adenomas com displasia no paciente.

Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a DFMO e o sulindac são administrados por via sistémica. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a DFMO e o sulindac são administrados por vias distintas. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a DFMO ou o NSAID que não contém aspirina é administrado por via oral, intra-arterial ou intravenosa. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a DFMO é administrada por via oral. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a quantidade eficaz de DFMO é de 500 mg/dia. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a DFMO é administrada por via intravenosa. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a

quantidade eficaz de DFMO é de desde cerca de 0,05 até cerca de 5,0 g/m²/dia. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a DFMO e o NSAID que não contém aspirina é formulado para a administração oral. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a DFMO e o NSAID que não contém aspirina é formulado como uma cápsula dura ou mole, ou um comprimido. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a DFMO e o NSAID que não contém aspirina é administrado a cada 12 horas. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a DFMO e o NSAID que não contém aspirina é administrado a cada 24 horas. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a quantidade eficaz de sulindac é de desde cerca de 10 até cerca de 1500 mg/dia. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a quantidade eficaz de sulindac é de desde cerca de 10 até cerca de 400 mg/dia. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a quantidade eficaz de sulindac é 150 mg/dia. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a DFMO é administrada antes do sulindac. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a DFMO é administrada após o sulindac. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a DFMO é administrada antes e depois do sulindac. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a DFMO é administrada simultaneamente com o sulindac. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a DFMO é administrada pelo menos uma segunda vez. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o sulindac é administrado pelo menos uma segunda vez.

Em variações em qualquer uma das realizações anteriores do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o paciente tem um tumor sólido, e o tumor sólido referido é ressecado, e, opcionalmente, são administrados DFMO e sulindac antes ou depois da ressecção referida.

Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o cancro colo-retal está no estadio I. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o cancro colo-retal está no estadio II. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o cancro colo-retal está no estadio III. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o cancro colo-retal está no estadio IV.

Em variações em qualquer uma das realizações anteriores do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a utilização definida previne a formação de novas neoplasias colo-retais avançadas no paciente. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a utilização definida previne a ototoxicidade ou o risco da mesma no paciente. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a utilização definida previne a formação de novas neoplasias colo-retais avançadas do lado direito. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, a utilização definida previne a formação de novas neoplasias colo-retais avançadas do lado esquerdo.

Em variações em qualquer uma das realizações anteriores do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o paciente foi identificado como tendo um ou mais pólipos adenomatosos no cólon, reto ou no apêndice. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o paciente foi identificado como tendo uma ou mais neoplasias colo-retais avançadas. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos

da invenção, o paciente foi identificado como tendo uma ou mais neoplasias colo-retais avançadas do lado esquerdo. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o paciente foi identificado como tendo uma ou mais neoplasias colo-retais avançadas do lado direito. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o paciente foi diagnosticado com polipose adenomatosa familiar. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o paciente foi diagnosticado com o síndrome de Lynch. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o paciente foi diagnosticado com cancro colo-retal familiar do tipo X. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o paciente satisfaz os critérios de Amesterdão, ou o critério II de Amesterdão. Em algumas realizações do primeiro, segundo e/ou do terceiro aspetos da invenção, o paciente tem uma história de ressecção de um ou mais adenomas colo-retais.

Em variações de qualquer uma das realizações anteriores, o paciente é humano.

A utilização da palavra "um" ou "uma", quando utilizada em conjunção com o termo "que compreende" nas reivindicações e/ou na especificação, pode significar "um", mas também é consistente com o significado de "um ou mais", "pelo menos um" e "um ou mais de um".

Ao longo deste pedido, o termo "cerca de" é usado para indicar que um valor inclui a variação inerente de erro para o dispositivo, do método utilizado para determinar o valor, ou da variação que existe entre os sujeitos do estudo.

Os termos "compreender", "ter" e "incluir" são verbos de ligação abertos. Todas as formas ou tempos verbais de um ou mais destes verbos, tal como "compreende", "compreendendo", "tem", "tendo", "inclui" e "incluindo",

são também abertos. Por exemplo, qualquer método que "compreende", "tem" ou "inclui" uma ou mais etapas não se limita a apenas aqueles que possuem uma ou mais etapas, e abrange também outras etapas não listadas.

O termo "eficaz", tal como o termo é usado na especificação e/ou nas reivindicações, significa adequado para alcançar um resultado desejado, esperado ou pretendido.

Tal como é aqui utilizado, o termo "IC₅₀" refere-se a uma dose inibidora que é 50 % da resposta máxima obtida.

Tal como é aqui utilizado, o termo "paciente" ou "sujeito" refere-se a um organismo mamífero vivo, tal como um ser humano, um macaco, uma vaca, uma ovelha, uma cabra, um cão, um gato, um ratinho, um rato, uma cobaia, ou espécies transgênicas das mesmas. Em certas realizações, o doente ou sujeito é um primata. Os exemplos não limitativos de sujeitos humanos são adultos, adolescentes, crianças e fetos.

"Farmaceuticamente aceitável" significa o que é útil na preparação de uma composição farmacêutica que é geralmente segura, não tóxica, e nem biologicamente nem de outro modo indesejável, e inclui a que é aceitável para o uso veterinário, bem como para o uso farmacêutico humano.

"Prevenção" ou "previne" inclui: (1) a inibição do aparecimento de uma doença num sujeito ou paciente que pode estar em risco e/ou predisposto para a doença, mas que ainda não sofre ou exhibe qualquer uma ou todas patologias ou sintomatologias da doença, e/ou (2) o atraso do aparecimento da patologia ou sintomatologia da doença num sujeito ou paciente que pode estar em risco e/ou predisposto para a doença, mas que ainda não sofre ou exhibe qualquer uma ou todas patologias ou sintomatologias da doença.

"Quantidade eficaz", "quantidade terapeuticamente eficaz" ou "quantidade farmacêuticamente eficaz" significa a quantidade que, quando administrada a um sujeito ou

paciente para o tratamento de uma doença, é suficiente para efetuar esse tratamento para a doença.

"Tratamento" ou "tratar" inclui (1) a inibição de uma doença num sujeito ou paciente que sofre ou exibe a patologia ou a sintomatologia da doença (por exemplo, parando o desenvolvimento adicional da patologia e/ou da sintomatologia), (2) a melhoria de uma doença num sujeito ou paciente que sofre ou exibe a patologia ou a sintomatologia da doença (por exemplo, revertendo a patologia e/ou a sintomatologia), e/ou (3) efetuar qualquer diminuição mensurável numa doença num sujeito ou paciente que sofre ou exibe a patologia ou a sintomatologia da doença.

As definições anteriores substituem qualquer definição conflitiva em qualquer uma das referências aqui citadas. No entanto, o facto de alguns termos serem definidos não deve ser considerado como indicativo de que qualquer termo que não está definido é indeterminado. Pelo contrário, todos os termos usados acreditam-se ser para descrever a invenção em termos que um perito poderá apreciar o âmbito e a prática da presente invenção.

Outros objetos, características e vantagens da presente divulgação serão evidentes a partir da descrição detalhada que se segue. No entanto, deve ser entendido que a descrição detalhada e os exemplos específicos, embora indicando realizações específicas da invenção, são dados apenas a título de ilustração, uma vez que serão evidentes para os peritos na tecnologia várias alterações e modificações a partir desta descrição detalhada.

Breve descrição dos desenhos

Os desenhos que se seguem formam parte da presente especificação, e estão incluídos para demonstrar melhor certos aspetos da presente divulgação. A invenção pode ser

melhor compreendida por referência a um destes desenhos em combinação com a descrição detalhada das realizações específicas aqui apresentadas.

Figura 1 - Efeitos diferenciais da regulação de poliamina por *MAD1* e *c-MYC*. Esquema que ilustra os efeitos diferenciais propostos da regulação de poliamina por *MAD1* e *c-MYC* na posição +316 do alelo-A menor de *ODC1*. Também são mostrados os efeitos do inibidor DFMO (difluorometilornitina) de ODC.

Figura 2 - Estimativas da taxa de sobrevivência específica de cancro colo-retal. Esta figura mostra as estimativas de Kaplan-Meier da taxa de sobrevivência específica de cancro colo-retal para os casos de cancro colo-retal em estadio III, estratificadas pelo genótipo +316 de *ODC1*. São incluídos os casos do estudo gene - ambiente de cancro colo-retal familiar da Universidade Irvine da Califórnia diagnosticados durante o período de 1994-1996, com seguimento até março de 2008: *ODC1* GG (64 casos, 15 mortes específicas de cancro colo-retal), *ODC1* GA/AA (62 casos, 25 mortes específicas de cancro colo-retal).

Figuras 3A e B - Localização e análise do promotor SNP de *ODC1*. A figura A mostra o A, localização do promotor SNP de *ODC1*. O SNP sob investigação neste estudo está 316 nucleótidos a 3' do local de início da transcrição de *ODC1* (*). Este SNP reside entre duas "E-boxes" consenso, tal como mostrado pelas sequências sublinhadas, e afeta um local de restrição PstI (caixa) (SEQ ID NO: 5). A figura 3B mostra uma análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição de SNP de *ODC1*. O ADN foi obtido a partir de dois tipos de células, e foi sequenciada a região em redor do local SNP de *ODC1*. As células HT29 derivadas do cólon foram descobertas serem heterozigóticas em AG, enquanto

que as células HCT116 foram descobertas serem homozigóticas em GG, no locus SNP de *ODC1*. Foi obtido um produto de PCR de 350 pb desta região a partir de cada tipo de células e sujeito a digestão com PstI. Foram indicadas evidências de um alelo-A por produtos de restrição < 350 pb.

Figuras 4A e B - Expressão de "E-box" e análise de imunoprecipitação. Localização do promotor SNP de *ODC1*.

A figura 4A mostra a expressão de proteína "E-box" em células derivadas de cólon. Foi avaliada por análise de "Western blot" a expressão de proteínas a serem avaliadas para a ligação com o SNP +316 de *ODC1*. Os extratos de ambas as células HT29 e HCT116 foram avaliados para *c-MYC*, *MAD1*, e *MAD4*; a β -actina foi utilizada como um controlo de carga. A figura 4B mostra a documentação para a ligação do fator de transcrição específica do alelo por análise de imunoprecipitação da cromatina, a qual foi realizada tal como descrita na secção de exemplos que se segue. As células HT29 foram uma fonte de alelos-A de *ODC1*, uma vez que estas células são heterozigóticas em GA neste local. As células HCT116 foram usadas como uma fonte de alelos-G de *ODC1*.

Figuras 5A e B - Efeitos da expressão de *c-MYC* e *MAD1* na atividade de *ODC1*.

A figura 5A mostra o efeito da expressão de *c-MYC* na atividade do promotor específico de alelo de *ODC1* em células derivadas de cólon HT29. A atividade do promotor foi medida após a transfeção com plasmídeos repórter com o promotor de *ODC1* cotransfectados com o plasmídeo pcADN 3.0 ou com o vetor de expressão CMV-MYC. As construções de promotor diferem pela presença do primeiro elemento "E-box", localizado em -485 a -480 pb ("wt E-box1" para a sequência do tipo selvagem ou "mut E-box1" para uma sequência mutante). As construções também diferem pelo

SNP +316 de *ODC1* (" +316 G" ou " +316 A"). *, $P \leq 0,013$ para cada uma das quatro comparações relativas à atividade do promotor com a cotransfecção de pcADN 3.0. A figura 5B mostra o efeito da expressão de *MAD1* na atividade do promotor específico de alelo de *ODC1* em células derivadas de tumor do cólon HT29. A atividade do promotor foi medida após a transfecção com plasmídeos repórter com o promotor de *ODC1* cotransfetados com o plasmídeo pcADN 3.1 ou com um plasmídeo pcADN-*MAD1*. As construções de promotor utilizadas foram descritas na legenda para o painel A desta figura. *, $P = 0,027$, significância estatística em relação à atividade do promotor com a cotransfecção de pcADN 3.1.

Figura 6 – Redução de pólipos adenomatosos. Esta figura mostra a percentagem de recorrência de pólipos adenomatosos de pacientes que foram tratados com DFMO e sulindac em comparação com o placebo. Houve uma redução de 70 % no total de adenomas, uma redução de 92 % em adenomas avançados, e uma redução de 95 % em adenomas múltiplos.

Figura 7 – Benefício farmacogenómico / análise de risco com base no genótipo +316 de *ODC1*. Esta figura compara a redução em % da recorrência de adenomas ao fim de 3 anos versus o placebo, com a % de ototoxicidade para os grupos de tratamento e de placebo como uma função do genótipo +316 de *ODC1* do paciente. A ototoxicidade foi determinada utilizando o teste audiométrico.

Figuras 8A-C – Benefício farmacogenómico / análise de risco com base no genótipo +316 de *ODC1*. Esta figura compara o benefício, a redução em % da recorrência de adenomas ao fim de 3 anos, com o risco, a % de ototoxicidade, para os grupos de tratamento e de placebo como uma função do genótipo +316 de *ODC1* do paciente. A ototoxicidade foi determinada utilizando o

teste audiométrico.

Figura 9 - Número médio de tumores por tamanho no cólon de ratinhos *Min/+*. Esta figura mostra o número médio de tumores por tamanho no cólon dos três grupos de tratamento em comparação com os controles sem tratamento. Os ratinhos, adquiridos a partir de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Me.), foram criados cruzando machos C57BL/6J-*Apc*^{Min/+} e fêmeas C57/BL6. Os ratinhos heterozigóticos para *Min* (*Apc*^{Min}/*Apc*⁺): (heterozigóticos para uma mutação sem sentido no codão 850 de *Apc*) foram identificados por genotipagem no desmame, por um ensaio de PCR específico de alelo usando ADN da ponta da cauda. Os ratinhos homozigóticos (*Apc*⁺/*Apc*⁺) da mesma ninhada serviram como controle. Um tratamento consistiu em suplementar a água potável com 2 % de DFMO (Merrell Dow Research Inst.) no 8º dia do estudo. No outro tratamento, foram adicionados 167 ppm de sulindac (Harlen Teklad) à dieta AIN-93G de ratinho no 21º dia do estudo. O terceiro tratamento foi uma combinação de DFMO e de sulindac. Após 114 dias, os ratinhos foram sacrificados por asfixia com CO₂. Foram removidos segmentos do intestino delgado e do cólon de ratinhos, e foram dissecados longitudinalmente, montados e fixados em 70 % de etanol, e colocados a 4 °C para pontuar tumores.

Também foram retirados tecidos representativos para avaliação histopatológica.

Figura 10 - Número médio de tumores por tamanho do intestino delgado de ratinhos *Min/+*. Esta figura mostra o número médio de tumores por tamanho no intestino delgado dos três grupos de tratamento em comparação com os controles sem tratamento. Para os detalhes experimentais veja-se a descrição anterior da figura 9.

Figura 11 - Número de adenomas de elevado grau como uma função da terapia em ratinhos *Min/+*. Esta figura mostra

como o número de adenomas de elevado grau varia dependendo do tipo de terapia. Para os detalhes experimentais veja-se a descrição anterior da figura 9.

Descrição de realizações ilustrativas

O presente pedido descreve métodos e utilizações que compreendem prever a adequação, a eficácia, a toxicidade e/ou a dosagem das terapias combinadas anticarcinoma que compreendem a α -difluorometilornitina (DFMO) e um fármaco anti-inflamatório não-esteróide que não contém aspirina (NSAID), que atua como um agonista de expressão de N^1 -acetiltransferase espermidina / espermina, com base, pelo menos em parte, no genótipo promotor de *ODC1* do paciente. A invenção é limitada à prevenção ou ao tratamento de carcinoma colo-retal, ou aos fatores de risco do mesmo, em pacientes com o genótipo especificado na reivindicação 1.

A presente invenção envolve a entrega dos compostos terapêuticos mencionados anteriormente aos indivíduos que exibem sintomas pré-cancerosos, para prevenir o aparecimento de carcinoma colo-retal e/ou para prevenir o aparecimento de fatores de risco do mesmo, tais como a formação de novos focos de criptas aberrantes, a formação de novos pólipos adenomatosos ou de novos adenomas com displasia. As células desta categoria incluem pólipos e outras lesões pré-cancerosas, pré-malignas, pré-neoplásicas ou outro fenótipo aberrante, indicando a progressão provável para um estado canceroso, com base, pelo menos em parte, no genótipo promotor de *ODC1* do paciente.

I. Metabolismo de poliaminas

O excesso de formação de poliaminas tem sido há muito implicado na carcinogénese epitelial, especialmente a carcinogénese colo-retal. As poliaminas são pequenas

moléculas ubíquas envolvidas em vários processos, incluindo a transcrição, a estabilização de ARN, a abertura e fecho do canal de iões, e outros (Wallace, 2000). A ornitina descarboxilase (ODC), a primeira enzima na síntese de poliamina, é essencial para o desenvolvimento normal e reparação de tecidos em mamíferos, mas é sub-regulada na maioria dos tecidos adultos (Gerner e Meyskens, 2004). As múltiplas anomalias no controlo do metabolismo de poliamina e transporte, resultam num aumento dos níveis de poliamina que pode promover a tumorigénese em vários tecidos (Thomas e Thomas, 2003).

O metabolismo de poliamina é sobrerregulado em tecidos epiteliais intestinais de seres humanos com polipose adenomatosa familiar (FAP) (Giardiello et al., 1997), um síndrome associado com alto risco de cancro do cólon e de outros cancros.

A FAP pode ser causada por mutações no gene supressor de tumor de polipose adenomatosa coli (APC), e a sinalização de APC foi mostrada regular a expressão de ODC tanto em células humanas (Fultz e Gerner, 2002) como num modelo de ratinho de FAP (Erdman et al., 1999).

A expressão de APC do tipo selvagem leva a uma diminuição da expressão de ODC, enquanto que a APC mutante leva a um aumento da expressão de ODC. O mecanismo de regulação de ODC dependente de APC envolve fatores de transcrição "E-box", incluindo o ativador de transcrição *c-MYC*, e o repressor de transcrição *MAD1* (Fultz e Gerner, 2002; Martinez et al., 2003). *c-MYC* foi demonstrado por outros regular a transcrição de ODC (Bellofernandez et al., 1993). Vários genes envolvidos no metabolismo de poliamina são genes essenciais para o crescimento ótimo na maioria dos organismos, e são sub-regulados em células e tecidos não proliferativos e/ou adultos (Gerner e Meyskens, 2004). As poliaminas influenciam fenótipos celulares específicos, em parte, por afetarem os padrões de expressão de genes,

tal como revisto em outra parte (Childs et al., 2003).

Tal como descrito em seguida, uma estratégia que envolve a inibição da atividade de ODC (ou seja, a enzima limitante da velocidade da síntese de poliamina), e/ou a redução dos níveis de poliamina celular, demonstrou uma eficácia notável na prevenção da recorrência de pólipos colo-retais em humanos. Os resultados epidemiológicos e experimentais da presente pesquisa demonstram a regulação condicional da homeostase de poliamina por polimorfismo genético em ODC, e sugerem um modelo em que o SNP +316 de ODC pode ser protetor para a recorrência de adenoma do cólon, e prejudicial para a sobrevivência após o diagnóstico de cancro do cólon. Esta informação pode ser usada para determinar o prognóstico do cancro do cólon. Ao identificar pacientes com risco aumentado de progressão / recorrência de cancro, pode ser instituída uma rápida implementação de estratégias de gestão da prevenção terciária. Para além disso, esta pesquisa pode ser usada para identificar pacientes com cancro colo-retal loco-regional de alto risco, mas de outro modo tratados de forma otimizada, que beneficiariam de terapias de prevenção terciárias do cancro.

Dependendo da dieta de um paciente, o problema de excesso de poliamina pode ser agravado pelo facto de que as poliaminas, por exemplo, a putrescina, estão presentes em muitos alimentos comuns, tais como no sumo de laranja, o qual contém cerca de 400 ppm de putrescina. A este respeito, uma dieta rica em poliamina é contraindicada, e para algumas das realizações aqui proporcionadas dita dieta deve ser evitada. Veja-se o pedido provisório de patente U.S. por Kavitha P. Raj, Jason A. Zell, Christine E. McLaren, Eugene W. Gerner, Frank L. Meyskens e Jeffrey Jacob, intitulado "Cancer prevention and treatment methods based on dietary polyamine content", submetido a 14 de maio de 2010.

II. Polipose adenomatosa familiar

A polipose adenomatosa familiar (FAP), um síndrome de polipose hereditário, é o resultado de uma mutação da linha germinativa do gene supressor de tumor de polipose adenomatosa coli (APC) (Su *et al.*, 1992). Esta condição autossômica dominante com expressão variável está associada com o desenvolvimento de centenas de adenomas do cólon, que progressam uniformemente para adenocarcinoma aos 40 anos de idade, duas décadas antes do que a idade média de diagnóstico para cancro de cólon esporádico (Bussey, 1990). Em estudos anteriores de indivíduos pré-sintomáticos com FAP foi detetado aumento dos níveis das poliaminas espermidina e espermina, e do seu precursor diamina a putrescina, em biópsias colo-retais aparentemente normais, quando comparadas aos controlos normais de um membro da família (Giardiello *et al.*, 1997). A atividade da ornitina descarboxilase (ODC), a primeira e a enzima limitante da velocidade na síntese de poliamina em mamíferos, é também elevada em biópsias de mucosas do cólon de aparência normal de pacientes com FAP (Giardiello *et al.*, 1997; Luk e Baylin, 1984). Estes resultados são de interesse, uma vez que as poliaminas são necessárias para a proliferação celular ótima (Pegg, 1986). Para além disso, a supressão de atividade de ODC, utilizando o inibidor irreversível ativado por enzima, DFMO, inibe a carcinogénese do cólon em roedores tratados com carcinogénios (Kingsnorth *et al.*, 1983; Tempero *et al.*, 1989).

Tal como discutido em maior detalhe em seguida, o ratinho Min (neoplasia intestinal múltipla), que partilha um genótipo mutado *APC/apc* com a FAP, serve como um modelo animal experimental útil para pacientes humanos com FAP (Lipkin, 1997). O ratinho Min pode desenvolver mais de 100 adenomas / adenocarcinomas gastrointestinais ao longo de todo o trato gastrointestinal aos 120 dias de vida, que

levam à hemorragia gastrointestinal, obstrução e morte. Uma terapia de combinação de DFMO e sulindac mostrou ser eficaz na redução de adenomas nestes ratinhos (patente US nº. 6 258 845; Gerner e Meyskens, 2004). Os resultados do tratamento de ratinhos Min quer com DFMO sozinho, sulindac sozinho, ou uma combinação de DFMO e sulindac, na formação de tumores quer no cólon ou no intestino delgado são mostrados nas figuras 9-11.

III. Polimorfismo de ornitina descarboxilase-1

A atividade da ornitina descarboxilase (ODC), a primeira enzima na síntese de poliamina, é necessária para o crescimento normal, e está elevada em muitos tipos de cancro, incluindo o cancro colo-retal. Foram examinadas aqui associações do polimorfismo de nucleótido único (SNP) +316 de ODC com sobrevivência específica de cancro colo-retal (CRC) entre os casos de CRC, e foi investigado o seu significado funcional em células de cancro do cólon.

Um polimorfismo de nucleótido único (SNP) no intrão-1 do gene *ODC1* humano afeta a transcrição de *ODC1* (Guo *et al.*, 2000), e tem sido investigado como um marcador genético para o risco de adenoma colo-retal (CRA) (Martinez *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2006; Hubner *et al.*, 2008). A frequência relatada do menor alelo-A é de aproximadamente 25 % e, apesar de diferenças entre a raça / etnia, a distribuição do genótipo de *ODC1* está em equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro de cada raça (O'Brien *et al.*, 2004; Zell *et al.*, 2009). Os indivíduos homozigóticos para o menor alelo-A de *ODC1* têm uma redução do risco de recorrência de adenoma em comparação com aqueles com o maior alelo-G (Martinez *et al.*, 2003; Hubner *et al.*, 2008). Para além disso, o alelo-A de *ODC1* (genótipo AA ou GA, mas não o genótipo GG) e o uso relatado de aspirina têm sido associados com uma redução da recorrência de pólipos do

cólon (Martinez et al., 2003; Barry et al., 2006; Hubner et al., 2008), e uma redução estatisticamente significativa de 50 % de redução de risco de adenomas avançados (Barry et al., 2006).

Foi investigada a ligação específica do alelo de ODC de fatores de transcrição "E-box", e foi avaliado o significado funcional do SNP +316 de ODC, localizado entre duas "E-boxes" ("E-box" 2 e 3, tal como representado na figura 2A). Cada genótipo de linha de células influencia um local de restrição PstI consenso nesta região. A figura 2B mostra que um produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), feito a partir de células HT29 de cólon humano, foi parcialmente sensível ao corte com PstI, o que sugere que estas células continham pelo menos um alelo-A de ODC. Um produto de PCR feito a partir de células HCT116 de cólon humano, utilizando os mesmos oligonucleótidos iniciadores, foi insensível à ação de PstI, o que implica que estas células continham apenas alelos-G de ODC. Este resultado foi confirmado através de sequenciação direta de ADN.

Foi estabelecida por Western blot a expressão de proteínas de ligação "E-box" específicas, incluindo o ativador de transcrição *c-MYC* e vários repressores de transcrição em células HT29 e HCT116 (por exemplo, *MAD1* e *MAD4*) (figura 3A). Foi realizada a análise de imunoprecipitação de cromatina (CHIP) da região em redor do promotor +316 de ODC, utilizando anticorpos dirigidos contra estas proteínas. Tal como mostrado na figura 3B, os produtos de PCR específicos do promotor de ODC foram sintetizados a partir de ADN de HT29, obtido após a imunoprecipitação da cromatina com anticorpos dirigidos contra *c-MYC*, *MAD1* ou *MAD4*. Os produtos de PCR sintetizados a partir de ADN de HCT116 depois de imunoprecipitação da cromatina semelhante, foram substancialmente reduzidos em comparação com os sintetizados a partir de ADN de HT29. A quantificação destes resultados indicou que a ligação de *c-*

MYC, *MAD1*, e *MAD4* à região SNP de ODC foi de 4-14 vezes superior nas células HT29, que continham um alelo-A de ODC, em comparação com as células HCT116, que continham apenas alelos-G de ODC.

Foi avaliada a atividade do promotor específico do alelo de ODC. A hipótese de que o SNP +316 de ODC influenciou a expressão de ODC de uma forma dependente da expressão de ativadores e repressores de "E-box" foi testada tal como se segue. A cotransfecção transiente de células HT29 derivadas de cancro do cólon foi realizada com construções de promotor específico de alelo de ODC, em combinação com vetores que expressam quer o ativador de transcrição *c-MYC* ou o repressor *MAD1* (figuras 4A e B). As barras de erro padrão mostradas refletem a variabilidade nas medições em triplicado dentro de uma única experiência representativa, que foi replicada. Os repórteres de promotores específicos de alelo utilizados nestas experiências incluíram todos as três "E-boxes" mostradas na figura 2A. Tal como mostrado na figura 4A, a expressão de *c-MYC* teve o maior efeito estimulante sobre os promotores que continham três "E-boxes" consenso e o alelo-A de ODC ("E-box1" +316 A do tipo selvagem, $P = 0,0014$). A exclusão da "E-box" a montante reduziu a atividade do promotor, mas a expressão de *c-MYC* continuou a estimular esta atividade ("E-box1" +316 A mutante, $P = 0,0013$). A substituição de uma G por uma A na posição +316 do SNP reduziu a capacidade de *c-MYC* para estimular a atividade do promotor, mesmo com uma "E-box" consenso intacta a flanquear a 5'. A mutação da "E-box" consenso a flanquear a 5', em combinação com o alelo-G de ODC, reduziu ainda mais a atividade do promotor.

Quando foi cotransfetado *MAD1*, em vez de *c-MYC*, com os repórteres de promotores específicos de alelo de ODC (figura 4B), o repressor apenas foi capaz de reduzir a atividade do promotor de ODC que continha todas as três "E-boxes" e o alelo-A +316 do tipo selvagem ($P = 0,027$). A

exclusão da "E-box" a montante ("E-box" 1 +316A mutante) reduziu significativamente o efeito de *MAD1* na atividade do promotor de ODC. A substituição de uma G por uma A na posição +316 originou promotores contendo duas ou três "E-boxes" que não respondem à supressão por *MAD1*.

IV. Difluorometilornitina (DFMO)

A DFMO, também conhecida como eflornitine, tem a denominação química que se segue; 2-(difluorometil)-*dl*-ornitina. É um inibidor irreversível ativado por enzima da ornitina descarboxilase (ODC), a enzima limitante da velocidade da via de biossíntese de poliamina. Como um resultado desta inibição da síntese de poliamina, o composto é eficaz na prevenção da formação de cancro em diversos sistemas de órgãos, na inibição do crescimento do cancro, e na redução do tamanho do tumor. Também tem ação sinérgica com outros agentes antineoplásicos.

A DFMO foi demonstrada diminuir a tumorigénese intestinal dependente de APC em ratinhos (Erdman *et al.*, 1999). A DFMO oral administrada diariamente a seres humanos inibe a atividade da enzima ODC e os teores de poliamina numa variedade de tecidos epiteliais (Love *et al.*, 1993; Gerner *et al.*, 1994; Meyskens *et al.*, 1994; Meyskens *et al.*, 1998; Simoneau *et al.*, 2001; Simoneau *et al.*, 2008). Recentemente, os inventores relataram que a DFMO em combinação com o fármaco anti-inflamatório não-esteróide (NSAID) sulindac, tem sido relatada reduzir significativamente a taxa de recorrência de adenoma entre indivíduos com adenomas do cólon quando comparado com placebos num ensaio clínico aleatório (Meyskens *et al.*, 2008).

A DFMO foi sintetizada originalmente pelo Centre de Recherche Merrell, Estrasburgo; as aprovações atuais da FDA incluem

- Doença do sono Africano. Dosagem sistémica IV de elevadas doses de forma não comercializada (Sanofi / OMS)
- Hirsutis (excesso de crescimento de cabelo induzido por androgénio) forma de dosagem tópica

Atualmente não existem formulações orais aprovadas.

A DFMO e a sua utilização no tratamento da hipertrofia prostática benigna estão descritas em duas patentes, patentes U.S. nº. 4 413 141 e 4 330 559. A patente U.S. nº. 4 413 141 descreve a DFMO como sendo um inibidor potente de ODC, tanto *in vitro* como *in vivo*. A administração de DFMO provoca uma diminuição nas concentrações de putrescina e de espermidina nas células em que estas poliaminas são normalmente produzidas ativamente. Para além disso, a DFMO demonstrou ser capaz de reduzir a velocidade de proliferação de células neoplásicas, quando testada em modelos tumorais padrão. A patente U.S. nº. 4 330 559 descreve o uso de DFMO e de derivados de DFMO para o tratamento da hipertrofia prostática benigna. A hipertrofia prostática benigna, como muitos estados de doença caracterizados por rápida proliferação celular, é acompanhada por uma elevação anormal da concentração de poliamina. O tratamento descrito nesta referência pode ser administrado a um paciente quer por via oral, ou parentérica.

A DFMO pode, potencialmente, ser administrada continuamente com efeitos antitumorais significativos. Este fármaco é relativamente não tóxico em doses baixas de 0,4 g/m²/dia a seres humanos, ao mesmo tempo que produz inibição da síntese de putrescina em tumores. Os estudos num modelo de tumor em rato demonstraram que a infusão de DFMO pode produzir uma diminuição de 90 % nos níveis de putrescina do tumor, sem suprimir as contagens de plaquetas

periféricas.

Os efeitos secundários observados com a DFMO incluem efeitos na audição em doses elevadas de $4 \text{ g/m}^2/\text{dia}$, que se solucionam quando é interrompida. Estes efeitos sobre a audição não são observados com doses mais baixas de $0,4 \text{ g/m}^2/\text{dia}$, quando administrada durante até um ano (Meyskens *et al.*, 1994). Para além disso, são observados alguns casos de tontura / vertigem que se solucionam quando o fármaco é interrompido. A trombocitopenia foi predominantemente relatada em estudos utilizando elevadas doses "terapêuticas" de DFMO ($> 1,0 \text{ g/m}^2/\text{dia}$), e principalmente em pacientes com cancro que foram submetidos previamente a quimioterapia, ou em pacientes com a medula óssea comprometida. Embora a toxicidade associada com a terapia de DFMO não é, em geral, tão grave como outros tipos de quimioterapia, em ensaios clínicos limitados verificou-se promover uma trombocitopenia relacionada com a dose. Para além disso, os estudos em ratos demonstraram que a infusão contínua de DFMO durante 12 dias reduz significativamente o número de plaquetas em comparação com os controlos. Outras investigações têm feito observações semelhantes, em que a trombocitopenia é a principal toxicidade da terapia IV contínua de DFMO. Estas descobertas sugerem que a DFMO pode inibir significativamente a atividade de ODC dos precursores da medula óssea de megacariócitos. A DFMO pode inibir processos de reparação de proliferação, tais como a reparação epitelial de feridas.

Um ensaio clínico de fase III avaliou a recorrência de pólipos adenomatosos após o tratamento durante 36 meses com difluorometilornitina (DFMO) mais sulindac, ou com placebos combinados. A perda auditiva temporária é uma toxicidade conhecida do tratamento com a DFMO, assim, foi desenvolvida uma abordagem abrangente para analisar audiogramas de condução de ar de série. O método de equação estimativa generalizada estimou a diferença média entre os grupos de

tratamento, no que diz respeito a alterações nos limiares de condução de ar de tons puros, ao mesmo tempo que tinha em conta a correlação intrassujeito devido a medidas repetidas em frequências. Com base em 290 sujeitos, houve uma diferença média de 0,50 dB entre sujeitos tratados com DFMO mais sulindac, em comparação com aqueles tratados com placebo (intervalo de confiança de 95 %, -0,64 a 1,63 dB; $P = 0,39$), ajustada para os valores da linha de base, idade, e frequências. Na gama de fala normal de 500 a 3000 Hz, foi detetada uma diferença estimada de 0,99 dB (-0,17 a 2,14 dB; $P = 0,09$). A intensidade da dose não adicionou informação aos modelos. Foram 14 de 151 (9,3 %) no grupo de DFMO mais sulindac e 4 de 139 (2,9 %) no grupo de placebo que sofreram pelo menos uma diminuição da audição de 15 dB a partir da linha de base, em duas ou mais frequências consecutivas ao longo de toda a gama testada ($P = 0,02$). O seguimento da condução aérea feita pelo menos 6 meses após o final do tratamento mostrou uma diferença média ajustada nos limiares auditivos de 1,08 dB (-0,81 a 2,96 dB; $P = 0,26$) entre os grupos de tratamento. Não houve nenhuma diferença significativa na proporção de sujeitos no grupo de DFMO mais sulindac que sofreram de perda auditiva clinicamente significativa em comparação com o grupo de placebo. O risco atribuível estimado de ototoxicidade da exposição ao fármaco é de 8,4 % (intervalo de confiança de 95 %, -2,0 % a 18,8 %, $P = 0,12$). Há uma diferença < 2 dB no limiar médio para os pacientes tratados com DFMO mais sulindac em comparação com aqueles tratados com o placebo. Os resultados deste estudo são discutidos em maior detalhe em McLaren et al., 2008. São aqui proporcionados métodos para reduzir e/ou prevenir a ototoxicidade em pacientes tratados com agentes, tais como a DFMO e o sulindac.

V. NSAID

Os NSAID são agentes anti-inflamatórios que não são esteroides. Para além de ações anti-inflamatórias, têm ações analgésicas, antipiréticas e de inibição de plaquetas. São utilizados principalmente no tratamento de condições artríticas crónicas e certos distúrbios dos tecidos moles associados com a dor e a inflamação. Atuam bloqueando a síntese de prostaglandinas por inibição da ciclooxigenase, que converte o ácido araquidónico em endoperóxidos cíclicos, precursores de prostaglandinas. A inibição da síntese de prostaglandina representa as suas ações analgésicas, antipiréticas, e de inibição de plaquetas; outros mecanismos podem contribuir para os seus efeitos anti-inflamatórios. Certos NSAID também podem inibir as enzimas lipoxigenase ou a fosfolipase C, ou podem modular a função das células-T (AMA Drug Evaluations Annual, 1814-5, 1994).

Os fármacos anti-inflamatórios não-esteroides (NSAID), incluindo a aspirina, o ibuprofeno, o piroxicam (Reddy *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 1994), a indometacina (Narisawa, 1981), e o sulindac (Piazza *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1995), inibem eficazmente a carcinogénese do cólon no modelo de rato tratado com AOM. Os NSAID também inibem o desenvolvimento de tumores que albergam um Ki-ras ativado (Singh e Reddy, 1995). Os NSAID parecem inibir a carcinogénese através da indução de apoptose em células tumorais (Bedi *et al.*, 1995; Lupulescu, 1996; Piazza *et al.*, 1995; Piazza *et al.*, 1997b). Um número de estudos sugerem que as propriedades quimiopreventivas dos NSAID, incluindo a indução da apoptose, é uma função da sua capacidade para inibir a síntese de prostaglandina (revisto em DuBois *et al.*, 1996; Lupulescu, 1996; Vane e Botting, 1997). No entanto, os estudos indicam que os NSAID podem atuar através de ambos os mecanismos, dependentes de prostaglandina e independentes de prostaglandina (Alberts

et al., 1995; Piazza *et al.*, 1997a; Thompson *et al.*, 1995; Hanif, 1996). A sulfona de sulindac, um metabolito do NSAID sulindac, não tem atividade inibidora de COX, no entanto, induz a apoptose em células tumorais (Piazza *et al.*, 1995; Piazza *et al.*, 1997b), e inibe o desenvolvimento do tumor em vários modelos de carcinogênese em roedores (Thompson *et al.*, 1995; Piazza *et al.*, 1995, 1997a).

Foram examinados vários NSAID pelos seus efeitos em ensaios clínicos humanos. Um ensaio de fase IIa (um mês) de ibuprofeno foi completado, e até mesmo com a dose de 300 mg/dia, foi observada uma diminuição significativa nos níveis de prostoglandina E₂ (PGE₂) na mucosa plana. Uma dose de 300 mg de ibuprofeno é muito baixa (as doses terapêuticas variam desde 1200-3000 mg/dia ou mais), e é improvável de ser vista toxicidade, mesmo a longo prazo. No entanto, em modelos animais de quimioprevenção, o ibuprofeno é menos eficaz do que outros NSAID.

A. Sulindac e os seus principais metabolitos, sulfona de sulindac e sulfureto de sulindac

O sulindac é um derivado de indeno, anti-inflamatório, não-esteróide, com a designação química que se segue; ácido (Z)-5-fluoro-2-metil-1-((4 (metilsulfinil) fenil) metileno) 1H-indeno-3-acético (Physician's Desk Reference, 1999). A porção sulfinilo é convertida *in vivo* por redução reversível a um metabolito de sulfureto, e por oxidação irreversível a um metabolito de sulfona (exisulind). Veja-se a patente U.S. 6 258 845. O sulindac, que também inibe a ativação de Ki-ras, é metabolizado em duas moléculas diferentes, que diferem na sua capacidade para inibir COX, no entanto, ambas são capazes de exercer efeitos quimiopreventivos através da indução de apoptose. A sulfona de sulindac não tem atividade inibidora de COX, e o mais provável é facilitar a indução de apoptose de uma maneira independente da síntese de prostaglandina. As evidências

disponíveis indicam que o derivado de sulfureto é pelo menos um dos compostos biologicamente ativos. Com base nisto, o sulindac pode ser considerado um pró-fármaco.

O sulindac (Clinoril®) está disponível, por exemplo, como comprimidos de 150 mg e de 200 mg. A dosagem mais comum para adultos é de 150 a 200 mg duas vezes por dia, com uma dose máxima diária de 400 mg. Após a administração oral, cerca de 90 % do fármaco é absorvido. Os níveis máximos no plasma são alcançados em cerca de 2 horas em pacientes em jejum, e de 3 a 4 horas quando administrados com alimento. A semivida média de sulindac é de 7,8 horas: a semivida média do metabolito de sulfureto é de 16,4 horas. As patentes U.S. nº. 3 647 858 e 3 654 349 cobrem preparações de sulindac.

O sulindac está indicado para o alívio agudo e de longo prazo de sinais e sintomas de osteoartrite, artrite reumatoide, espondilite anquilosante, artrite gotosa aguda, e ombro doloroso agudo. Os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios exercidos pelo sulindac (400 mg por dia) são comparáveis aos obtidos pela aspirina (4 g por dia), ibuprofeno (1200 mg por dia), indometacina (125 mg por dia), e fenilbutazona (400 a 600 mg por dia). Os efeitos secundários do sulindac incluem efeitos gastrointestinais leves em quase 20 % dos pacientes, sendo as queixas mais frequentes a dor abdominal e as náuseas. Os efeitos secundários do SNC são vistos em até 10 % dos pacientes, sendo os mais frequentemente relatados a sonolência, a dor de cabeça e o nervosismo. A erupção cutânea e o prurido ocorrem em 5 % dos pacientes. O tratamento crónico com sulindac pode levar a toxicidade gastrointestinal grave, tal como hemorragia, ulceração e perfuração.

O uso potencial de sulindac para a quimioprevenção de cancros, e em especial dos pólipos colo-retais, tem sido bem estudado. Duas patentes recentes U.S. nº. 5 814 625 e 5 843 929, detalham os usos quimiopreventivos potenciais de

sulindac em seres humanos. As doses de sulindac reivindicadas na patente U.S. nº. 5 814 625 variam de desde 10 mg até 1500 mg por dia, com doses preferidas de 50 mg a 500 mg por dia. No entanto, nas doses mais elevadas, o maior problema com a utilização de sulindac como um único agente de quimioprevenção são as suas toxicidades bem conhecidas, e o moderadamente elevado risco de intolerância. Os idosos parecem ser especialmente vulneráveis, uma vez que a incidência de efeitos secundários é maior em pessoas com mais de 60 anos de idade. Note-se que esta faixa etária é mais propensa a desenvolver cancro colo-retal, e, portanto, mais suscetível de beneficiar de quimioprevenção.

O sulindac e o seu metabolito de sulfona exisulind foram testados e continuam a ser testados clinicamente para a prevenção e o tratamento de vários tipos de cancro. Clinical Trials.gov, uma base de dados dos U.S. National Institutes of Health, fornece a seguinte visão geral a partir de 10 de maio de 2010.

Estado	Ensaio clínico
Recrutamento	Um estudo aleatorizado de sulindac em lesões orais pré-malignas Condições: Leucoplasia, oral; Neoplasmas benignos Intervenções: Fármaco: sulindac; Fármaco: placebo Patrocinadores: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center; Surgery, AIMS, Cochin, Índia; Weill Medical College of Cornell University; Regional Cancer Centre (RCC), Trivandrum, Índia; Mazumdar Shaw Cancer Center (MSCC) Fase: Não listada
Recrutamento	Sulindac na prevenção de melanoma em participantes saudáveis que estão em maior risco de melanoma Condição: Condição pré-cancerosa Intervenções: Fármaco: sulindac; Outro: placebo Patrocinadores: University of Arizona; National Cancer Institute (NCI) Fase: Fase II
Ativo, sem recrutamento	Eflornitina e sulindac na prevenção do cancro colo-retal em pacientes com pólipos no cólon Condições: Cancro colo-retal; Condição pré-cancerosa / não maligna Intervenção: Fármaco: eflornitina mais sulindac Patrocinadores: University of California, Irvine; Chao Family Comprehensive Cancer Center; National Cancer Institute (NCI) Fase: Fase III

Concluído	Sulindac na prevenção de cancro da mama em mulheres com elevado risco para cancro da mama Condição: Cancro da mama Intervenções: Fármaco: sulindac; Outros: análise de biomarcador de laboratório Patrocinadores: University of Arizona; National Cancer Institute (NCI) Fase: Fase I
Concluído	Cápsulas de sulindac em comparação com comprimidos de sulindac em voluntários saudáveis Condição: tumor sólido adulto não especificado, protocolo específico Intervenções: Fármaco: sulindac; Outros: estudo farmacológico Patrocinadores: Mayo Clinic; National Cancer Institute (NCI) Fase:
Ativo, sem recrutamento	Eflornitina mais sulindac na prevenção do cancro colo-retal em pacientes com pólipos colo-retais benignos Condição: Cancro colo-retal Intervenção: Fármaco: eflornitina mais sulindac Patrocinadores: University of California, Irvine; Chao Family Comprehensive Cancer Center; National Cancer Institute (NCI) Fase: Fase II

Ativo, sem recrutamento	Bevacizumab / tarceva e tarceva / sulindac em carcinoma de células escamosas da cabeça e do pescoço Condição: Carcinoma de células escamosas da cabeça e do pescoço (SCCHN) Intervenções: Fármaco: Bevacizumab; Fármaco: Erlotinib; Fármaco: Sulindac Patrocinadores: Massachusetts General Hospital; Dana-Farber Cancer Institute; Emory University; University of North Carolina, Chapel Hill; Genentech; OSI Pharmaceuticals Fase: Fase II
Ativo, sem recrutamento	Sulindac na prevenção de cancro do pulmão em atuais ou ex-fumadores com displasia brônquica Condições: Cancro do pulmão; Condição pré-cancerosa; Distúrbio do uso de tabaco Intervenções: Fármaco: sulindac; Outro: placebo Patrocinadores: Mayo Clinic; National Cancer Institute (NCI) Fase: Fase II
Concluído	Sulindac e tamoxifen no tratamento de pacientes com tumor desmoid Condição: Tumor desmoid Intervenções: Fármaco: sulindac; Fármaco: citrato de tamoxifen Patrocinadores: Children's Oncology Group; National Cancer Institute (NCI) Fase: Fase II

Recrutamento	Sulindac e epirubicin no tratamento de pacientes com melanoma maligno metastático Condição: Melanoma (pele) Intervenções: Fármaco: cloridrato de epirubicin; Fármaco: sulindac; Outro: técnica imunológica Patrocinador: Ireland Cooperative Oncology Research Group (todo) Fase: Fase II
Concluído	Atorvastatin, inulina enriquecida com oligofructose, ou sulindac na prevenção de cancro em pacientes com maior risco de desenvolver neoplasia colo-retal Condições: Cancro colo-retal; condição pré-cancerosa Intervenções: Suplemento dietético: inulina enriquecida com oligofructose; Fármaco: atorvastatin de cálcio; Fármaco: sulindac; Outro: placebo Patrocinadores: Mayo Clinic; National Cancer Institute (NCI) Fase: Fase II
Suspenso	Sulindac e compostos de plantas na prevenção de cancro do cólon Condição: Cancro colo-retal Intervenções: Suplemento dietético: curcumina; Suplemento dietético: rutina; Fármaco: quercetina; Fármaco: sulindac Patrocinador: Rockefeller University Fase:
Ativo, sem recrutamento	Comparação de sulindac, aspirina, e ursodiol na prevenção de cancro colo-retal Condição: Cancro colo-retal Intervenções: Fármaco: ácido acetilsalicílico; Fármaco: sulindac; Fármaco: ursodiol Patrocinadores: M.D. Anderson Cancer Center; National Cancer Institute (NCI);

	Fase: Fase II
Concluído	Sulindac e docetaxel no tratamento de mulheres com cancro da mama recorrente ou com metástases Condição: Cancro da mama Intervenções: Fármaco: docetaxel; Fármaco: sulindac Patrocinadores: Fox Chase Cancer Center; National Cancer Institute (NCI) Fase: Fase II
Recrutamento	Influência de sulindac e de probióticos sobre o desenvolvimento de adenomas de bolsa em pacientes com polipose adenomatosa familiar Condição: Polipose adenomatosa coli Intervenções: Fármaco: Sulindac (fármaco); Fármaco: VSL#3 (probiótico); Fármaco: inulina (probiótico) Patrocinadores: Radboud University; Dutch Cancer Society Fase: Fase II
Terminado	Os efeitos de curcuminóides sobre focos de criptas aberrantes no cólon humano Condição: Focos de criptas aberrantes Intervenções: Fármaco: sulindac; Fármaco: curcumin Patrocinador: University of Medicine and Dentistry New Jersey Fase:

Recrutamento	Utilização de curcumin para o tratamento de adenomas intestinais em polipose adenomatosa familiar (FAP) Condições: Pólipos do trato inferior em pacientes com FAP; Pólipos do trato superior em pacientes com FAP Intervenções: Fármaco: Calcumin (curcumin); Outro: Questionário de fator de risco; Outro: Amostras de sangue; Outro: Biópsias (sigmoidoscopia); Outro: Biópsias (endoscopia superior) Patrocinador: University of Puerto Rico Fase:
Ativo, sem recrutamento	Para aumentar a duração da ausência de tratamento da supressão intermitente de andrógeno Condição: Cancro da próstata Intervenções: Fármaco: Flutamida; Fármaco: Acetato de leuprolida; Fármaco: Exisulind Patrocinadores: University of Washington;; OSI Pharmaceuticals Fase: Fase II
Concluído	Segurança, eficácia e farmacocinética entre capecitabin e exisulind em pacientes com cancro da mama metastático Condições: Neoplasias da mama; metástases, neoplasia Intervenções: Fármaco: Capecitabin; Fármaco: Exisulind Patrocinadores: M.D. Anderson Cancer Center; Cell Pathways Fases: Fase I / Fase II

Concluído	<u>Exisulind neoadjuvante no tratamento de pacientes que são a ser submetidos a prostatectomia radical para o cancro da próstata no estadio II ou no estadio III</u> Condição: Cancro da próstata Intervenções: Fármaco: exisulind; Procedimento: cirurgia convencional; Procedimento: terapia neoadjuvante Patrocinadores: Mayo Clinic; National Cancer Institute (NCI) Fase: Fase II
Concluído	<u>Quimioterapia de combinação no tratamento de pacientes com cancro do pulmão avançado de células não-pequenas</u> Cancro do pulmão Condição: Intervenções: Fármaco: carboplatin; Fármaco: exisulind; Fármaco: cloridrato de gemcitabin Patrocinadores: Eastern Cooperative Oncology Group; National Cancer Institute (NCI) Fase: Fase II
Concluído	<u>Estudo em fase II de taxotere em combinação com exisulind em pacientes com cancro do pulmão de células não-pequenas (NSCLC)</u> Condição: NSCLC Intervenção:: Fármaco: Exisulind Patrocinador: OSI Pharmaceuticals Fases: Fase I / Fase II
Concluído	<u>Um estudo em fase III da eficácia de taxotere / aptosyn versus taxotere / placebo em pacientes com cancro do pulmão de células não-pequenas</u> Condição: Cancro do pulmão de células não-pequenas Intervenção: Fármaco: Exisulind Patrocinador: OSI Pharmaceuticals Fase: Fase III

Concluído	<u>Exisulind versus placebo após a remoção cirúrgica da próstata</u> Condição: Neoplasias da próstata Intervenção: Fármaco: Exisulind Patrocinadores: Mayo Clinic; OSI Pharmaceuticals Fase: Fase II
Concluído	<u>Docetaxel, estramustine e exisulind no tratamento de pacientes com cancro da próstata metastático que não tem respondido a terapia hormonal</u> Condição: Cancro da próstata Intervenções: Fármaco: docetaxel; Fármaco: fosfato de sódio de estramustine; Fármaco: exisulind Patrocinadores: Cancer and Leukemia Group B; National Cancer Institute (NCI) Fase: Fase II
Concluído	<u>Quimioterapia de combinação e exisulind no tratamento de pacientes com cancro do pulmão em estadio extensivo de células pequenas</u> Condição: Cancro do pulmão Intervenções: Fármaco: carboplatin; Fármaco: etoposide; Fármaco: exisulind Patrocinadores: Cancer and Leukemia Group B; National Cancer Institute (NCI) Fase: Fase II
Ativo, sem recrutamento	<u>Exisulind na prevenção de pólipos em pacientes com polipose adenomatosa familiar</u> Condições: Cancro colo-retal; Cancro do intestino delgado Intervenção: Fármaco: exisulind Patrocinador: University of Utah Fases: Fase II / Fase III

Concluído	<u>Exisulind antes de prostatectomia radical</u>		
	Condição:	Neoplasias da próstata	
	Intervenção:	Fármaco:	terapia de exisulind
	Patrocinadores:	Mayo Clinic; National Cancer Institute (NCI)	
	Fase:	Fase II	

B. Piroxicam

Um agente anti-inflamatório não-esteróide que está bem estabelecido no tratamento da artrite reumatoide e da osteoartrite, com a designação química que se segue; 4-hidroxi-2-metil-N-2-piridil-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida 1,1-dióxido. A sua utilidade também tem sido demonstrada no tratamento de distúrbios músculo-esqueléticos, dismenorreia e dor pós-operatória. A sua longa semivida permite que seja administrado uma vez por dia. O fármaco tem demonstrado ser eficaz se administrado por via retal. As queixas gastrointestinais são os efeitos secundários mais frequentemente relatados.

O piroxicam foi mostrado ser um agente de quimioprevenção eficaz em modelos animais (Pollard e Luckert, 1989; Reddy *et al.*, 1987), embora tenha demonstrado efeitos secundários num ensaio IIb recente. Uma grande meta-análise dos efeitos secundários dos NSAID também indica que o piroxicam tem mais efeitos secundários do que outros NSAID (Lanza *et al.*, 1995). O sulindac foi mostrado produzir regressão dos adenomas em pacientes com polipose adenomatosa familiar (FAP) (Muscat *et al.*, 1994), apesar de pelo menos um estudo nos adenomas esporádicos não ter mostrado dito efeito (Ladenheim *et al.*, 1995).

A combinação de DFMO e piroxicam foi mostrada ter um efeito quimiopreventivo sinérgico no modelo de rato de carcinogénese do cólon tratado com AOM (Reddy *et al.*, 1990), apesar da DFMO ter exercido um maior efeito supressor do

que o piroxicam na mutação Ki-ras e na tumorigénese, quando cada agente foi administrado separadamente (Reddy *et al.*, 1990). Num estudo, a administração de DFMO ou de piroxicam a ratos tratados com AOM reduziu o número de tumores com mutações Ki-ras a partir de 90 % até 36 % e 25 %, respetivamente (Singh *et al.*, 1994). Ambos os agentes também reduziram a quantidade de p21 ras bioquimicamente ativo em tumores existentes.

C. Combinações de NSAID

Combinações de vários NSAID também são utilizadas para diversos fins. Ao usar doses menores de dois ou mais NSAID, é possível reduzir os efeitos secundários, ou as toxicidades associadas com doses elevadas de NSAID individuais. Por exemplo, em algumas realizações, o sulindac pode ser utilizado em conjunto com o celecoxib. Em algumas realizações, um ou ambos os NSAID são inibidores seletivos de COX-2. Os exemplos de NSAID que podem ser utilizados quer isoladamente ou em combinação, incluem, mas não estão limitados a, os seguintes: ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, cetoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina, indometacina, sulindac, etodolac, diclofenac, piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lomoxicam, isoxicam, ácido mefenâmico, ácido meclofenâmico, ácido flufenâmico, ácido tolfenâmico, celecoxib rofecoxib valdecoxib parecoxib, lumiracoxib, ou etoricoxib.

VI. Terapia combinada de eflornitine / sulindac

Os estudos pré-clínicos de fármacos de quimioprevenção administrados em combinação, a doses baixas, mostram uma eficácia notável na prevenção de adenomas com poucas toxicidades adicionais, sugerindo uma estratégia para melhorar as razões de risco para benefício para prevenir os adenomas recorrentes.

Tal como observado anteriormente, o ratinho *Min*

(neoplasia intestinal múltipla), que partilha um genótipo *APC/apc* mutado com FAP, serve como um modelo experimental animal útil para pacientes FAP humanos (Lipkin, 1997). O ratinho *Min* pode desenvolver mais de 100 adenomas / adenocarcinomas gastrointestinais ao longo de todo o trato gastrointestinal aos 120 dias de vida, o que leva a hemorragia, obstrução e morte. Uma terapia de combinação de DFMO e sulindac mostrou ser eficaz na redução de adenomas nestes ratinhos (patente US nº. 6 258 845; Gerner e Meyskens, 2004). Os resultados do tratamento de ratinhos *Min* quer com DFMO sozinha, sulindac sozinho, ou uma combinação de DFMO e sulindac, na formação do tumor, quer no cólon ou no intestino delgado, são mostrados nas figuras 9 e 10. A figura 9 mostra o número médio de tumores por tamanho no cólon dos três grupos de tratamento em comparação com os controlos não tratados. A figura 10 mostra o número médio de tumores por tamanho no intestino delgado dos três grupos de tratamento em comparação com os controlos não tratados. A figura 11 mostra como o número de adenomas de elevado grau varia dependendo da terapia simples ou de combinação.

VII. Eficácia da terapia inibitória de poliamina com base no perfil do paciente

Foi demonstrada a eficácia de uma combinação inibitória de poliamina de longo prazo de *D,L*- α -difluorometilornitina (DFMO, eflornitine) e sulindac, diariamente, por via oral, entre pacientes CRA (Meyskens *et al.*, 2008), no entanto, o tratamento foi associado com ototoxicidade subclínica modesta (McLaren *et al.*, 2008), e um maior número de eventos cardiovasculares em pacientes com risco cardiovascular de linha de base elevado (Zell *et al.*, 2009). Os inventores determinaram agora que o genótipo *ODC1* afeta diferencialmente a recorrência de adenoma, as respostas de tecido de poliamina, ou os perfis de

toxicidade depois do tratamento com eflornitine e sulindac comparado com o placebo.

Trezentos e setenta e cinco pacientes com história de adenomas ressecados ($>$ ou $=$ 3 mm) foram aleatoriamente designados para receber 500 mg de difluorometilornitina (DFMO) oral e 150 mg de sulindac, uma vez por dia, ou placebos correspondentes, durante 36 meses, estratificados por uso de aspirina em baixa dose (81 mg) na linha de base e centro clínico. A colonoscopia de seguimento foi feita três anos após a aleatorização ou fora do estudo. A recorrência de adenoma colo-retal foi comparada entre os grupos com regressão log-binomial. Comparando o resultado em pacientes que recebem os placebos com aqueles que recebem a intervenção ativa, (a) a recorrência de um ou mais adenomas foi de 41,1 % e de 12,3 % (razão de risco, 0,30; intervalo de confiança de 95 %, 0,18-0,49, $P < 0,001$); (b) 8,5 % tinham um ou mais adenomas avançados, em comparação com 0,7 % dos pacientes (razão de risco, 0,085; intervalo de confiança de 95 %, 0,011-0,65; $P < 0,001$); e (c) 17 (13,2 %) pacientes apresentavam adenomas múltiplos (> 1), na colonoscopia final, em comparação com 1 (0,7 %; razão de risco, 0,055; 0,0074-0,41, $P < 0,001$). Os eventos adversos graves (grau $>$ ou $=$ 3) ocorreram em 8,2 % dos pacientes no grupo do placebo, em comparação com 11 % no grupo de intervenção ativa ($P = 0,35$). Não houve diferença significativa na proporção de pacientes que relataram alterações auditivas a partir da linha de base. Os pólipos adenomatosos recorrentes podem ser marcadamente reduzidos por uma combinação de baixas doses orais de DFMO e sulindac, e com poucos efeitos secundários. Os detalhes deste estudo são discutidos em maior detalhe em seguida, e em Meyskens *et al.*, 2008.

O estudo foi interrompido pelo Comité de Monitorização de Dados de Segurança (DSMB) após 267 pacientes terem completado as colonoscopias de fim-de-estudo (devido ao

estudo ter satisfeito os seus pontos finais de eficácia). O DSMB monitorizou todos os pontos finais de segurança e de eficácia. Tal como discutido em maior detalhe na secção dos exemplos, este estudo envolve a análise dos dados dos pacientes do ensaio de fase III de múltiplos centros de prevenção de adenoma do cólon. Veja-se também (Meyskens *et al.*, 2008).

A. Distribuição do genótipo ODC1

Foram usados na análise de caso um total de 440 casos identificados de cancro colo-retal (CRC), a partir do estudo gene - ambiente CRC da UC Irvine. A duração média de acompanhamento foi de 11 anos. Houveram 270 (61 %) casos de cancro de cólon, 162 (37 %) casos de cancro retal, e 8 casos (2 %) de CRC de localização não especificada. Os dados clínico-patológicos para os casos de cancro do cólon e do reto são apresentados na tabela 1. A distribuição do genótipo +316 ODC entre todos os casos de CRC foi de 53 % GG, 41 % GA e 7 % AA. A distribuição do genótipo +316 ODC foi similar entre os casos de CRC com e sem história familiar. Não houveram diferenças significativas na distribuição do genótipo ODC por idade ($P = 0,38$), sexo ($P = 0,56$), história familiar ($P = 0,94$), local no colón e reto ($P = 0,55$), histologia ($P = 0,46$), ou grau do tumor ($P = 0,73$). A distribuição do genótipo ODC não diferiu significativamente por estadio de diagnóstico: estadio I (49 % GG, 42 % GA, 8 % AA), estadio II (56 % GG, 38 % GA, 6 % AA), estadio III (51 % GG, 43 % GA, 6 % AA), estadio IV (59 % GG, 37 % GA, 4 % AA) ($P = 0,87$). A distribuição do genótipo ODC por etnia revelou diferenças significativas: caucasianos (382 casos: 53 % GG, 41 % GA, 6 % AA, frequência do menor alelo-A = 26 %), afro-americanos (7 casos: 71 % GG, 29 % GA, 0 % AA, frequência do menor alelo-A = 15 %), hispânicos (21 casos: 57 % GG, 43 % GA, 0 % AA, frequência do menor alelo-A = 21 %), e asiáticos (27 casos:

33 % GG, 41 % GA, 26 % AA, frequência do menor alelo-A = 46 %) ($P = 0,009$). No entanto, dentro de cada raça a distribuição do genótipo ODC estava no equilíbrio de Hardy-Weinberg (caucasianos $P = 0,36$, afro-americanos $P = 0,66$, hispânicos $P = 0,21$, asiáticos $P = 0,35$).

B. Recorrência de adenoma

A distribuição do genótipo *ODC1* foi: 126 GG (55 %), 87 GA (38 %), e 15 AA (7 %). As características clínicas da linha de base revelaram diferenças, tal como se mostra na tabela 1. Em modelos de regressão com preditores idade, género, raça, uso de aspirina, tratamento, genótipo *ODC1* e tratamento, o tratamento foi o único fator associado com diferenças na recorrência de adenoma, na resposta de tecido de poliamina, e na ototoxicidade. Foi detetada uma interação estatisticamente significativa para o genótipo *ODC1* e tratamento no modelo completo para a recorrência de adenoma ($P = 0,021$), de tal modo que o padrão de recorrência de adenoma entre pacientes tratados com placebo foi: 50 % GG, 35 % GA, 29 % AA versus os pacientes tratados com eflornitine / sulindac: 11 % GG, 14 % GA, 57 % AA.

Foi detetada uma interação estatisticamente significativa entre o genótipo *ODC1* e o tratamento neste modelo ($P = 0,038$). O genótipo *ODC1* não foi associado significativamente com uma resposta de tecido de putrescina, ou uma resposta de razão de espermidina : espermina nos modelos de regressão completa (dados não mostrados). O risco relativo (RR) para a recorrência de adenoma relacionado com o tratamento após o ajuste no modelo de regressão total foi de 0,39 (IC de 95 %, 0,24-0,66). Não houve associações significativas entre o grupo de tratamento e o genótipo *ODC1* em relação a eventos adversos cardiovasculares ou gastrointestinais (tabelas 3 e 4).

Foi aqui observado que o efeito inibitório do adenoma de eflornitine e sulindac foi maior entre aqueles com o

genótipo *ODC1* homozigótico G grande, em contraste com os relatórios anteriores que mostram uma diminuição do risco de adenoma recorrente entre os pacientes CRA que receberam aspirina, portadores de pelo menos um alelo-A (Martinez et al., 2003; Barry et al., 2006; Hubner et al., 2008). A distribuição do genótipo *ODC1* foi semelhante à relatada em ensaios anteriores baseados em aspirina (Martinez et al., 2003; Barry et al., 2006; Hubner et al., 2008), e o alelo-A foi associado com um menor risco não significativo de adenoma recorrente no grupo de placebo de acordo com os relatórios anteriores (Martinez et al., 2003; Hubner et al., 2008). Estes resultados demonstram que os portadores do alelo-A de *ODC1* diferem em resposta à exposição prolongada com eflornitine e sulindac em comparação aos pacientes dos genótipos GG, com os portadores do alelo-A a terem menos benefícios em termos de recorrência de adenoma, e potencial de risco elevado de desenvolver ototoxicidade, especialmente entre os homozigóticos AA.

C. Análise de sobrevivência

Dos 440 casos de CRC, 138 (31 %) estavam mortos no momento da análise. Sessenta e quatro (46 %) óbitos ocorreram em casos portadores do genótipo GG, em comparação com 74 (54 %) óbitos em casos com os genótipos AA/AG. A causa da morte estava disponível para 102 dos 138 casos de CRC falecidos. Oitenta e cinco (83 %) casos de CRC morreram em consequência do CRC. Foi observada uma melhoria estatisticamente significativa na sobrevivência específica de CRC entre todos os casos de CRC homozigóticos para o alelo-G de ODC (10 anos de sobrevivência = 84 %), em comparação com os casos com pelo menos um alelo-A (GA/AA ODC) (10 anos de sobrevivência = 76 %, $P = 0,031$). A análise de sobrevivência específica de CRC por estadió revelou que as diferenças de sobrevivência significativamente diferentes não foram observadas para o

estadio I de AJCC ($P = 0,055$), II ($P = 0,61$), ou IV ($P = 0,65$) de CRC. No entanto, entre os casos com estadio III de CRC, o genótipo GG de ODC foi associado com melhoria da sobrevivência específica de CRC de 10 anos: 75 % em comparação com 60 % para os casos de genótipo GA/AA de ODC; $P = 0,024$ (figura 1). Entre os casos de cancro do cólon, foi observado um benefício de sobrevivência específica de CRC estatisticamente significativo para aqueles com o genótipo GG de ODC, em comparação com os casos GA/AA de ODC (taxa de sobrevivência de 10 anos = 87 % vs. 79 %, $P = 0,029$); isto não foi observado para os casos de cancro retal (sobrevivência de 10 anos = 78 % para os casos GG de ODC vs. 72 % para os casos GA/AA de ODC, $P = 0,42$).

Entre todos os casos de CRC, as estimativas de sobrevivência específica de CRC com base no genótipo ODC após ajuste para a idade (anos), género, etnia, história familiar de CRC, estágio TNM no diagnóstico, localização do tumor no cólon, subtipo histológico, tratamento com cirurgia, radioterapia e quimioterapia foram como se segue: razão de perigo de GG de ODC (HR) = 1,00 (referente), HR de GA de ODC = 1,73, e a HR do genótipo AA de ODC = 1,73 (tendência de $P = 0,0283$). Entre somente casos de cólon, a análise de sobrevivência específica de CRC revelou que o SNP +316 de ODC foi um preditor independente da sobrevivência específica de CRC, após o ajuste para as variáveis clínicas anteriores. Em comparação com os casos de cancro do cólon de GG de ODC, o risco de morte (HR) específico de CRC foi de 2,31 (1,15-4,64) para o genótipo GA de ODC, e de 3,73 (0,93-14,99) para o genótipo AA de ODC (tendência de $P = 0,006$) (tabela 2). A análise da sobrevivência global destes casos de cancro do cólon foi consistente com a análise de sobrevivência específica de CRC (tabela 2). Entre os casos de cancro do reto, a análise de sobrevivência específica de CRC revelou que o SNP +316 de ODC não foi um preditor independente da sobrevivência

específica de CRC, após o ajuste para as variáveis clínicas citadas anteriormente. Em comparação aos casos de cancro retal de GG de ODC (HR = 1,00, referência), o risco de morte (HR) específico do CRC foi de 1,72 (0,83-3,57) para os heterozigóticos de GA de ODC, e de 1,93 (0,56-6,67) para os homozigóticos de AA de ODC (tendência de P = 0,12).

Tal como referido anteriormente, a distribuição do genótipo +316 de ODC diferiu entre a etnicidade. O risco de mortalidade observado, que não por acaso, provavelmente reflete as diferenças com base no genótipo ODC, no entanto, o risco pode ser restrito a um grupo étnico específico. Assim, as análises multivariadas foram realizadas entre os casos de cancro de cólon de caucasianos, para avaliar o risco de mortalidade específica do genótipo dentro deste grupo étnico. Entre os 234 casos de cancro do cólon de caucasianos, houveram 37 mortes relacionadas com o CRC. A análise multivariada de sobrevivência específica de CRC revelou que o SNP +316 de ODC foi um preditor independente da sobrevivência específica de CRC entre os casos de cancro do cólon de caucasianos, após o ajuste para as variáveis clínicas relevantes citadas anteriormente. Em comparação com os casos com genótipo GG de ODC (HR = 1,00, referência), o risco de morte (HR) específico do CRC foi de 2,67 (1,22-5,82) para o genótipo GA de ODC, e de 6,28 (1,46-26,95) para o genótipo AA de ODC (tendência de P = 0,0018).

As diferenças de sobrevivência específica de genótipos entre casos de CRC foram limitadas a casos de cancro do cólon: em comparação aos casos de genótipo GG de ODC (HR = 1,00, referência) a razão de risco de perigo (HR) ajustada CRC-SS foi de 2,31 (1,15-4,64) para os casos de GA de ODC, e de 3,73 (0,93-14,99) para os casos de AA de ODC (tendência de P = 0,006). Em células de cancro do cólon, o SNP +316 de ODC, ladeado por duas "E-boxes", prevê a atividade do promotor de ODC. O ativador da "E-box" *c-MYC* e os repressores *MAD1* e *MAD4* ligam-se preferencialmente ao

menor alelo-A, em comparação com o grande alelo-G em células cultivadas.

Com base nesta análise de base populacional dos casos de cancro colo-retal com uma duração de seguimento de 11 anos, observou-se que o SNP +316 de ODC estava associado à sobrevivência específica de cancro colo-retal entre os casos de cancro do cólon. Foi observado um risco aumentado estatisticamente significativo de mortalidade específica de CRC, com cada alelo-A de ODC adicional entre os casos de cancro do cólon, ou seja, de GG de ODC para GA para AA (tendência de $P = 0,006$), após ajuste para idade, género, etnia, estadio do tumor, história familiar de CRC, local do tumor, histologia, tratamento com cirurgia, radioterapia e quimioterapia.

D. Regulação específica de alelo de fatores de transcrição

Os dados experimentais aqui apresentados fornecem ideias sobre possíveis mecanismos biológicos subjacentes às nossas observações clínicas. Em células epiteliais de cancro do cólon, nós mostrámos que o SNP +316 de ODC é funcionalmente significativo, tal como mostrado por um aumento de ligação de fatores de transcrição de "E-box" a elementos do promotor contendo alelos-A em comparação com alelos-G. Tanto o ativador *c-MYC* e o repressor *MAD1* mostram maiores efeitos sobre a atividade do promotor em elementos repórter contendo alelos-A vs. alelos-G. Estes resultados sugerem regulação específica de alelo de ODC por fatores de transcrição "E-box". A atividade da enzima proteína ODC não é aparentemente influenciada pelo genótipo SNP +316 de ODC, que acreditamos que influencia a transcrição de ODC.

Nas células do cólon, tem sido mostrado que a expressão condicional de *APC* do tipo selvagem, um gene expresso na mucosa colónica normal, suprime *c-MYC*, e aumenta a expressão de *MAD1* (Fultz e Gerner, 2002). Para além disso, tem sido relatado que *APC* do tipo selvagem pode

regular a atividade de promotor de ODC de uma maneira dependente do SNP +316 (Martinez *et al.*, 2003). APC do tipo selvagem é expresso na mucosa colônica aparentemente normal de indivíduos não afetados com FAP, ao passo que a maioria dos adenomas do cólon esporádicos mostram evidências de APC mutado ou eliminado (Iwamoto *et al.*, 2000). MYC é expressa em níveis baixos na mucosa intestinal normal, mas é aumentada em adenomas intestinais de ratinhos APC^{Min/+}. O knockout condicional da expressão de MYC intestinal epitelial suprime a tumorigênese intestinal em ratinhos APC^{Min/+} (Ignatenko *et al.*, 2006). Tal como descrito anteriormente, o trabalho anterior do nosso grupo (Martinez *et al.*, 2003) e de outros (Hubner *et al.*, 2008) demonstrou um papel protetor para o alelo-A de ODC, especialmente em usuários de aspirina, contra a recorrência de pólipos do cólon em ensaios clínicos de prevenção. No entanto, no estudo de base populacional apresentado aqui, o alelo-A de ODC foi associado com menor sobrevivência. Esta aparente contradição pode ser explicada pelos resultados apresentados aqui, que indicam que ambos os ativadores e repressores "E-box" ligam seletivamente o alelo-A de ODC. Os inventores especulam que a transição de epitélio normal, que expressa repressores "E-box", para o epitélio neoplásico, pode ser retardada em indivíduos com alelos-A de ODC. Este efeito pode resultar da supressão da síntese de poliamina. No entanto, se o epitélio transformado começa a expressar ativadores "E-box" (tal como c-MYC), então a progressão do cancro pode ser mais provável de ocorrer em indivíduos com o genótipo A de ODC. Os nossos resultados para o risco de mortalidade específica de cancro do cólon são consistentes com os de outros, que mostram que o risco de cancro da próstata pode ser associado com o alelo-A de ODC entre indivíduos específicos, como o resultado de interações ambientais do gene (O'Brien *et al.*, 2004; Visvanathan *et al.*, 2004.). Essa progressão de cancro do

cólon pode ser devida a um aumento da síntese de poliamina, como já foi demonstrado para o cancro da próstata (Simoneau *et al.*, 2008).

Esta descoberta de que um fator, tal como o SNP de ODC, pode ter tanto efeitos de promoção e de inibição sobre a carcinogénese não é única. Por exemplo, o fator transformador de crescimento beta (TGF- β) tem vários papéis na carcinogénese e na progressão do cancro (Derynck *et al.*, 2001; Pardali e Moustakas, 2007; Roberts e Wakefield, 2003). O TGF- β em células não transformadas inibe a proliferação celular e induz a apoptose. No entanto, é sobre-expresso em todos os tumores humanos, e está associado com a progressão tardia do cancro, especificamente a invasão tumoral e as metástases. Um único estudo que relata a atividade de ODC em tumores colo-retais humanos demonstrou que elevados níveis de expressão de ODC estavam significativamente associados com melhoria da sobrevivência (Matsubara *et al.*, 1995). Isto sugere que, apesar de a sobre-expressão de ODC promover a formação de adenomas colo-retais humanos, é possível que em lesões estabelecidas, a sobre-expressão de ODC causa melhoria na proliferação, e está associada com uma melhor resposta a tratamentos antiproliferativos. No entanto, esse estudo não incluiu estratificação por genótipo de ODC, por isso não se sabe se estes efeitos são independentes do genótipo de ODC.

As associações observadas do SNP +316 de ODC com a mortalidade específica de CRC foram limitadas aos casos de cancro do cólon. Entre os casos de cancro do cólon, foram observados efeitos particularmente fortes para caucasianos. De forma semelhante a outros relatos, a frequência do alelo SNP +316 de ODC difere consideravelmente por etnia (O'Brien *et al.*, 2004). Quando os inventores limitaram a análise de sobrevivência somente aos caucasianos (ou seja, o único grupo étnico com potência adequada para tais análises), as associações do SNP +316 de ODC foram significativas, e de

maior magnitude do que as estimativas observadas por toda a coorte.

O estudo epidemiológico partilha limitações de outras análises de base populacional, incluindo a falta de dados sobre as condições comórbidas, o estado de desempenho, e os regimes quimioterapêuticos específicos utilizados. Para além disso, as amostras de biópsia de tecido obtidas dos participantes do estudo de gene - ambiente da UC Irvine de cancro colo-retal familiar são espécimes embebidos em parafina e, portanto, não podem ser usados para uma análise precisa de quantificação tecido de poliaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Há também a possibilidade de viés de seleção, favorecendo um grupo relativamente saudável de sobreviventes de CRC, uma vez que houve uma média de demora de 16 meses a partir do momento do diagnóstico de CRC até a inclusão no estudo. Outros fatores que afetam o metabolismo de poliamina que não foram contabilizados no presente estudo podem explicar as nossas observações. Por exemplo, a aspirina ativa a acetilação de poliamina e exporta e trabalha com o alelo-A de ODC para reduzir o teor de poliamina de células e tecido (Gerner *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2003; Babbar *et al.*, 2006).

Em resumo, os inventores têm observado consequências clínicas do SNP +316 de ODC na mortalidade específica de CRC entre os casos de cancro do cólon. Para além disso, os inventores estabeleceram ainda mais o significado funcional do SNP +316 de ODC na transcrição deste gene dependente de *c-MYC* e de *MAD1*, em células de cancro do cólon humano. Em conjunto, estes resultados experimentais e epidemiológicos sugerem papéis para o SNP +316 de ODC na progressão de cancro do cólon, que são distintos do seu papel previamente relatado na progressão para adenomas do cólon. Estes resultados podem ser usados para avaliar o risco de progressão de cancro do cólon, e podem ser usados para direcionar a gestão farmacogenética específica do paciente,

a monitorização de vigilância, e informar novas abordagens direcionadas para a prevenção secundária e terciária de cancro do cólon.

E. Sumário

Foi detetada uma interação estatisticamente significativa para o genótipo *ODC1* e tratamento no modelo completo para a recorrência de adenoma ($P = 0,021$), de tal modo que o padrão de recorrência de adenoma entre pacientes tratados com placebo foi: 50 % GG, 35 % GA, 29 % AA versus pacientes tratados com eflornitine / sulindac: 11 % GG, 14 % GA, 57 % AA. Aqui foi observado que o efeito inibitório do adenoma de eflornitine e sulindac foi maior entre aqueles com o genótipo *ODC1* homozigótico para o maior G, em contraste com os relatórios anteriores que mostram uma diminuição do risco de adenoma recorrente entre os pacientes CRA que receberam aspirina portadores de pelo menos um alelo-A (Martinez et al., 2003; Barry et al., 2006; Hubner et al., 2008). Estes resultados demonstram que os portadores do alelo-A de *ODC1* diferem em resposta a uma exposição prolongada de eflornitine e sulindac em comparação com pacientes com o genótipo GG, com os portadores do alelo-A a terem menos benefício em termos de recorrência de adenoma, e potencial de risco elevado de desenvolver ototoxicidade, especialmente entre os homozigóticos AA.

VIII. Análise de polimorfismo

O genótipo na posição +316 do gene promotor de *ODC1* do paciente pode ser determinado usando os métodos fornecidos em seguida, incluindo os métodos específicos descritos na secção de exemplos. Estes métodos podem ser ainda modificados e otimizados utilizando os princípios e técnicas de biologia molecular, tal como aplicados por um perito na tecnologia. Tais princípios e técnicas são

ensinados, por exemplo, em Small et al., (2002). Os métodos gerais utilizados para a identificação de polimorfismos de um único nucleótido (SNPs) são fornecidos em seguida. A referência de Kwok e Chen (2003) e Kwok (2001) fornecem uma visão geral de alguns destes métodos.

Os SNP relativamente ao *ODC1* podem ser caracterizados pelo uso de qualquer um destes métodos, ou de uma modificação adequada dos mesmos. Tais métodos incluem a sequenciação direta ou indireta do local, a utilização de enzimas de restrição, onde os alelos respetivos do local criam ou eliminam um local de restrição, o uso de sondas de hibridação específicas para os alelos, o uso de anticorpos que são específicos para as proteínas codificadas pelos diferentes alelos do polimorfismo, ou qualquer outra interpretação bioquímica.

A. Sequenciação de ADN

Um método normalmente utilizado para caracterizar um polimorfismo é a sequenciação direta do ADN do locus genético que flanqueia e inclui o polimorfismo. Tal análise pode ser realizada utilizando quer o "método de terminação da cadeia mediada por didesoxi", também conhecido como o "método de Sanger" (Sanger et al., 1975), ou o "método de degradação química", também conhecido como o "método de Maxam-Gilbert" (Maxam et al., 1977). A sequenciação em combinação com as tecnologias de amplificação de sequências genómicas específicas, tais como a reação em cadeia da polimerase pode ser utilizada para facilitar a recuperação dos genes desejados (Mullis et al., 1986; pedido de patente Europeia 50 424; pedido de patente Europeia 84 796, pedido de patente europeia 258 017, pedido de patente Europeia 237 362; pedido de patente Europeia 201 184; Patentes U.S. 4 683 202, 4 582 788 e 4 683 194).

B. Resistência à exonuclease

Outros métodos que podem ser empregues para determinar a identidade de um nucleótido presente num local polimórfico utilizam um derivado de nucleótido especializado resistente à exonuclease (patente U.S. 4 656 127). Um oligonucleótido iniciador complementar a uma sequência alélica imediatamente a 3' do local polimórfico é hibridado com o ADN sob investigação. Se o local polimórfico no ADN contém um nucleótido que é complementar ao derivado de nucleótido específico resistente à exonuclease presente, em seguida, esse derivado será incorporado por uma polimerase na extremidade do oligonucleótido iniciador hibridado. Tal incorporação torna o oligonucleótido iniciador resistente à clivagem da exonuclease e permite assim a sua deteção. À medida que a identidade do derivado resistente à exonuclease é conhecida, pode-se determinar o nucleótido específico presente no sítio polimórfico do ADN.

C. Métodos de microsequenciação

Têm sido descritos vários outros procedimentos de incorporação de nucleótidos guiada por oligonucleótido iniciador para testar locais polimórficos no ADN (Komher *et al.*, 1989; Sokolov, 1990; Syvanen 1990; Kuppuswamy *et al.*, 1991; Prezant *et al.*, 1992; Ugozzoll *et al.*, 1992; Nyren *et al.*, 1993). Estes métodos baseiam-se na incorporação de desoxinucleótidos marcados para distinguir entre as bases num local polimórfico. Como o sinal é proporcional ao número de desoxinucleótidos incorporados, os polimorfismos que ocorrem no percurso da mesma sequência de nucleótidos resultam num sinal que é proporcional ao comprimento do percurso (Syvanen *et al.*, 1990).

D. Extensão em solução

A patente francesa 2 650 840 e o pedido de patente PCT

WO91/02087 discutem um método baseado em solução para a determinação da identidade do nucleótido de um local polimórfico. De acordo com estes métodos, é usado um oligonucleótido iniciador complementar às sequências alélicas imediatamente a 3' de um sítio polimórfico. A identidade do nucleótido daquele local é determinada utilizando derivados de didesoxinucleótidos marcados, que são incorporados na extremidade do oligonucleótido iniciador se complementares às sequências de nucleótidos do local polimórfico.

E. Análise genética de bit ou extensão de fase sólida

O pedido de patente PCT WO92/15712 descreve um método que utiliza misturas de terminadores marcados e um oligonucleótido iniciador que é complementar à sequência 3' de um local polimórfico. O terminador marcado que é incorporado é complementar ao nucleótido presente no local polimórfico da molécula alvo a ser avaliada, e é assim identificado. Aqui, o oligonucleótido iniciador ou a molécula alvo é imobilizado numa fase sólida.

F. Ensaio de ligação de oligonucleótido (OLA)

Trata-se de um outro método de fase sólida que utiliza uma metodologia diferente (Landegren *et al.*, 1988). São usados dois oligonucleótidos, capazes de hibridizar com sequências confinantes de uma única cadeia de um ADN alvo. Um destes oligonucleótidos é biotinilado, enquanto o outro está marcado de forma detetável. Se é encontrada a sequência complementar precisa numa molécula alvo, os oligonucleótidos irão hibridar de modo a que as suas extremidades encostam, e criam um substrato de ligação. A ligação permite a recuperação do oligonucleótido marcado usando avidina. Foram também descritos outros ensaios de detecção de ácidos nucleicos, com base neste método, combinados com PCR (Nickerson *et al.*, 1990). Aqui a PCR é

utilizada para alcançar a amplificação exponencial do ADN alvo, que é então detectado utilizando o OLA.

G. Análise genética bit mediada por ligase / polimerase

A patente U.S. 5 952 174 descreve um método que envolve também dois oligonucleótidos iniciadores capazes de hibridar com sequências confinantes de uma molécula alvo. O produto hibridado é formado sobre um suporte sólido ao qual o alvo é imobilizado. Aqui, a hibridação ocorre de tal modo que os oligonucleótidos iniciadores estão separados um do outro por um espaço de um só nucleótido. A incubação deste produto hibridado na presença de uma polimerase, uma ligase, e uma mistura de trifosfato de nucleósido que contém pelo menos um trifosfato de desoxinucleósido, permite a ligação de qualquer par de oligonucleótidos confinantes hibridados. A adição de uma ligase resulta em dois eventos necessários para gerar um sinal, a extensão e a ligação. Isto fornece uma especificidade mais elevada e um "ruído" mais baixo do que os métodos usando somente quer a extensão ou a ligação e, ao contrário dos ensaios baseados em polimerase, este método aumenta a especificidade da etapa de polimerase, combinando-a com uma segunda hibridação e uma etapa de ligação, para um sinal ser ligado à fase sólida.

H. Reações de clivagem invasiva

As reações de clivagem invasiva podem ser utilizadas para avaliar o ADN celular para um polimorfismo específico. Uma tecnologia denominada INVADER® emprega tais reações (por exemplo, de Arruda *et al.*, 2002; Stevens *et al.*, 2003). Em geral, existem três moléculas de ácido nucleico: 1) um oligonucleótido a montante do local alvo ("oligo a montante"), 2) uma sonda de oligonucleótido que cubra o local alvo ("sonda"), e 3) um ADN de cadeia simples com o local alvo ("alvo"). O oligo a montante e a sonda não se sobrepõem, mas contêm sequências contíguas. A sonda contém

um fluoróforo dador, tal como a fluoresceína, e um corante aceitador, tal como o Dabcyl. O nucleótido na extremidade do terminal 3' do oligonucleótido a montante sobrepõe ("invade") o primeiro par de bases de uma duplex de sonda alvo. Em seguida, a sonda é clivada por uma estrutura específica de nuclease 5' provocando a separação do par fluoróforo / extintor, o que aumenta a quantidade de fluorescência que pode ser detetada. Veja-se Lu *et al.*, 2004.

Em alguns casos, o ensaio é conduzido sobre uma superfície sólida, ou num formato de matriz.

I. Outros métodos para detetar SNP

São apresentados em seguida vários outros métodos específicos para a deteção e identificação de polimorfismo, e podem ser utilizados como tal ou com modificações adequadas, em conjunto com a identificação de polimorfismos do gene *ODC1* da presente invenção. Também são descritas vários outros métodos no sítio do SNP da NCBI na internet em ncbi.nlm.nih.gov/SNP.

Numa realização específica, os haplótipos ampliados podem ser determinados em qualquer dado local numa população, o que permite identificar precisamente os SNP que serão redundantes, e quais irão ser essenciais em estudos de associação. Este último é referido como "SNP marcador de haplotipo (htSNP)", marcadores que captam os haplótipos de um gene ou de uma região de desequilíbrio de ligação. Veja-se Johnson *et al.*, (2001) e Ke e Cardon (2003), para métodos exemplares.

O ensaio VDA utiliza a amplificação por PCR de segmentos genómicos através de métodos que utilizam reagentes de PCR longos TaKaRa LA Taq, e outras condições de reação padrão. A amplificação longa pode amplificar tamanhos de ADN de cerca de 2000-12.000 pb. A hibridação de produtos de detetor de matriz de variante (VDA) pode ser

realizada por um Centro Affymetrix High Throughput Screening, e analisados com o software informático.

Um método chamado ensaio Chip utiliza a amplificação por PCR de segmentos genómicos por protocolos de PCR padrão ou longos. Os produtos de hibridação são analisados por VDA, Halushka *et al.*, (1999). Os SNP são geralmente classificados como "certos" ou "prováveis", com base em análise de computador de padrões de hibridação. Em comparação com os métodos de deteção alternativos, tais como a sequenciação de nucleótidos, os SNP "certos" foram confirmados 100 % do tempo; e os SNP "prováveis" foram confirmados 73 % do tempo por este método.

Outros métodos envolvem simplesmente a amplificação por PCR a seguir à digestão com a enzima de restrição relevante. No entanto, outros envolvem a sequenciação dos produtos de PCR purificados de regiões genómicas conhecidas.

Em ainda outro método, os exões individuais ou os fragmentos que se sobrepõem de grandes exões são amplificados por PCR. Os oligonucleótidos iniciadores são concebidos a partir de sequências publicadas ou de bases de dados, e a amplificação por PCR de ADN genómico é realizada utilizando as condições que se seguem: 200 ng de ADN molde, 0,5 μ M de cada oligonucleótido iniciador, 80 μ M de cada de dCTP, dATP, dTTP e dGTP, 5 % de formamida, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,5 U de Taq polimerase e 0,1 volumes de tampão de Taq. A ciclagem térmica é realizada e os produtos de PCR resultantes são analisados por análise de PCR de polimorfismo de conformação de cadeia única (PCR-SSCP), sob uma variedade de condições, por exemplo, 5 ou 10 % de gel de poliacrilamida com 15 % de ureia, com ou sem 5 % de glicerol. A eletroforese é realizada durante a noite. Os produtos de PCR que mostram mudanças de mobilidade são reamplificados e sequenciados para identificar a variação de nucleótidos.

Num método chamado CGAP-GAI (DEMIGLACE), são

carregados na memória os dados da sequência e alinhamento (de um arquivo PHRAP.ace), pontuação de qualidade para as chamadas bases de sequência (a partir de arquivos de qualidade PHRED), informação de distância (a partir de programas PHYLIP dnadist e vizinhos) e de dados chamando de base (da alteração de PHRED'-d'). As sequências são alinhadas e examinadas para cada bloco vertical ('fatia') do conjunto resultante para discordância. Qualquer dita fatia é considerada um SNP candidato (DEMIGLACE). São usados uma série de filtros por DEMIGLACE para eliminar fatias que não são suscetíveis de representar polimorfismos verdadeiros. Estes incluem filtros que: (i) excluem sequências em qualquer fatia a partir da consideração de SNP onde a pontuação de qualidade da sequência vizinha baixa 40 % ou mais; (ii) excluem as chamadas em que a amplitude do pico está abaixo do percentil quinze de todas as chamadas de base para esse tipo de nucleótido; (iii) desqualificam regiões de uma sequência com um elevado número de divergências com o consenso de participar de cálculos de SNP; (iv) removem da ordem qualquer chamada de base com uma chamada alternativa, na qual o pico ocupa 25 % ou mais da área do pico da chamada; (v) excluem variações que ocorrem em apenas uma direção de leitura. As pontuações de qualidade PHRED foram convertidas em valores de probabilidade de erro para cada nucleótido na fatia. São usados métodos padrão Bayesian para calcular a probabilidade posterior de que existe evidência de heterogeneidade de nucleótidos numa dada localização.

Num método chamado CU-RDF (RESEQ), é realizada a amplificação por PCR a partir de ADN isolado a partir de sangue, utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos para cada SNP, e após os protocolos típicos de limpeza para remover os oligonucleótidos iniciadores não utilizados e os nucleótidos livres, sequenciação direta, usando os mesmos ou oligonucleótidos iniciadores próximos.

Num método chamado DEBNICK (método B), é realizada uma análise comparativa das sequências EST agrupadas, e confirmada por sequenciamento de ADN com base fluorescente. Num método relacionado, denominado DEBNICK (método C), é realizada e confirmada por análise de vestígios a análise comparativa das sequências de EST agrupadas com qualidade phred > 20 no local do desemparelhamento, qualidade média phred > = 20 por 5 bases no flanco 5' e 3' do SNP, sem desemparelhamentos em 5 bases 5' e 3' do SNP, pelo menos duas ocorrências de cada alelo.

Num método identificado por ERO (RESEQ), são concebidos novos conjuntos de oligonucleótidos iniciadores para STS publicados eletronicamente, e usados para amplificar o ADN de 10 espécies diferentes de ratinho. O produto de amplificação de cada estirpe é então purificado em gel e sequenciado usando um padrão de didesoxi, técnica de sequenciação com ciclo de terminadores marcados com ³³P. Todas as reações terminadas em ddATP são então carregadas em pistas adjacentes de um gel de sequenciação, seguidas por todas as reações ddGTP, e assim por diante. Os SNP são identificados por digitalização visual das radiografias.

Em outro método identificado como ERO (RESEQ-HT), são concebidos novos conjuntos de oligonucleótidos iniciadores para sequências de ADN murino publicadas eletronicamente, e usados para amplificar o ADN de 10 espécies diferentes de ratinho. O produto de amplificação de cada estirpe é preparado para a sequenciação por tratamento com a exonuclease I e a fosfatase alcalina de camarão. A sequenciação é realizada utilizando o Kit ABI Prism Big Dye Terminator Ready Reaction (Perkin-Elmer), e as amostras de sequência são corridas no 3700 DNA Analyzer (sequenciador de 96 capilares).

FGU-CBT (SCA2-SNP) identifica um método em que a região que contém o SNP foi amplificada por PCR usando os oligonucleótidos iniciadores SCA2-FP3 e SCA2-RP3. Cerca de

100 ng de ADN genómico é amplificado num volume de reação de 50 µl, contendo uma concentração final de 5 mM de Tris, 25 mM de KCl, 0,75 mM de MgCl₂, 0,05 % de gelatina, 20 pmol de cada oligonucleótido iniciador e 0,5 U de Taq ADN polimerase. As amostras são desnaturadas, emparelhadas e alongadas, e o produto de PCR é purificado a partir de uma banda cortado do gel de agarose, utilizando, por exemplo, o kit de extração de gel QIAquick (Qiagen), e é sequenciado usando química de terminador de corante num sequenciador de ADN ABI Prism 377 automatizado com os oligonucleótidos iniciadores de PCR.

Num método identificado como JBLACK (SEQ/RESTRICT), são realizadas duas reações de PCR independentes com o ADN genómico. Os produtos da primeira reação são analisados por sequenciação, indicando um sítio de restrição único FspI. A mutação é confirmada no produto da segunda reação de PCR por digestão com FspI.

Num método descrito como KWOK (1), os SNP são identificados por comparação dos dados de sequência genómico de alta qualidade de quatro indivíduos escolhidos aleatoriamente, por sequenciação direta de ADN dos produtos de PCR com química de terminador corante (veja-se Kwok et al., 1996). Num método relacionado identificado como KWOK (2) os SNP são identificados por comparação dos dados da sequência genómica de alta qualidade a partir de sobreposição de grandes clones de inserção, tais como os cromossomas artificiais de bactérias (BAC), ou os cromossomas artificiais à base de P1 (PAC). Uma STS contendo este SNP é então desenvolvida e a existência do SNP em várias populações é confirmada por sequenciação de ADN reunido (veja-se Taillon-Miller et al., 1998). Num outro método semelhante chamado KWOK (3), os SNP são identificados por comparação de dados de sequência genómica de alta qualidade a partir sobreposição de grandes clones de inserção BAC ou PAC. Os SNP encontrados através desta

abordagem representam variações na sequência de ADN entre os dois cromossomas doadores, mas ainda não foram determinadas as frequências alélicas na população geral. No método KWOK (5), os SNP são identificados por comparação de dados de sequências genómicas de alta qualidade a partir de uma amostra de ADN homozigótica, e uma ou mais amostras de ADN reunidas, por sequenciação direta de ADN dos produtos de PCR com química de terminador corante. As STS utilizados são desenvolvidas a partir de dados de sequências encontradas em bancos de dados disponíveis publicamente. Especificamente, estes STS são amplificados por PCR contra uma mole hidatiforme completa (CHM) que tem sido mostrada ser homozigótica em todos os loci, e um conjunto de amostras de ADN a partir de 80 originais de CEPH (veja-se Kwok et al., 1994).

Em outro dito método, KWOK (OverlapSnpDetectionWithPolyBayes), os SNP são descobertos por análise automatizada de computador das regiões de sobreposição de grandes inserções de sequências de clones de genoma humano. Para a aquisição de dados, as sequências de clones são obtidas diretamente a partir de centros de sequenciação em larga escala. Isto é necessário porque as sequências de qualidade de base não estão presentes / disponíveis através de GenBank. O processamento de dados brutos envolve a análise de sequências de clones e informações de acompanhamento de qualidade de base para consistência. As sequências terminadas ('base perfeita', taxa de erro inferior a 1 em 10.000 pb) sem sequências de qualidade de base associadas são atribuídas um valor de qualidade de base uniforme de 40 (taxa de erro de 1 em 10.000 pb). São rejeitadas as sequências de rascunho sem valores de qualidade de base. As sequências processadas são inseridas numa base de dados local. É também armazenada uma versão de cada sequência com repetições mascaradas humanas conhecidas. A repetição de mascaramento é realizada com o

programa "MASKERAID". Detecção de sobreposição: as sobreposições putativas são detetadas com o programa "WUBLAST". São seguidas várias etapas de filtragem a fim de eliminar os resultados da detecção de sobreposição falsos, ou seja, semelhanças entre um par de sequências de clones que surgem devido à duplicação de sequência em oposição à verdadeira sobreposição. O comprimento total de sobreposição, percentagem de semelhança global, o número de diferenças de sequências entre os nucleótidos com o valor alto de qualidade de base "desemparelhamentos de alta qualidade." Os resultados também são comparados com os resultados de mapeamento de fragmento de restrição de clones genómicos no Centro Washington University Genome Sequencing, relatórios de acabamentos em sobreposições, e os resultados do contínuo esforço de contrução de sequência na NCBI. Detecção de SNP: a sobreposição de pares de sequência de clones são analisadas para locais SNP candidatos com o software de detecção de SNP 'POLYBAYES'. As diferenças de sequência entre o par de sequências são pontuadas para a probabilidade da representação de verdadeira variação de sequência em oposição a um erro de sequenciação. Este processo requer a presença de valores de qualidade de base de ambas as sequências. Os candidatos com pontuação alta são extraídos. A pesquisa é restrita a variações do tipo de substituição de par de bases individual. A pontuação de confiança do SNP candidato é calculada pelo software POLYBAYES.

No método identificado por KWOK (ensaio TaqMan), o ensaio TaqMan é usado para determinar os genótipos para 90 indivíduos aleatórios. No método identificado por KYUGEN (Q1), as amostras de ADN de populações indicadas são reunidos e analisados por PLACE-SSCP. As alturas de pico de cada alelo na análise conjunta são corrigidas por aqueles num heterozigótico, e são utilizadas posteriormente para o cálculo das frequências alélicas. As frequências alélicas

superiores a 10 % são quantificados de forma fiável por meio deste método. A frequência alélica = 0 (zero) significa que o alelo foi encontrado entre os indivíduos, mas o pico correspondente não é visto no exame do conjunto. A frequência alélica = 0-0,1 indica que os alelos menores são detetados no conjunto, mas os picos são baixos demais para quantificar de forma fiável.

Em ainda outro método identificado como KYUGEN (Método 1), os produtos de PCR são pós-marcados com corantes fluorescentes, e analisados por um sistema de eletroforese capilar automatizada, sob condições de SSCP (PLACE-SSCP). São analisados quatro ou mais ADN individuais com ou sem dois ADN do conjunto (conjunto japonês e conjunto de originais CEPH) numa série de experiências. Os alelos são identificados por inspeção visual. Os ADN individuais com genótipos diferentes são sequenciados e os SNP identificados. As frequências alélicas são estimadas a partir de alturas de pico nas amostras combinadas, após a correção do viés de sinal usando as alturas de pico em heterozigóticos. Os oligonucleótidos iniciadores de PCR são marcados para terem 5'-ATT ou 5'-GTT nas suas extremidades para a pós-marcação de ambas as cadeias. As amostras de ADN (10 ng/ul) são amplificadas em misturas de reação contendo o tampão (10 mM de Tris-HCl, pH 8,3 ou 9,3, 50mM de KCl, 2,0 mM de MgCl₂), 0,25 µM de cada oligonucleótido iniciador, 200 µM de cada dNTP, e 0,025 unidades/µl de Taq ADN polimerase pré-misturada com o anticorpo anti-Taq. As duas cadeias de produtos de PCR são marcadas diferencialmente com nucleótidos modificados com R110 e R6G, por uma reação de intercâmbio de fragmento de Klenow da ADN polimerase I. A reação é parada pela adição de EDTA, e os nucleótidos não incorporados são desfosforilados pela adição de fosfatase alcalina intestinal de vitelo. Para SSCP: uma alíquota de produtos de PCR marcados com fluorescência e marcadores internos marcados com TAMRA são adicionados a formamida

desionizada, e desnaturados. A eletroforese é efetuada num capilar utilizando um analisador genético ABI Prism 310. São utilizados softwares Genescan (P-E Biosystems) para a recolha de dados e processamento de dados. O ADN de indivíduos (dois a onze), incluindo aqueles que apresentaram genótipos diferentes em SSCP, são sujeitos a sequenciação direta usando química de terminator com marcador grande, em sequenciadores ABI Prism 310. Vários arquivos de rastreamento de sequência obtidos a partir de ABI Prism 310 são processados e alinhados por Phred/Phrap, e vistos utilizando o visualizador Consed. Os SNP são identificados pelo software PolyPhred e inspeção visual.

Em ainda outro método identificado como KYUGEN (método 2), os indivíduos com genótipos diferentes são pesquisados por HPLC de desnaturação (DHPLC) ou por PLACE-SSCP (Inazuka *et al.*, 1997), e as suas sequências são determinadas para identificar SNP. A PCR é realizada com oligonucleótidos iniciadores marcados com 5'-ATT ou 5'-GTT nas suas extremidades para a pós-marcação de ambas as cadeias. A análise de DHPLC é levada a cabo utilizando o sistema de análise de fragmentos de ADN WAVE (Transgenomic). Os produtos de PCR são injetados na coluna DNASep, e separados de acordo com as condições determinadas usando o programa WAVEmaker (Transgenomic). As duas cadeias de produtos de PCR que são marcadas diferencialmente com nucleótidos modificados com R110 e R6G, por uma reação de intercâmbio de fragmento de Klenow da ADN polimerase I. A reação é parada pela adição de EDTA, e os nucleótidos não incorporados são desfosforilados pela adição de fosfatase alcalina intestinal de vitelo. A SSCP seguida de eletroforese é efetuada num capilar utilizando um analisador genético ABI Prism 310. Softwares Genescan (P-E Biosystems). O ADN de indivíduos, incluindo aqueles que apresentaram genótipos diferentes na DHPLC ou SSCP, são sujeitos a sequenciação direta usando química de terminador

de corante grande, num sequenciador ABI Prism 310. Vários arquivos de rastreamento de sequência obtidos a partir de ABI Prism 310 são processados e alinhados por Phred/Phrap, e vistos utilizando o visualizador Consed. Os SNP são identificados pelo software PolyPhred e inspeção visual. Os dados do traço do cromatograma de sequências EST em Unigene são processados com PHRED. Para identificar SNP prováveis, são relatadas desemparelhamentos de base individual a partir de alinhamentos de sequência múltipla, produzidos pelos programas de PHRAP, BRO e POA para cada conjunto Unigene. BRO corrigiu possíveis orientações EST de forma deturpada, enquanto POA identificou e analisou as estruturas de alinhamento não-lineares indicativas de mistura de genes / quimeras que possam produzir SNP falsos. A inferência Bayesiana é usada para pesar as evidências para o polimorfismo verdadeiro versus o erro de sequenciação, desalinhamento ou ambiguidade, mau agrupamento ou sequências de EST quiméricos, avaliando os dados como a altura bruta do cromatograma, a nitidez, a sobreposição e o espaçamento; taxas de erro de sequenciação; sensibilidade de contexto; biblioteca de origem de cADN, etc.

IX. Formulações farmacêuticas e vias de administração

Os compostos terapêuticos da presente divulgação podem ser administrados por uma variedade de métodos, por exemplo, por via oral ou por injeção (por exemplo, subcutânea, intravenosa, intraperitoneal, etc.). Dependendo da via de administração, os compostos ativos podem ser revestido com um material para proteger o composto da ação de ácidos e de outras condições naturais que podem inativar o composto. Também podem ser administrados por perfusão contínua / infusão de um local de uma doença ou de uma ferida.

Para administrar o composto terapêutico por outra que não a administração parentérica, pode ser necessário

revestir o composto com, ou coadministrar o composto com, um material para prevenir a sua inativação. Por exemplo, o composto terapêutico pode ser administrado a um paciente num transportador apropriado, por exemplo, lipossomas, ou um diluente. Os diluentes farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções tampão salinas e aquosas. Os lipossomas incluem emulsões CGF água-em-óleo-em-água, bem como lipossomas convencionais (Strejan *et al.*, 1984).

O composto terapêutico também pode ser administrado parentericamente, intraperitonealmente, intraespinalmente, ou intracerebralmente. As dispersões podem ser preparadas em glicerol, polietileno glicóis líquidos, e misturas dos mesmos, e em óleos. Sob condições normais de armazenamento e de utilização, estas preparações podem conter um conservante para evitar o crescimento de micro-organismos.

As composições farmacêuticas adequadas para a utilização injetável incluem soluções aquosas estéreis (quando solúveis em água), ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções injetáveis estéreis ou dispersão. Em todos os casos, a composição deve ser estéril e deve ser fluida na medida em que exista fácil seringabilidade. Deve ser estável sob as condições de fabrico e de armazenamento, e deve ser preservada contra a ação contaminante de micro-organismos, tais como bactérias e fungos. O transportador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (tal como glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e semelhantes), misturas adequadas dos mesmos, e óleos vegetais. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão, e pela utilização de agentes tensioativos. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser conseguida através de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido

ascórbico, timerosal, e outros semelhantes. Em muitos casos, será preferível incluir na composição agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, cloreto de sódio, ou poliálcoois tais como o manitol e o sorbitol. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida incluindo na composição um agente que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio ou gelatina.

As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas por incorporação do composto terapêutico na quantidade requerida num solvente apropriado, com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados anteriormente, como requerido, seguido de esterilização por filtração. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando o composto terapêutico num transportador estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários a partir daqueles enumerados anteriormente. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são a secagem em vácuo e a liofilização, que produzem um pó do ingrediente ativo (isto é, o composto terapêutico) mais qualquer ingrediente adicional desejado, a partir de uma solução estéril previamente filtrada dos mesmos.

O composto terapêutico pode ser administrado por via oral, por exemplo, com um diluente inerte ou um transportador comestível assimilável. O composto terapêutico e outros ingredientes também podem ser encerrados numa cápsula dura ou mole de gelatina, em comprimidos compressados, ou incorporados diretamente na dieta do sujeito. Para a administração terapêutica oral, o composto terapêutico pode ser incorporado com excipientes, e utilizado na forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, hóstias, e semelhantes. A percentagem do composto terapêutico nas composições e preparações pode, é claro, ser variada. A quantidade do composto terapêutico em ditas

composições terapeuticamente úteis é tal que será obtida uma dosagem adequada.

É especialmente vantajoso formular composições parentéricas em forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma de dosagem unitária tal como aqui utilizada, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os sujeitos a serem tratados; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto terapêutico calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, em associação com o transportador farmacêutico necessário. A especificação para as formas de dosagem unitária da invenção são ditadas por e diretamente dependentes de (a) as características únicas do composto terapêutico e do efeito terapêutico particular a ser alcançado, e (b) as limitações inerentes na tecnologia de compor um tal composto terapêutico para o tratamento de uma condição selecionada de um paciente.

O composto terapêutico também pode ser administrado topicamente na pele, olhos ou mucosa. Em alternativa, se é desejada a entrega local para os pulmões, o composto terapêutico pode ser administrado por inalação em pó seco ou formulação de aerossol.

Os compostos ativos são administrados a uma dosagem terapeuticamente eficaz suficiente para tratar uma condição associada com uma condição de um paciente. Por exemplo, a eficácia de um composto pode ser avaliada num sistema de modelo animal que pode prever a eficácia no tratamento da doença em seres humanos, tais como os sistemas de modelos apresentados nos exemplos e desenhos.

A quantidade de dosagem real de um composto da presente divulgação, ou composição que compreende um composto da presente divulgação, administrada a um sujeito pode ser determinada por fatores físicos e fisiológicos tais como a idade, o sexo, o peso corporal, a gravidade da

condição, o tipo de doença a ser tratada, as intervenções terapêuticas anteriores ou em simultâneo, a idiopatia do sujeito e a via de administração. Estes fatores podem ser determinados por um perito na tecnologia. O médico responsável pela administração determinará tipicamente a concentração de ingrediente(s) ativo(s) numa composição, e a(s) dose(s) adequada(s) para o sujeito individual. A dosagem pode ser ajustada pelo médico individual na eventualidade de qualquer complicação.

Uma quantidade eficaz irá tipicamente variar desde cerca de 0,001 mg/kg a cerca de 1000 mg/kg, de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 750 mg/kg, de cerca de 100 mg/kg a cerca de 500 mg/kg, de cerca de 1,0 mg/kg a cerca de 250 mg/kg, de cerca de 10,0 mg/kg a cerca de 150 mg/kg, em uma ou mais doses de administração diária, durante um ou vários dias (dependendo naturalmente do modo de administração e dos fatores discutidos anteriormente). Outros intervalos adequados incluem doses de 1 mg a 10.000 mg por dia, 100 mg a 10.000 mg por dia, 500 mg a 10.000 mg por dia, e 500 mg a 1000 mg por dia. Em algumas realizações particulares, a quantidade é inferior a 10.000 mg por dia, com uma gama de 750 mg a 9000 mg por dia.

A quantidade eficaz pode ser menor do que 1 mg/kg/dia, menor do que 500 mg/kg/dia, menor do que 250 mg/kg/dia, menor do que 100 mg/kg/dia, menor do que 50 mg/kg/dia, menor do que 25 mg/kg/dia, ou menor do que 10 mg/kg/dia. Em alternativa, pode estar na gama de 1 mg/kg/dia a 200 mg/kg/dia. Por exemplo, em relação ao tratamento de pacientes diabéticos, a dosagem unitária pode ser uma quantidade que reduz a glicose no sangue em, pelo menos, 40 % em relação a um sujeito não tratado. Numa outra realização, a dosagem unitária é uma quantidade que reduz a glicose no sangue para um nível que é de ± 10 % do nível de glicose no sangue de um sujeito não diabético.

Em outros exemplos não limitativos, uma dose pode

também compreender de cerca de 1 micrograma/kg/peso corporal, cerca de 5 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 10 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 50 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 100 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 200 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 350 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 500 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 1 miligrama/kg/peso corporal, cerca de 5 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 10 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 50 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 100 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 200 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 350 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 500 miligramas/kg/peso corporal, a cerca de 1000 mg/kg/peso corporal ou mais por administração, e qualquer gama derivável daí. Em exemplos não limitativos de uma gama derivável a partir dos números listados aqui, pode ser administrada uma gama de cerca de 5 mg/kg/peso corporal a cerca de 100 mg/kg/peso corporal, cerca de 5 microgramas/kg/peso corporal a cerca de 500 miligramas/kg/peso corporal, etc., com base nos números descritos anteriormente.

Em certas realizações, uma composição farmacêutica da presente divulgação pode compreender, por exemplo, pelo menos cerca de 0,1 % de um composto da presente divulgação. Em outras realizações, o composto da presente divulgação pode compreender entre cerca de 2 % a cerca de 75 % do peso da unidade, ou entre cerca de 25 % a cerca de 60 %, por exemplo, e qualquer gama derivável daí.

São contempladas doses únicas ou múltiplas dos agentes. Os intervalos de tempo desejados para a entrega de doses múltiplas podem ser determinados por um perito na tecnologia não usando mais do que experimentação de rotina. Como um exemplo, os sujeitos podem ser administrados duas

doses diariamente em intervalos de aproximadamente 12 horas. Em algumas realizações, o agente é administrado uma vez por dia.

O(s) agente(s) pode(m) ser administrado(s) numa programação de rotina. Tal como é aqui utilizado uma programação de rotina refere-se a um período de tempo designado predeterminado. A programação de rotina pode englobar períodos de tempo que são idênticos ou que diferem em comprimento, desde que o horário seja predeterminado. Por exemplo, a programação de rotina pode envolver a administração duas vezes por dia, todos os dias, a cada dois dias, a cada três dias, a cada quatro dias, a cada cinco dias, a cada seis dias, semanalmente, mensalmente ou a qualquer número de dias ou semanas determinados entre os mesmos. Alternativamente, a programação de rotina predeterminada pode envolver a administração numa base diária por duas vezes durante a primeira semana, seguindo-se por diariamente durante vários meses, etc. Em outras realizações, a invenção prevê que o(s) agente(s) pode(m) ser tomado(s) por via oral, e que o momento da toma é ou não é dependente da ingestão de alimentos. Assim, por exemplo, o agente pode ser tomado todas as manhãs e/ou todas as noites, independentemente de quando o sujeito comeu ou comerá.

X. Terapia combinada

A terapia de combinação eficaz pode ser alcançada com uma única composição ou formulação farmacológica que inclui ambos os agentes, ou com duas composições ou formulações distintas, administradas ao mesmo tempo, em que uma composição compreende um composto desta invenção, e a outra inclui o(s) segundo(s) agente(s). Alternativamente, a terapia pode preceder ou acompanhar o tratamento de outro agente em intervalos que variam de minutos a meses.

Podem ser utilizadas várias combinações, tais como em

que "A" representa o primeiro agente (ou seja, DFMO), e "B" representa um agente secundário (ou seja, um NSAID que não contém aspirina, por exemplo, o sulindac), exemplos não limitativos dos quais são descritos em seguida:

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		

XI. Exemplos

Os exemplos que se seguem são incluídos para demonstrar realizações preferidas da invenção. Deve ser apreciado pelos peritos na tecnologia que as técnicas divulgadas nos exemplos que se seguem representam técnicas descobertas pelo inventor para funcionarem bem na prática da invenção, e assim podem ser consideradas como constituindo modos preferidos para a sua prática. No entanto, os peritos na tecnologia devem, à luz da presente divulgação, apreciar que podem ser feitas muitas alterações nas realizações específicas que são divulgadas, e ainda assim obter um resultado semelhante ou parecido.

Exemplo 1 - Estudos epidemiológicos: associações de SNP +316 de ODC com sobrevivência específica de CRC

Desenho experimental: O estudo incluiu 440 casos incidentes de CRC da população com base no estudo de gene - ambiente de CRC familiar da UC Irvine (diagnosticado 1994-1996 com seguimento até março de 2008). O desfecho primário foi a sobrevivência específica de CRC (CRC-SS) dependente do genótipo ODC (GG vs AA/GA). Em linhas de células de cancro do cólon humano, a ligação específica do alelo de ODC de fatores de transcrição "E-box" foi determinada através de Western blot e ensaios de imuno-precipitação de cromatina (CHIP). A atividade do promotor específico do alelo de ODC foi determinada utilizando construções de promotor em combinação com vetores que expressam quer o

ativador de transcrição *c-MYC* ou o repressor *MAD1*.

Resultados: As diferenças de sobrevivência específicas de genótipo entre os casos de CRC foram limitadas a casos de cancro do cólon: em comparação com os casos de genótipo GG de ODC (HR = 1,00, referência), a razão de perigo (HR) ajustada de CRC-SS foi de 2,31 (1,15-4,64) para os casos GA de ODC, e 3,73 (0,93-14,99) para os casos AA de ODC (tendência de P = 0,006). Em células de cancro do cólon, o SNP +316 de ODC, ladeado por duas "E-boxes", prevê a atividade do promotor de ODC. O ativador de "E-box" *c-MYC* e os repressores *MAD1* e *MAD4* ligam-se preferencialmente ao menor alelo-A, comparado ao maior alelo-G, em células em cultura.

População do estudo. Foram estudados casos incidentes de CRC invasivo matriculados na Universidade da Califórnia, no estudo gene - ambiente de cancro colo-retal familiar de Irvine (Peel et al., 2000; Zell et al., 2007), durante 1994-1996, com acompanhamento até março de 2008. O estudo original foi desenhado para determinar a incidência de HNPCC numa grande coorte de base populacional dos casos de cancro colo-retal. Os participantes foram identificados através dos registros de cancro de base populacional do Programa de Vigilância do Cancro de Orange County / Imperial Organization for Cancer Control de São Diego, usando o arquivo de dados de abril de 2008. No estudo original (Peel et al., 2000), foram investigados todos os indivíduos com CRC diagnosticados em todas as idades em Orange County, CA, de 1994 a 1996. Também foram investigados todos os sujeitos diagnosticados em São Diego e Imperial Counties, CA, com idades < 65 anos, entre 1994 e 1995. Os casos foram então contactados se fossem elegíveis para o estudo (vivo na época determinada e ter um endereço de contacto), e se os seus médicos não negaram permissão para entrar em contacto. No momento da entrada no estudo, os casos assinaram um termo de consentimento permitindo

exames de sangue e a divulgação de informação médica. Este estudo foi aprovado pelo Institutional Review Board da UC Irvine (#93-257). Os dados clínicos e demográficos, incluindo o estado vital e o acompanhamento, foram obtidos através de ligação às bases de dados regionais de registo de cancro, tal como descrito anteriormente (Peel *et al.*, 2000; Zell *et al.*, 2007; Zell *et al.*, 2008). A determinação do estadio do tumor, nódulo, metástase (TNM) foi derivada de códigos AJCC existentes quando disponíveis, e conversão de medida de códigos de doenças, tal como relatado anteriormente (Le *et al.*, 2008). Foi confirmada a história familiar de cancro num parente de primeiro grau pelo autorrelato durante uma entrevista por telefone realizada no momento da inscrição (Zell *et al.*, 2008; Ziogas e Anton-Culver, 2003). Foram identificados vinte e dois casos com cancro de cólon hereditário sem polipose (HNPCC), conforme definido pelos critérios de Amesterdão, e excluídos da análise. O tempo médio desde o diagnóstico de CRC até à entrada no estudo (ou seja, a data da entrevista de história familiar) foi de 16 meses (IC 95 % 12-23 meses).

Extração de ADN e genotipagem de SNP +316 de ODC. O ADN foi extraído a partir de amostras de 2,0 ml de amostras de coágulo de glóbulos vermelhos usando os kits QIAGEN QIAamp DNA Midi ou Mini (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A genotipagem do SNP +316 de ODC foi realizada utilizando oligonucleótidos iniciadores desenhados para amplificar um fragmento de 172 pb contendo a base polimórfica a +316 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As sondas TaqMan específicas do alelo foram sintetizadas com diferentes marcadores a 5' (6-carboxifluoresceína ou VIC), e o mesmo corante extintor a 3' (6-carboxitetrametilrodamina) (23). Cada reação de PCR (5 µl no total) continha 10 ng de ADN do participante, 30 pmol de cada oligonucleótido iniciador, 12,5 pmol de cada sonda

TaqMan, e 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), tal como relatado anteriormente (Martinez et al., 2003; Guo et al., 2000).

Análise estatística - estudo de base populacional. O tamanho da amostra foi determinado com base numa estimativa de razão de 1:1 de genótipo GG de ODC para o genótipo GA/AA de ODC (Martinez et al., 2003; Barry et al., 2006; Hubner et al., 2008; Guo et al., 2000). A análise prévia de dados de 1154 casos de cancro do cólon e do reto no estudo gene - ambiente de CRC familiar da UC Irvine revelou que a sobrevivência de 10 anos específica de CRC era aproximadamente 66 % (Zell et al., 2008). Os inventores fizeram uma proposta de 15 % ou mais na diferença na sobrevivência específica de CRC com base somente no genótipo ODC, para os nossos cálculos do tamanho da amostra. Assim, foram necessários 315 sujeitos no total para detetar a diferença proposta na sobrevivência de 10 anos específica de CRC entre dois grupos de 5 % de nível de significância, com poder de 80 %: 55 % no grupo 1 versus 70 % no grupo 2. Foram genotipadas com sucesso 440 de 481 amostras de ADN. 41 casos (8,5 %) resultaram num genótipo indeterminado +316 de ODC devido à baixa concentração de ADN e/ou à má qualidade de ADN, no entanto, não foram observadas diferenças clínico-patológicas entre os casos genotipados com êxito e genotipados sem êxito. Assim, o estudo foi suficientemente desenvolvido para resolver o ponto final primário.

As comparações de variáveis demográficas, clínicas e patológicas entre os casos de cólon e de reto foram feitas usando o teste estatístico qui-quadrado de Pearson ou o teste exato de Fisher para variáveis nominais, e o teste t de Student para variáveis contínuas. A sobrevivência específica para o cancro colo-retal foi definida como a mortalidade do própria CRC, e a censura de dados ocorreu

nos seguintes casos: vivos no final do seguimento, perda de seguimento, ou morte por qualquer causa que não seja CRC. A sobrevivência global (OS) foi definida com a mortalidade por qualquer causa. As curvas de sobrevivência foram construídas para casos de cancro do cólon e retal, utilizando o método de Kaplan-Meier, e analisadas com o teste de classificação log para análises univariadas. A modelagem de perigos Cox proporcionais foi realizada em todos os casos de CRC, os casos de cancro do cólon, e os casos de cancro do reto, utilizando o tempo desde o diagnóstico para traçar o perfil do risco ajustado de morte em geral e específica de CRC, com base no genótipo ODC. Os efeitos do genótipo ODC (GG, GA ou AA) sobre a sobrevivência foram analisados nos modelos de Cox com ajuste para as seguintes covariáveis: idade, sexo, etnia, história familiar de CRC, estadio TNM no diagnóstico, localização do tumor no cólon, subtipo histológico, tratamento com cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Cada variável no modelo foi codificada utilizando variáveis simuladas. Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC). A significância estatística foi assumida para um valor de P de 2 caudas $< 0,05$.

Exemplo 2 - Estudos experimentais: regulação de SNP +316 de ODC em células de cancro do cólon

Cultura celular. As linhas celulares HT29 e HCT116 de cancro de cólon humano foram mantidas em meio McCoy 5A (Invitrogen, Carlsbad, CA). Todos os meios utilizados foram suplementados com 10% de FBS, mais 1 % de solução de penicilina / estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA). As culturas foram mantidas a 37 °C numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂.

Ensaio de genotipagem. As amostras de ADN a partir de células HT29 e HCT116 foram submetidas a um procedimento de PCR-RFLP para detetar o local polimórfico de PstI. As sequências foram amplificadas por PCR, utilizando os seguintes oligonucleótidos iniciadores: 5'-TCTGCGCTTCCCCATGGGGCT-3' (SEQ ID NO: 1) e 5'-TTTCCCAACCCTTCG-3' (SEQ ID NO: 2). Cada reação continha - 1 µl de ADN, 4 pmol de cada oligonucleótido iniciador, 12,5 µl de 2x de tampão PCR PreMixes "G" (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI), e 0,5 unidades de Taq ADN polimerase, num volume final de 25 µl. O tamanho esperado do produto de PCR era de 351 pb. Após a amplificação, 10-20 µl do produto de PCR foram digeridos com 10 unidades de PstI em 30 µl, durante 2 horas a 37 °C. O ADN de células HT29 (GA), que contém o local de PstI, originou dois fragmentos de 156 e 195 pb.

Análise de Western blot. As células foram recolhidas e submetidas a lise, e as proteínas foram separadas num gel SDS-PAGE de 12,5 %. As proteínas foram transferidas por eletroforese para uma membrana de Hybond-C. A membrana foi bloqueada com Blotto A (5 % de leite em pó de grau de bloqueio em solução TTBS), e testada utilizando diluições de 1:300 de anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) em Blotto A. Os anticorpos primários foram incubados a 4 °C durante a noite, seguido por incubação com um anticorpo secundário marcado com HRP apropriado (diluição 1:1000) durante 1 hora à temperatura ambiente. A deteção quimioluminescente foi realizada usando o reagente ECL Western Detection (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) e exposta em filme Biomax XAR (Kodak).

Imunoprecipitação de cromatina (CHIP). Os ensaios CHIP foram realizados utilizando um kit comercial, tal como recomendado pelo fabricante (Upstate Biotech, Lake Placid,

NY, EUA). Resumidamente, as células foram tratadas com 1 % de formaldeído para reticular o ADN e as proteínas, e os complexos de ADN - proteína foram rompidos por sonicação para comprimentos entre 200 a 1000 pb. Os lisados foram diluídos 10 vezes com tampão de diluição de imunoprecipitação (IP) contendo inibidores de protease. Os anticorpos para *c-MYC*, *MAD1* e *MAD4* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) foram usados para precipitar a cromatina, enquanto que a amostra adicional foi deixada como um controlo negativo do anticorpo (-Ab). As amostras foram imunoprecipitadas durante a noite a 4 °C com rotação. Os complexos imunitários foram obtidos pela adição de 60 µl de ADN de esperma de salmão / suspensão de agarose de proteína A, e incubando durante uma hora a 4 °C com rotação, seguido por centrifugação suave (1000 rpm, 1 min). Os precipitados de agarose de proteína A foram lavados com tampão de baixo teor salino, tampão de alto teor salino, tampão de LiCl e tampão de TE. Em seguida os complexos foram eluídos por adição de 250 µl de tampão de eluição (0,1 M de NaHCO₃, 1 % de SDS), duas vezes, e as ligações cruzadas de ADN - proteína foram revertidas com 0,2 M de NaCl, por aquecimento a 65 °C durante 4 horas, para todas as amostras, incluindo o ADN de entrada e o ADN dos controlos -Ab. O ADN foi ressuscitado em 30 µl de ddH₂O. Para a visualização do produto de PCR e do seu tamanho, foram realizadas reações de PCR padrão. As sequências dos oligonucleótidos iniciadores de ODC utilizados para a PCR foram 5'-CCTGGGCGCTCTGAGGT-3' (SEQ ID NO: 3) (17 mero) e 5'-AGGAAGCGGCGCCTCAA-3' (SEQ ID NO: 4) (17 mero). Foi realizada PCR quantitativa em tempo real utilizando kits de ensaio de expressão de genes TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) num sistema de deteção de sequência ABI7700. Os detalhes para o cálculo da relação de ligação podem ser encontrados no sítio de internet do fabricante (<http://www.appliedbiosystems.com/>).

Transfecções transitórias. As transfecções transitórias foram realizadas utilizando o reagente LipofectAMINE (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acordo com o protocolo do fabricante, conforme descrito no documento suplementar. As células HCT116 e HT29 foram transfectadas com 1 µg dos plasmídeos pGL3-ODC/A ou pGL3-ODC/G (Martinez *et al.*, 2003), juntamente com 0,01 µg de plasmídeo Renilla-TK. O plasmídeo Renilla-TK foi adquirido à Promega (Madison, WI) e utilizado como um controlo da eficiência de transfeção em todas as experiências de transfeção repórter promotor. Para as experiências de *c-MYC*, os plasmídeos pGL3 ODC foram cotransfectados quer com pcDNA 3.0 ou o vetor de expressão CMV-*c-MYC* (OriGene, Rockville, MD). Para as experiências de *MAD1*, os plasmídeos de ODC foram cotransfectados quer com pcDNA 3.1 ou com pcDNA-*MAD1*. Para a cotransfeção de *c-MYC* e *MAD1*, as construções repórter de promotor de ODC foram preparadas de forma a conter o primeiro 1,6 Kb do gene ODC clonado num pGL3 vetor. As construções incluíram a "E-box" 1 (-485 a -480 pb) intacta ("E-box" 1 do tipo selvagem) ou eliminada ("E-box" 1 mutante). Para além disso, foram utilizadas ambas as variantes de SNP +316 de ODC, criando um total de quatro construções diferentes. Após 6 horas de incubação, as células foram suplementadas com meio completo contendo 20 % de FBS, e foram deixadas a crescer durante a noite. No dia seguinte após a transfeção, o meio completo contendo 20 % de FBS foi substituído por meio contendo 10% de FBS. 48 horas após a transfeção as células foram lavadas com PBS, e lisadas em tampão de lise passiva do kit de ensaio de Dual luciferase (Promega, Madison, WI). As atividades da luciferase dupla foram medidas usando um luminómetro Turner Designs TD-20/20, tal como descrito pelo fabricante, e apresentadas como unidades relativas de luciferase (RLU). As experiências foram realizadas em triplicado e repetidas pelo menos duas vezes.

Análise estatística - estudos experimentais. Para as experiências de transfecção transiente foram utilizados testes t de duas amostragens (Microsoft Excel Microsoft Corp., Redmond, WA). O efeito da expressão de *c-MYC* sobre a atividade do promotor específico de alelo de ODC foi examinado em células de cancro do cólon HT29, com construções do promotor de ODC diferindo pela presença do primeiro elemento "E-box": (a) "E-box" 1 +316 G do tipo selvagem (wt), (b) "E-box" 1 +316 G mutante (mut), (c) "E-box" 1 +316 A do tipo selvagem, e (d) "E-box" 1 + 316 A mutante. Para cada construção do promotor, foram utilizados os testes t de duas amostragens, para comparar a atividade do promotor entre células cotransfetadas com plasmídeo pcDNA3.0 versus aquelas transfetadas com o vetor de expressão CMV-*c-MYC*. Da mesma forma, para examinar o efeito da expressão de *MAD1* na atividade do promotor específico de alelo de ODC, foram utilizados testes-t de duas amostragens, para comparar o efeito da atividade do promotor em construções de promotor cotransfetadas com o plasmídeo pcDNA3.1 versus aquelas transfetadas com o plasmídeo pcDNA-*MAD1*. A significância estatística foi assumida para um valor de P de 2 caudas < 0,05.

Exemplo 3 - Efeitos diferenciais do genótipo ODC1

Este estudo envolve a análise dos dados do paciente de um ensaio de prevenção de adenoma de cólon de estadio III em múltiplos centros (Meyskens et al., 2008). Foram incluídos 375 pacientes, e o estudo foi interrompido pelo Comité de Monitorização de Dados de Segurança (DSMB) após 267 pacientes completaram colonoscopias de fim de estudo (devido ao estudo cumprir os seus pontos finais de eficácia). O DSMB monitorizou todos os pontos finais de segurança e eficácia. As amostras de sangue foram recolhidas em 228 pacientes do estudo com consentimento,

para a análise de genotipagem após novembro de 2002 (incluindo 159 de 246 pacientes aleatorizados antes, e 69 de 129 pacientes aleatorizados após esta data), quando o protocolo foi modificado, tendo em conta os dados que demonstram a importância do SNP de *ODC1* (2). A genotipagem de *ODC1* (rs2302615) foi realizada com o ADN genómico derivado de paciente, utilizando sondas TaqMan específicas de alelo, tal como descrito anteriormente (Guo *et al.*, 2000). O teor de poliamina do tecido retal foi determinada tal como descrito anteriormente (Meyskens *et al.*, 1998; Seiler e Knodgen, 1980), utilizando 3 de 8 amostras de biópsia da mucosa retal selecionadas aleatoriamente. A resposta tecidual de poliamina foi realizada para valores de resposta que variam de 25 % a 45 %.

O genótipo *ODC1* foi analisado sob um modelo dominante: pacientes AA/GA versus GG. Foram realizados testes de soma de pontuações de Wilcoxon em variáveis contínuas distribuídas não-normalmente em dois grupos de genótipos. Os testes de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher foram utilizados para avaliar a associação entre as variáveis categóricas na linha de base e o grupo de genótipo. Foi realizada uma regressão log binomial no resultado primário (recorrência de adenoma) com preditores: grupo de tratamento, idade, sexo, raça (caucasiano versus outro), uso de aspirina, genótipo *ODC1* (no modelo dominante), e um termo que representa o tratamento por interação de genótipo. Para os resultados secundários (resposta de tecido retal a poliaminas, toxicidades), os efeitos do grupo de tratamento, genótipo e a interação entre o tratamento e o genótipo foram examinados através de modelos completos de log binomial. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico SAS 9.2 (SAS Inc., Cary, NC). Os pacientes assinaram o consentimento informado para a inclusão no ensaio e recuperação / análise de amostra. O estudo foi aprovado após a revisão completa do comité pelo

conselho de revisão institucional de UC Irvine (protocolo IRB # 2002-2261), e a revisão por cada um dos IRB locais em locais participantes do estudo.

A distribuição dos genótipos *ODC1* foi: 126 GG (55 %), 87 GA (38 %), e 15 AA (7 %). As características clínicas de linha de base revelaram diferenças, tal como se mostra na tabela 1. O risco relativo (RR) de recorrência de adenoma relacionado com o tratamento após o ajustamento no modelo de regressão total foi de 0,39 (IC de 95 % 0,24-0,66). Entre os pacientes que receberam o placebo ou o tratamento, respetivamente, a ototoxicidade ocorreu em 23 % versus 22 % de pacientes GG de *ODC1*, 20 % versus 21 % de pacientes GA de *ODC1*, e 0 % (0 de 7) versus 57 % (4 de 7) de pacientes AA de *ODC1*.

Tabela 1. Características clínicas de todos os sujeitos na linha de base (n = 228) por genótipo de *ODC1*.

	genótipo AA/GA <i>ODC1</i> (n = 102)	genótipo GG <i>ODC1</i> (n = 126)	P *
Idade média (anos $\pm$ desvio padrão "SD")	60,2 $\pm$ 8,4 SD	62,6 $\pm$ 8,7 SD	0,024†
Género (n, %)			
Masculino	77 (75 %)	96 (76 %)	0,90
Feminino	25 (25 %)	30 (24 %)	
Etnia (n, %)			
Branco	84 (82 %)	107 (85 %)	0,007‡
Preto	3 (3 %)	4 (3 %)	
Hispanico	4 (4 %)	12 (10 %)	
Asiático	9 (9 %)	1 (1 %)	
Outros	2 (2 %)	2 (2 %)	
Grupo de tratamento (n, %)			
Eflornitine + sulindac	46 (45 %)	71 (56 %)	0,09
Placebo	56 (55 %)	55 (44 %)	
Uso de aspirina em baixa dose (n, %)			
Sim	44 (43 %)	54 (43 %)	0,97

Não	58 (57 %)	72 (57 %)	
Nº. médio (Com mínimo - máximo)	2,00 (1,11)	2,00 (1,16)	0,41†
Localização do maior pólipó anterior (n, %)			
Reto	26 (25 %)	23 (18 %)	0,19
Cólon	76 (75 %)	103 (82 %)	
Histologia do pólipó anterior (n, %)			
Tubular	76 (75 %)	99 (79 %)	0,03‡
Adenoma-NOS	6 (6 %)	8 (6 %)	
Tubuloviloso	10 (10 %)	17 (13 %)	
Viloso	7 (7 %)	1 (1 %)	
Carcinoma in-situ	3 (3 %)	0 (0 %)	
Adenoma tubular, displasia de elevado grau	0 (0 %)	1 (1 %)	
Maior pólipó ≥ 1 cm (n, %)	25 (25 %)	40 (32 %)	0,23
Tratamento realizado ao pólipó anterior (n, %)			
Remoção endoscópica completa	92 (90 %)	117 (93 %)	0,47
Cirurgia	10 (10 %)	9 (7 %)	
Teor de poliamina no tecido na linha de base§ (média, nmol/mg de proteína, gama)			
Putrescina	0,47 (0,01 - 4,60)	0,56 (0,01 - 5,29)	0,48†
Espermidina	1,99 (0,76 - 9,18)	2,17 (1,05 - 8,97)	0,08†
Espermina	6,82 (2,29 - 19,86)	7,29 (2,72 - 22,85)	0,23†
Razão espermidina : espermina	0,30 (0,19 - 0,98)	0,31 (0,19 - 0,76)	0,23†

* o valor de p para o teste do X^2 está listado salvo indicação em contrário.

† valor de p para o teste de categorização de somas de Wilcoxon.

‡ valor de p para o teste exato de Fisher.

§ ausência de dados de poliamina no tecido para 1 sujeito com genótipo GG de *ODC1* e 1 sujeito com genótipo AA/GA de *ODC1*

Tabela 2. Análise de sobrevivência global multivariada e de sobrevivência específica de cancro colo-retal para os casos de cancro colo-retal com base no genótipo *ODC1*.

	Genótipo <i>ODC1</i>		<i>P</i>
	GG	GA/AA	
Mortalidade global			
Número de eventos	47	62	
Número em risco	208	192	
HR não ajustado (IC 95 %)	1 (referência)	1,57 (1,07 - 2,29)	0,020
HR ajustado (IC 95 %)*	1 (referência)	1,58 (1,07 - 2,34)	0,021
Mortalidade específica de CRC			
Número de eventos	22	37	
Número em risco	208	192	
HR não ajustado (IC 95 %)	1 (referência)	1,97 (1,16 - 3,34)	0,012
HR ajustado (IC 95 %)*	1 (referência)	2,02 (1,17 - 3,50)	0,012

Abreviatura: IC 95 %, intervalo de confiança de 95 %.

* Inclui estratificação para o estadió (I, II, III) e ajuste para a idade (y), género, etnia, história familiar de cancro colo-retal, estadió TNM na altura do diagnóstico, localização do tumor no cólon - reto, subtipo histológico, tratamento com cirurgia, radioterapia, e quimioterapia.

Tabela 3. Incidência de eventos após a aleatorização e estratificação pelo genótipo *ODC1* (modelo dominante).

	Placebo (n = 111)		Eflornitine / sulindac (n = 117)		<i>P</i> *
	GG <i>ODC1</i>	GA ou AA <i>ODC1</i>	GG <i>ODC1</i>	GA ou AA <i>ODC1</i>	
Qualquer recorrência de adenoma	22/44 (50)	18/53 (34)	7/64 (11)	9/42 (21)	< 0,0001
Qualquer evento adverso - nº. de pacientes com eventos adversos (%)					
Nº. de pacientes com eventos cardiovasculares† (%)	8/55 (15)	8/56 (14)	13/71 (18)	9/46 (20)	0,30

Nº. de pacientes com eventos gastrointestinais† (%)	4/55 (7)	8/56 (14)	9/71 (13)	7/46 (15)	0,54
Nº. de pacientes com perda auditiva de pelo menos 15 dB a ≥ 2 frequências (%)	10/44 (23)	9/52 (17)	14/63 (22)	11/41 (27)	0,26
* Valor de P para o teste da razão de verossimilhança para o efeito do tratamento (eflornitine e sulindac vs. placebo) na recorrência de adenoma no modelo completo que inclui como covariáveis a idade, o gênero, a raça / etnia, o uso de aspirina, o tratamento, o genótipo e o tratamento e a interação de genótipo. Foi detetada uma interação estatisticamente significativa no modelo completo para a recorrência de adenoma ($P = 0,038$); não foi detetada nenhuma interação para a toxicidade cardiovascular, a toxicidade gastrointestinal, ou a ototoxicidade. † Os eventos cardiovasculares incluíram a doença arterial coronária, o infarto do miocárdio, o acidente vascular cerebral, a insuficiência cardíaca congestiva e a dor no peito. ‡ Os eventos gastrintestinais incluíram a hemorragia gastrointestinal (de qualquer região), tal como a hemorragia retal, a hemorragia gastrointestinal superior, a hematoquezia, ou o sangue oculto nas fezes.					

Tabela 4. Eficácia e eventos adversos e o SNP +316 de ODC1.

	Placebo (N = 111)			DFMO / sulindac (N = 117)			P
	GG ODC (N = 55)	GA ODC (N = 48)	AA ODC (N = 8)	GG ODC (N = 71)	GA ODC (N = 39)	AA ODC (N = 7)	
Qualquer recorrência de adenoma (%)	22/44 (50)	(35)	(29)	7/64 (11)	(14)	(57)	< 0,0001
Nº. de pacientes com eventos cardiovasculares (%) a	8/55 (15)	7/48 (15)	1/8 (13)	13/71 (18)	7/39 (18)	2/7 (29)	0,37
Nº. de pacientes com eventos gastrointestinais‡ (%) b	4/55 (7)	8/48 (17)	0/8 (0)	9/71 (13)	5/39 (13)	2/7 (29)	0,45

Nº. de pacientes com perda auditiva de pelo menos 15 dB a > 2 frequências (%) c	10/44 (23)	9/45 (20)	0/8 (0)	14/63 (22)	7/34 (21)	4/7 (57)	0,020
---	---------------	--------------	------------	---------------	--------------	-------------	-------

Referências

- Patente U.S. 3 647 858
- Patente U.S. 3 654 349
- Patente U.S. 4 330 559
- Patente U.S. 4 413 141
- Patente U.S. 4 582 788
- Patente U.S. 4 656 127
- Patente U.S. 4 683 194
- Patente U.S. 4 683 202
- Patente U.S. 5 814 625
- Patente U.S. 5 843 929
- Patente U.S. 5 952 174
- Patente U.S. 6 258 845
- Alberts et al., J Cell. Biochem. Supp., (22): 18-23, 1995.
- AMA Drug Evaluations Annual, 1814-1815, 1994.
- Babbar et al., Biochem. J., 394: 317-24, 2006.
- Babbar et al., J Biol. Chem., 278(48): 47762-47775, 2003.
- Barry et al., J Natl. Cancer Inst., 98(20): 1494-500, 2006.
- Bedi et al., Cancer Res., 55(9): 1811-1816, 1995.
- Bellofernandez et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7804-8, 1993.
- Bussey, Hepatology, 12(1): 175-6, 1990.
- Childs et al., Cell. Molec. Life Sci., 60: 1394-1406, 2003.
- de Arruda et al., Expert Rev. Mol. Diagn., 2(5): 487-496, 2002.
- Derynck et al., Nature Genetics, 29: 117-29, 2001.

- DuBois et al., *Cancer Res.*, 56: 733-737, 1996.
- Erdman et al., *Carcinogenesis*, 20: 1709-13, 1999.
- European Appln. 201,184
- European Appln. 237,362
- European Appln. 258,017
- European Appln. 50,424
- European Appln. 84,796
- French Appln. 2,650,840
- Fultz e Gerner, *Mol. Carcinog.*, 34: 10-8, 2002.
- Gerner e Meyskens, *Nature Rev. Cancer*, 4: 781-92, 2004.
- Gerner et al., *Cancer Epidemoil. 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.
- Halushka et al., *Nat. Genet.*, 22(3): 239-247, 1999.
- Hanif et al., *Biochemical Pharmacology*, (52): 237-245, 1996.
- Hubner et al., *Clin. Cancer Res.*, 14(8): 2303-9, 2008.
- Ignatenko et al., *Cancer Biol. Ther.*, 5(12): 1658-64, 2006.
- Inazuka et al., *Genome Res*, 7(11): 1094-1103, 1997.
- Iwamoto et al., *Carcinogenesis*, 21: 1935-40, 2000.
- Johnson et al., *Nat. Genet.*, 29(2): 233-237, 2001.
- Ke e Cardon, *Bioinformatics*, 19(2): 287-288, 2003.
- Keller e Giardiello, *Cancer Biol. Ther.*, 2(4 Suppl 1): S140-9, 2003.
- Kingsnorth et al., *Cancer Res.*, 43(9): 4035-8, 1983.
- Komher et al., *Nucl. Acids. Res.* 17: 7779-7784, 1989.
- Kuppuswamy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1143-1147, 1991.
- Kwok e Chen, *Curr Issues Mol. Biol.*, Apr; 5(2): 43-60, 2003.
- Kwok et al., *Genomics*, 23(1): 138-144, 1994.
- Kwok, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2: 235-258, 2001.
- Kwok et al., *Genomics*, 31(1): 123-6, 1996.

- Ladenheim et al., *Gastroenterology*, 108: 1083-1087, 1995.
- Landegren et al., *Science*, 241: 1077-1080, 1988.
- Lanza et al., *Arch. Intern. Med*, 155: 1371-1377, 1995.
- Le et al., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 17: 1950-62, 2008.
- Lipkin, J. *Cell Biochem. Suppl.*, 28-29: 144-7, 1997.
- Lippman, *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 3(10): 523, 2006.
- Love et al., *J Natl. Cancer Inst.*, 85: 732-7, 1993.
- Lu et al., *Eukaryot Cell.*, 3(6): 1544-56, 2004.
- Luk e 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.
- Maxam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 560, 1977.
- McLaren et al., *Cancer Prev. Res.*, 1(7): 514-21, 2008.
- Meyskens et al., *Cancer Prev. Res.*, 1(1): 32-8, 2008.
- Meyskens et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 86(15): 1122-1130, 1994.
- Meyskens et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 90(16): 1212-8, 1998.
- Mullis et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273, 1986.
- Muscat et al., *Cancer*, 74: 1847-1854, 1994.
- Narisawa et al., *Cancer Res.*, 41(5): 1954-1957, 1981.
- Nickerson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8923-8927, 1990.
- Nyren et al., *Anal. Biochem.*, 208: 171-175, 1993.
- O'Brien et al., *Molec. Carcinog.*, 41(2): 120-3, 2004.
- Pardali e Moustakas, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1775: 21-62, 2007.
- PCT Appln. WO 91/02087
- PCT Appln. WO 92/15712
- Peel et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 92: 1517-22, 2000.

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

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

Piazza 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.

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

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

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

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.

Rice et al., *Mol. Cancer Ther.*, 2(9): 885-92, 2003.

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

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

Seiler e Knodgen, *J. Chromatogr.*, 221(2): 227-235, 1980.

Simoneau et al., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 17: 292-9, 2008.

Simoneau et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 93: 57-9, 2001.

Singh e Reddy, *Annals. NY Acad. Sci.*, (768): 205-209, 1995.

Singh et al., *Carcinogenesis*, (15): 1317-1323, 1994.

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

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

Stevens et al., *Biotechniques*, 34: 198-203, 2003.

Strejan et al., *Cell Immunol.*, 84(1): 171-184, 1984.

Su et al., *Science*, (256): 668-670, 1992.

Syvanen et al., *Genomics* 8: 684-692, 1990.

Taillon-Miller et al., *Genome Res*, 8(7): 748-754, 1998.

Tempero et al., *Cancer Res.*, 49(21): 5793-7, 1989.

Thomas e Thomas, *J Cell Mol. Med.*, 7: 113-26, 2003.

Thompson et al., *J Natl. Cancer Inst.*, (87): 125-1260, 1995.

Ugozzoll et al., *GATA* 9: 107-112, 1992.

Vane e Botting, Adv Exp Med Biol., 433: 131-8, 1997.
Visvanathan et al., J. Urol., 171(2 Pt 1): 652-5, 2004.
Wallace, Eur. J. Clin. Invest., 30: 1-3, 2000.
Zell et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 17: 3134-40, 2008.
Zell et al., Cancer Prev. Res., 2(3): 209-12, 2009.
Zell et al., Clin. Cancer Res., 15(19): 6208-16, 2009.
Zell et al., Intl. J. Cancer, 120: 459-68, 2007.
Ziogas e Anton-Culver, Am. J Prev. Med., 24: 190-8, 2003.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

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

<120> DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE CARCINOMA COM BASE NO
GENÓTIPO ODC1

<130> CAPP: 006WO

<140> DESCONHECIDO

<141> 2010-05-14

<150> 61/217682

<151> 2009-06-03

<150> 61/217679

<151> 2009-06-03

<150> 61/216216

<151> 2009-05-14

<160> 5

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido iniciador sintético

<400> 1

tctgcgcttc cccatggggc t 21

<210> 2

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido iniciador sintético

<400> 2

tttcccaacc ctteg 15

<210> 3

<211> 17

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido iniciador sintético

400> 3

cctggg'gcgt ctgaggt 17

<210> 4

<211> 17

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido iniciador sintético

<400> 4

aggaagcggc gcctcaa 17

<210> 5

<211> 42

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido iniciador sintético

<400> 5

gcacgtgtgc ggcgcgcctc gccggcctgc ggagacacgt gg 42

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 6258845 B, Gerner and Meyskens [0041] [0058] [0068] [0151]
- US 4413141 A [0051] [0151]
- US 4330559 A [0051] [0151]
- US 3647858 A [0059] [0151]
- US 3654349 A [0059] [0151]
- US 5814625 A [0061] [0151]
- US 5843929 A [0061] [0151]
- EP 50424 A [0090] [0151]
- EP 84796 A [0090] [0151]
- EP 258017 A [0090] [0151]
- EP 237362 A [0090] [0151]
- EP 201184 A [0090] [0151]
- US 4683202 A [0090] [0151]
- US 4582788 A [0090] [0151]
- US 4683194 A [0090] [0151]
- US 4656127 A [0091] [0151]
- FR 2650840 [0093] [0151]
- WO 9102087 A [0093] [0151]
- WO 9215712 A [0094] [0151]
- US 5952174 A [0096] [0151]
- WO 61217682 A [0152]

- WO 61217679 NN [0152]
- WO 61216216 A [0152]

Documentos de não patente citados na descrição

- **GERNER ; MEYSKENS.** *Clin. Cancer Res.*, 2009, vol. 15 (3), 758-761 [0003]
- **ALBERTS et al.** *J Cell. Biochem. Supp.*, 1995, 18-23 [0151]
- *AMA Drug Evaluations Annual*, 1994, 1814-1815 [0151]
- **BABBAR et al.** *Biochem. J.*, 2006, vol. 394, 317-24 [0151]
- **BABBAR et al.** *J Biol. Chem.*, 2003, vol. 278 (48), 47762-47775 [0151]
- **BARRY et al.** *J Natl. Cancer Inst.*, 2006, vol. 98 (20), 1494-500 [0151]
- **BEDI et al.** *Cancer Res.*, 1995, vol. 55 (9), 1811-1816 [0151]
- **BELLOFERNANDEZ et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7804-8 [0151]
- **BUSSEY.** *Hepatology*, 1990, vol. 12 (1), 175-6 [0151]
- **CHILDS et al.** *Cell. Molec. Life Sci.*, 2003, vol. 60, 1394-1406 [0151]
- **DE ARRUDA et al.** *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2002, vol. 2 (5), 487-496 [0151]
- **DERYNCK et al.** *Nature Genetics*, 2001, vol. 29, 117-29 [0151]
- **DUBOIS et al.** *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 733-737 [0151]
- **ERDMAN et al.** *Carcinogenesis*, 1999, vol. 20, 1709-13 [0151]
- **FULTZ ; GERNER.** *Mol. Carcinog.*, 2002, vol. 34, 10-8 [0151]
- **GERNER ; MEYSKENS.** *Nature Rev. Cancer*, 2004, vol. 4,

781-92 [0151]

- **GERNER et al.** *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1994, vol. 3, 325-330 [0151]
- **GIARDIELLO et al.** *Cancer Res.*, 1997, vol. 57, 199-201 [0151]
- **GUO et al.** *Cancer Res.*, 2000, vol. 60 (22), 6314-6317 [0151]
- **HALUSHKA et al.** *Nat. Genet.*, 1999, vol. 22 (3), 239-247 [0151]
- **HANIF et al.** *Biochemical Pharmacology*, 1996, vol. 52, 237-245 [0151]
- **HUBNER et al.** *Clin. Cancer Res.*, 2008, vol. 14 (8), 2303-9 [0151]
- **IGNATENKO et al.** *Cancer Biol. Ther.*, 2006, vol. 5 (12), 1658-64 [0151]
- **INAZUKA et al.** *Genome Res*, 1997, vol. 7 (11), 1094-1103 [0151]
- **IWAMOTO et al.** *Carcinogenesis*, 2000, vol. 21, 1935-40 [0151]
- **JOHNSON et al.** *Nat. Genet.*, 2001, vol. 29 (2), 233-237 [0151]
- **KE; CARDON.** *Bioinformatics*, 2003, vol. 19 (2), 287-288 [0151]
- **KELLER; GIARDIELLO.** *Cancer Biol. Ther.*, 2003, vol. 2 (4), 140-9 [0151]
- **KINGSNORTH et al.** *Cancer Res.*, 1983, vol. 43 (9), 4035-8 [0151]
- **KOMHER et al.** *Nucl. Acids. Res.*, 1989, vol. 17, 7779-7784 [0151]
- **KUPPUSWAMY et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 1143-1147 [0151]
- **KWOK; CHEN.** *Curr Issues Mol. Biol.*, April 2003, vol. 5 (2), 43-60 [0151]
- **KWOK et al.** *Genomics*, 1994, vol. 23 (1), 138-144 [0151]

- **KWOK.** *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2001, vol. 2, 235-258 [0151]
- **KWOK et al.** *Genomics*, 1996, vol. 31 (1), 123-6 [0151]
- **LADENHEIM et al.** *Gastroenterology*, 1995, vol. 108, 1083-1087 [0151]
- **LANDEGREN et al.** *Science*, 1988, vol. 241, 1077-1080 [0151]
- **LANZA et al.** *Arch. Intern. Med*, 1995, vol. 155, 1371-1377 [0151]
- **LE et al.** *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2008, vol. 17, 1950-62 [0151]
- **LIPKIN.** *J. Cell Biochem. Suppl.*, 1997, vol. 28-29, 144-7 [0151]
- **LIPPMAN.** *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2006, vol. 3 (10), 523 [0151]
- **LOVE et al.** *J Natl. Cancer Inst.*, 1993, vol. 85, 732-7 [0151]
- **LU et al.** *Eukaryot Cell.*, 2004, vol. 3 (6), 1544-56 [0151]
- **LUK; BAYLIN.** *N. Engl. J. Med.*, 1984, vol. 311 (2), 80-83 [0151]
- **LUPULESCU.** *Cancer Detect. Prev.*, 1996, vol. 20 (6), 634-637 [0151]
- **MARTINEZ et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, 7859-64 [0151]
- **MATSUBARA et al.** *Clinical Cancer Res.*, 1995, vol. 1, 665-71 [0151]
- **MAXAM et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, 560 [0151]
- **MCLAREN et al.** *Cancer Prev. Res.*, 2008, vol. 1 (7), 514-21 [0151]
- **MEYSKENS et al.** *Cancer Prev. Res.*, 2008, vol. 1 (1), 32-8 [0151]
- **MEYSKENS et al.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 1994, vol. 86 (15), 1122-1130 [0151]

- **MEYSKENS et al.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, vol. 90 (16), 1212-8 [0151]
- **MULLIS et al.** *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, vol. 51, 263-273 [0151]
- **MUSCAT et al.** *Cancer*, 1994, vol. 74, 1847-1854 [0151]
- **NARISAWA et al.** *Cancer Res.*, 1981, vol. 41 (5), 1954-1957 [0151]
- **NICKERSON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 8923-8927 [0151]
- **NYREN et al.** *Anal. Biochem.*, 1993, vol. 208, 171-175 [0151]
- **O'BRIEN et al.** *Molec. Carcinog.*, 2004, vol. 41 (2), 120-3 [0151]
- **PARDALI ; MOUSTAKAS.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, vol. 1775, 21-62 [0151]
- **PEEL et al.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, vol. 92, 1517-22 [0151]
- **PEGG.** *Biochem.*, 1986, vol. 234 (2), 249-262 [0151]
- *Physician's Desk Reference, Medical Economics Data, Montville, N.J.*, 1999, 1745-1747 [0151]
- **PIAZZA et al.** *Cancer Res.*, 1995, 311-3116 [0151]
- **PIAZZA et al.** *Cancer Res.*, 1997, 2452-2459 [0151]
- **PIAZZA et al.** *Cancer Res.*, 1997, 2909-2915 [0151]
- **POLLARD; LUCKERT.** *Cancer Res.*, 1989, vol. 49, 6471-6473 [0151]
- **PREZANT et al.** *Hum. Mutat.*, 1992, vol. 1, 159-164 [0151]
- **PSATY ; POTTER.** *N. Engl. J. Med.*, 2006, vol. 355 (9), 950-2 [0151]
- **RAO et al.** *Cancer Res.*, 1995, 1464-1472 [0151]
- **REDDY et al.** *Cancer Res.*, 1990, 2562-2568 [0151]
- **REDDY et al.** *Cancer Res.*, 1987, vol. 47, 5340-5346 [0151]
- **RICE et al.** *Mol. Cancer Ther.*, 2003, vol. 2 (9), 885-92 [0151]

- **ROBERTS; WAKEFIELD.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, 8621-3 [0151]
- **SANGER et al.** *J. Molec. Biol.*, 1975, vol. 94, 441 [0151]
- **SEILER ; KNODGEN.** *J. Chromatogr.*, 1980, vol. 221 (2), 227-235 [0151]
- **SIMONEAU et al.** *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2008, vol. 17, 292-9 [0151]
- **SIMONEAU et al.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001, vol. 93, 57-9 [0151]
- **SINGH; REDDY.** *Annals. NY Acad. Sci.* 1995, vol. 768, 205-209 [0151]
- **SINGH et al.** *Carcinogenesis*, 1994, vol. 15, 1317-1323 [0151]
- **SMALL et al.** *N. Engl. J. Med.*, 2002, vol. 347, 1135-1142 [0151]
- **SOKOLOV.** *Nucl. Acids Res.*, 1990, vol. 18, 3671 [0151]
- **STEVENS et al.** *Biotechniques*, 2003, vol. 34, 198-203 [0151]
- **STREJAN et al.** *Cell Immunol.*, 1984, vol. 84 (1), 171-184 [0151]
- **SU et al.** *Science*, 1992, 668-670 [0151]
- **SYVANEN et al.** *Genomics*, 1990, vol. 8, 684-692 [0151]
- **TAILLON-MILLER et al.** *Genome Res*, 1998, vol. 8 (7), 748-754 [0151]
- **TEMPERO et al.** *Cancer Res.*, 1989, vol. 49 (21), 5793-7 [0151]
- **THOMAS; THOMAS.** *J Cell Mol. Med.*, 2003, vol. 7, 113-26 [0151]
- **THOMPSON et al.** *J Natl. Cancer Inst.*, 1995, 125-1260 [0151]
- **UGOZZOLL et al.** *GATA*, 1992, vol. 9, 107-112 [0151]
- **VANE ; BOTTING.** *Adv Exp Med Biol.*, 1997, vol. 433, 131-8 [0151]
- **VISVANATHAN et al.** *J. Urol.*, 2004, vol. 171, 652-5

[0151]

- **WALLACE.** *Eur. J. Clin. Invest.*, 2000, vol. 30, 1-3
[0151]
- **ZELL et al.** *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2008,
vol. 17, 3134-40 [0151]
- **ZELL et al.** *Cancer Prev. Res.*, 2009, vol. 2 (3), 209-
12 [0151]
- **ZELL et al.** *Clin. Cancer Res.*, 2009, vol. 15 (19),
6208-16 [0151]
- **ZELL et al.** *Intl. J. Cancer*, 2007, vol. 120, 459-68
[0151]
- **ZIOGAS ; ANTON-CULVER.** *Am. J Prev. Med.*, 2003, vol. 24,
190-8 [0151]

Lisboa, 23 de Setembro de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição que compreende a α -difluorometilornitina (DFMO) e um fármaco anti-inflamatório, não-esteróide, que não contém aspirina (NSAID), para o uso no tratamento preventivo ou curativo de carcinoma colo-retal ou nos fatores de risco do mesmo num paciente; em que o genótipo do paciente na posição +316 de pelo menos um alelo do gene promotor *ODC1* é G; e em que o tratamento dos fatores de risco do carcinoma colo-retal no paciente evita a formação de novos focos de cripta aberrantes, novos pólipos adenomatosos ou de novos adenomas com displasia no paciente; opcionalmente, em que o paciente é um ser humano.

2. Uma composição que compreende a α -difluorometilornitina (DFMO) para o uso no tratamento preventivo ou curativo de carcinoma colo-retal, ou de fatores de risco do mesmo, tal como definido na reivindicação 1, num paciente, tal como definido na reivindicação 1; em que ao paciente é também administrada uma composição que compreende um fármaco anti-inflamatório, não-esteróide, que não contém aspirina (NSAID), sendo a composição que compreende o NSAID que não contém aspirina, administrada ao paciente antes, ao mesmo tempo, ou após a administração da composição que compreende a DFMO.

3. Uma composição que compreende um fármaco anti-inflamatório, não-esteróide, que não contém aspirina (NSAID), para o uso no tratamento preventivo ou curativo de carcinoma colo-retal, ou de fatores de risco do mesmo, tal como definido na reivindicação 1, num paciente, tal como definido na reivindicação 1; em que ao paciente é também administrada uma composição que

compreende a α -difluorometilornitina (DFMO), sendo a composição que compreende a DFMO administrada ao paciente antes, ao mesmo tempo, ou após a administração da composição que compreende o NSAID que não contém aspirina.

4. A composição para o uso de qualquer uma das reivindicações de 1-3, em que o genótipo do paciente é determinado através da receção de um relatório que contém o genótipo referido, ou tendo um histórico do paciente que revela os resultados; ou por meio da determinação da base do nucleótido na posição +316 de um alelo do gene promotor *ODC1* do paciente; ou por meio da determinação das bases de nucleótidos na posição +316 de ambos os alelos do gene promotor *ODC1* do paciente.

5. A composição para o uso de qualquer uma das reivindicações de 1-3, em que o genótipo do paciente na posição +316 de ambos os alelos do gene promotor *ODC1* é GG ou GA.

6. A composição para o uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1-5, em que, antes de ser determinado o genótipo do paciente, o paciente já estava a ser tratado com uma composição que compreende a DMFO e/ou o NSAID que não contém aspirina, mas a uma dose mais baixa de DMFO e/ou de NSAID que não contém aspirina.

7. A composição para o uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1-6, em que o NSAID que não contém aspirina é selecionado a partir do grupo que consiste de um inibidor seletivo de COX-2, sulindac e celecoxib.

8. A composição para o uso de qualquer uma das reivindicações de 1-7, em que o NSAID que não contém aspirina é sulindac, e em que

- (i) a DFMO é administrada por via oral, opcionalmente em que a quantidade eficaz de DFMO é de 500 mg/dia;
- (ii) a DFMO é administrada por via intravenosa, opcionalmente em que a quantidade eficaz de DFMO é de desde 0,05 a 5,0 g/m²/dia; ou
- (iii) a DFMO é administrada pelo menos uma segunda vez.

9. A composição para o uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1-7, em que o NSAID que não contém aspirina é sulindac, e em que a quantidade eficaz de sulindac é de desde 10 a 1500 mg/dia, tal como de desde 10 a 400 mg/dia, ou tal como 150 mg/dia; ou em que o sulindac é administrado pelo menos uma segunda vez.

10. A composição para o uso de qualquer uma das reivindicações de 1-7, em que o paciente referido tem um tumor sólido, e o tumor sólido é ressecado.

11. A composição para o uso de qualquer uma das reivindicações de 1-10, em que o cancro colo-retal é de fase I, ou fase II, ou fase III, ou fase IV.

12. A composição para o uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1-11, em que o tratamento previne a formação de novas neoplasias colo-retais avançadas (por exemplo, novas neoplasias colo-retais avançadas do lado direito, ou novas neoplasias colo-retais avançadas do lado esquerdo) no paciente, ou o tratamento previne a ototoxicidade ou o risco da mesma no paciente.

13. A composição para o uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1-12, em que o paciente tenha sido identificado como tendo

- (i) um ou mais pólipos adenomatosos no cólon, reto ou apêndice;

- (ii) uma ou mais neoplasias colo-retais avançadas; ou
- (iii) um diagnóstico de polipose adenomatosa familiar.

14. A composição para o uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1-13, em que o paciente tem uma história de ressecção de um ou mais adenomas colo-retais.

Lisboa, 23 de Setembro de 2014

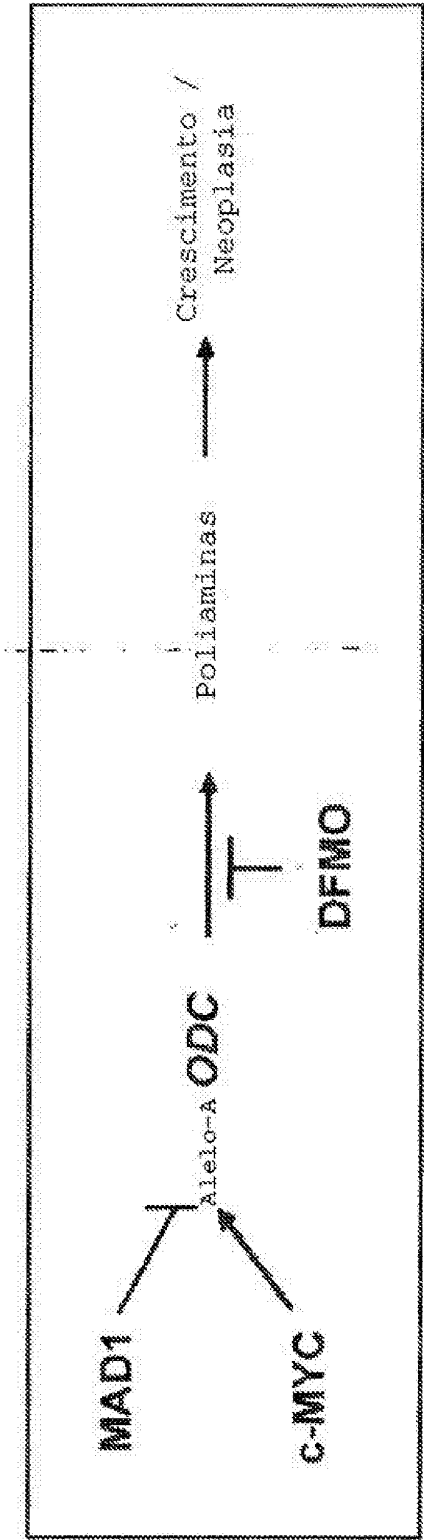


FIG. 1

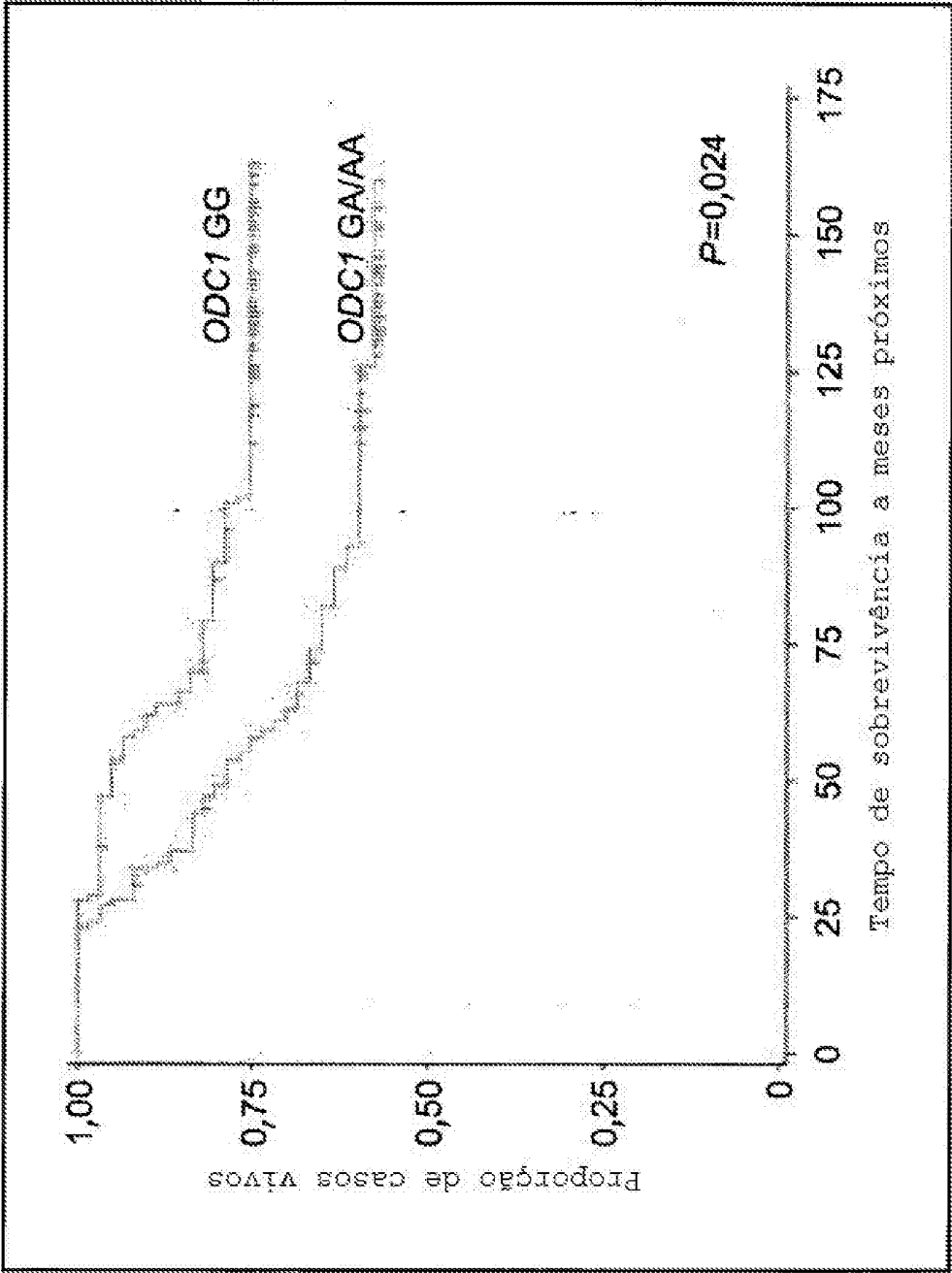
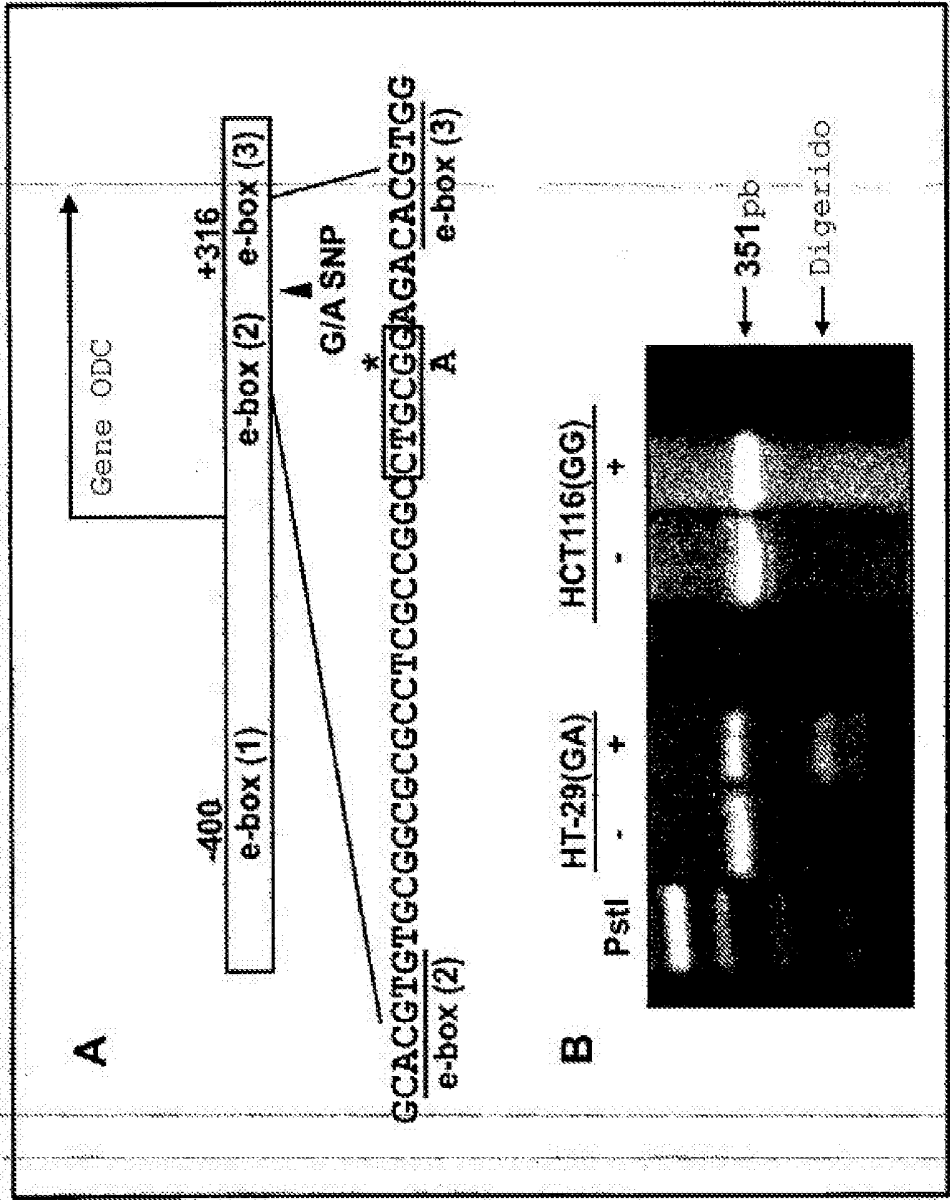
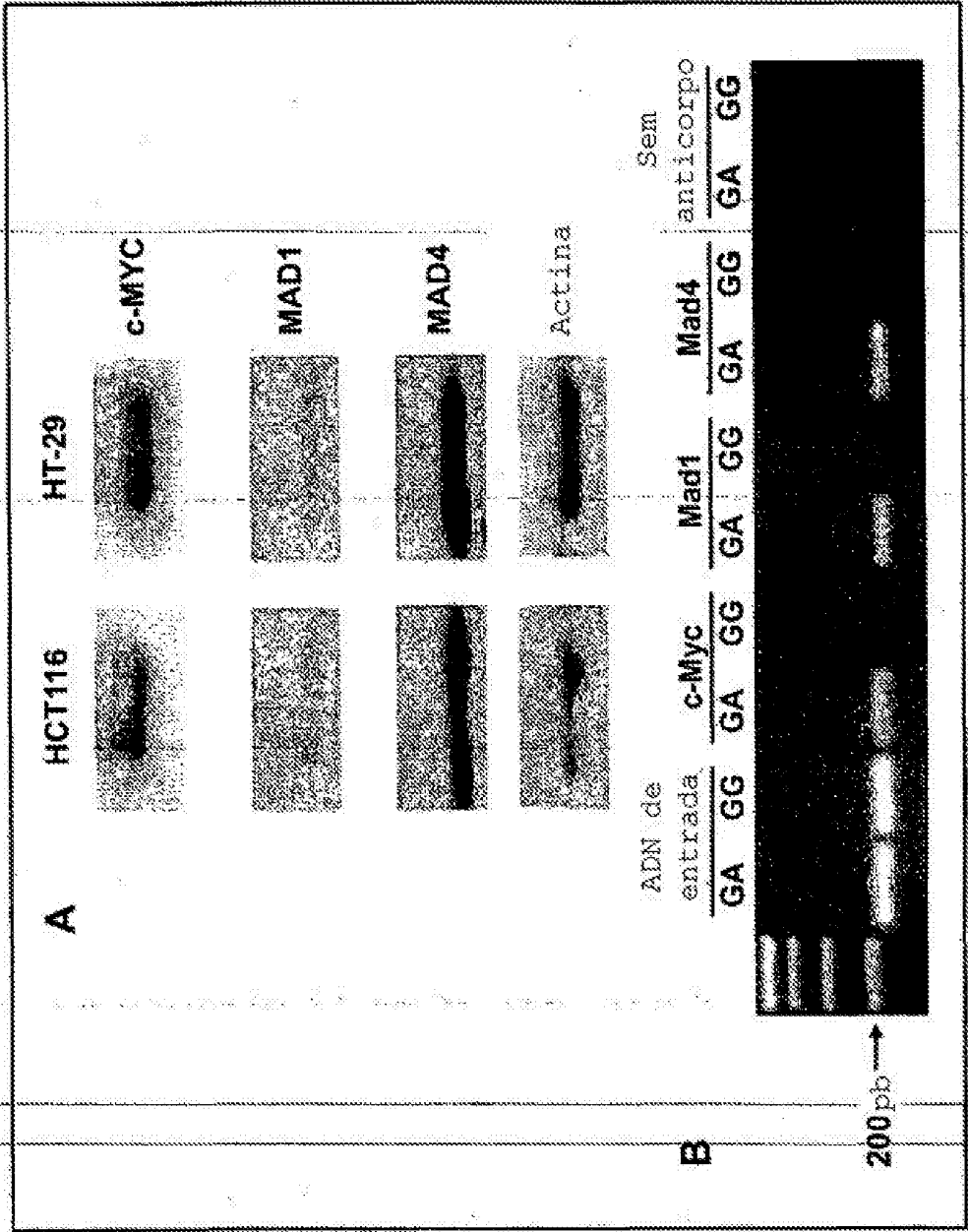


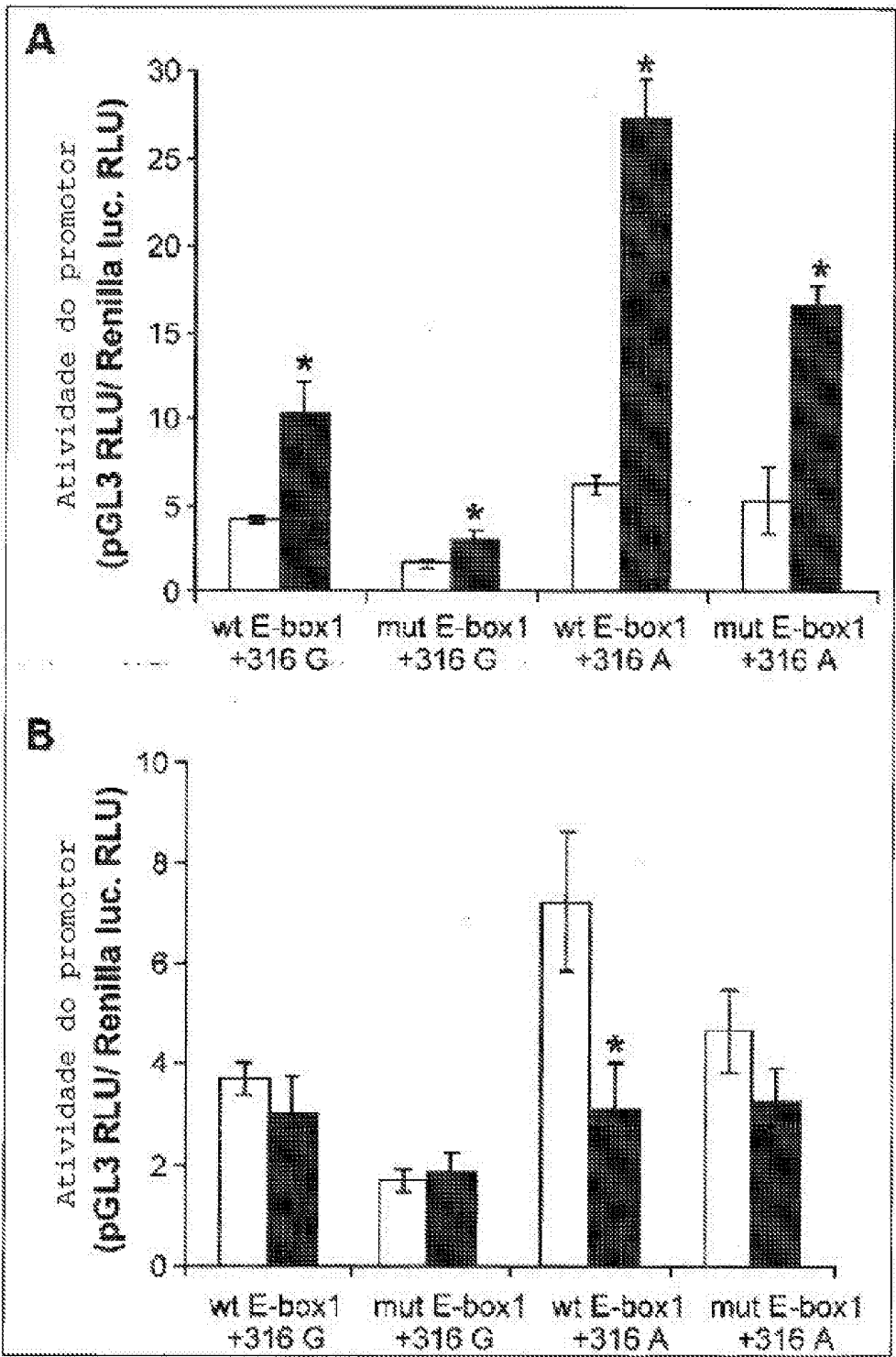
FIG. 2



FIGS. 3A e B



FIGS. 4A e B



FIGS. 5A e B

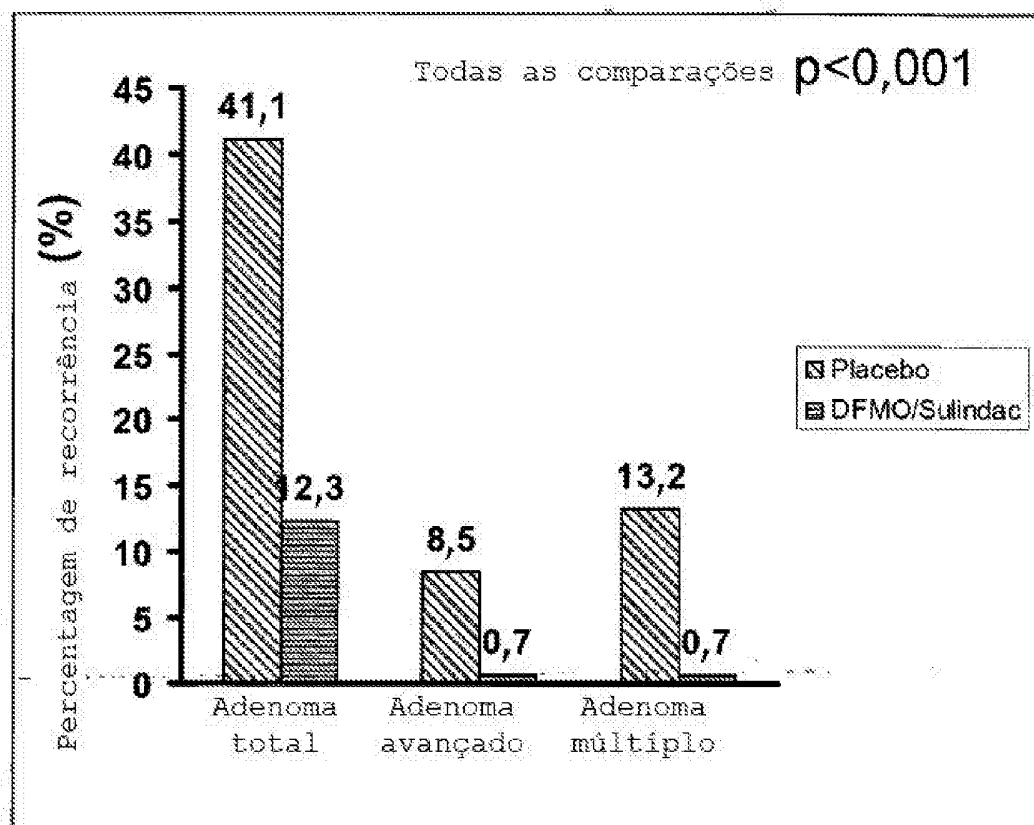


FIG. 6

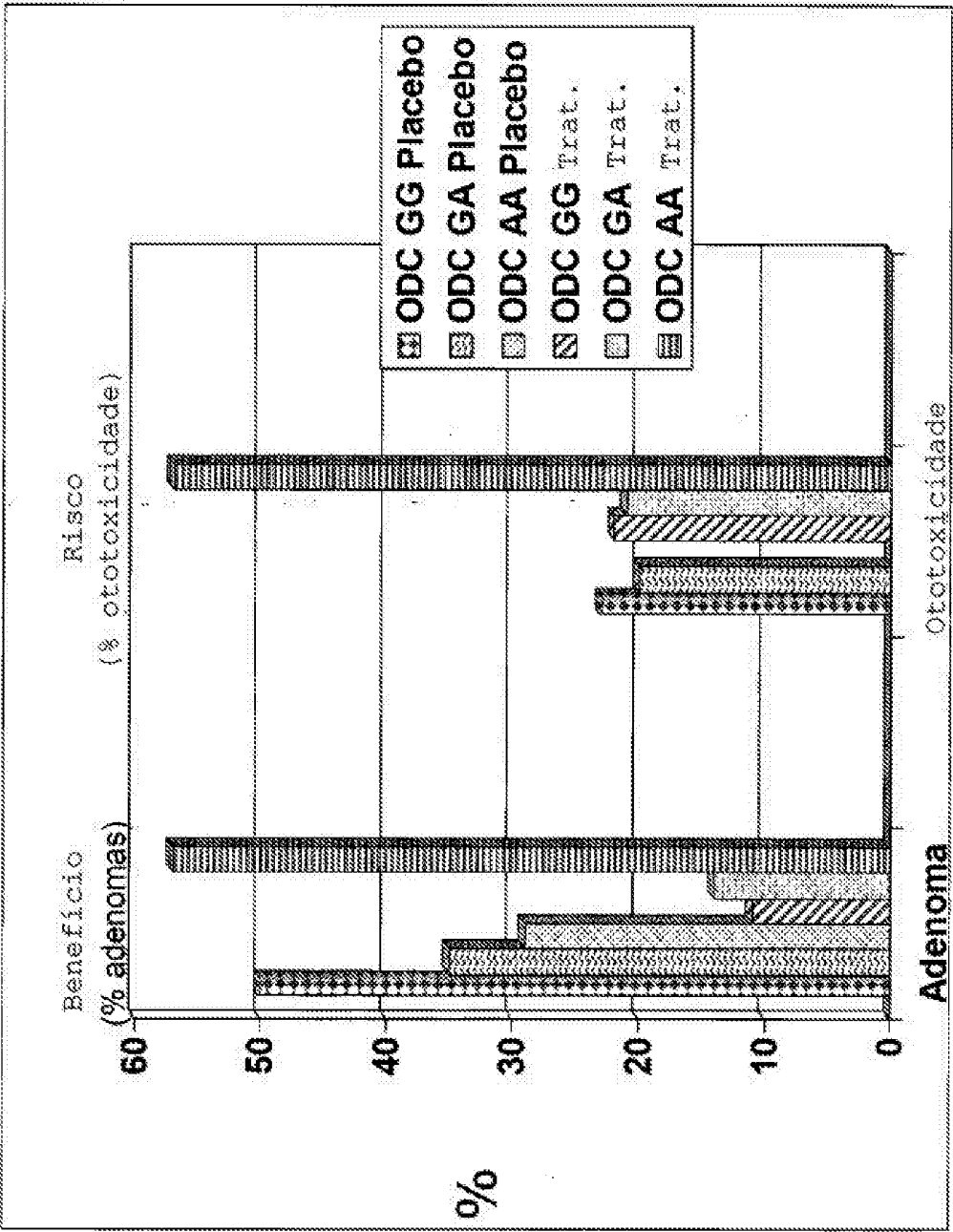
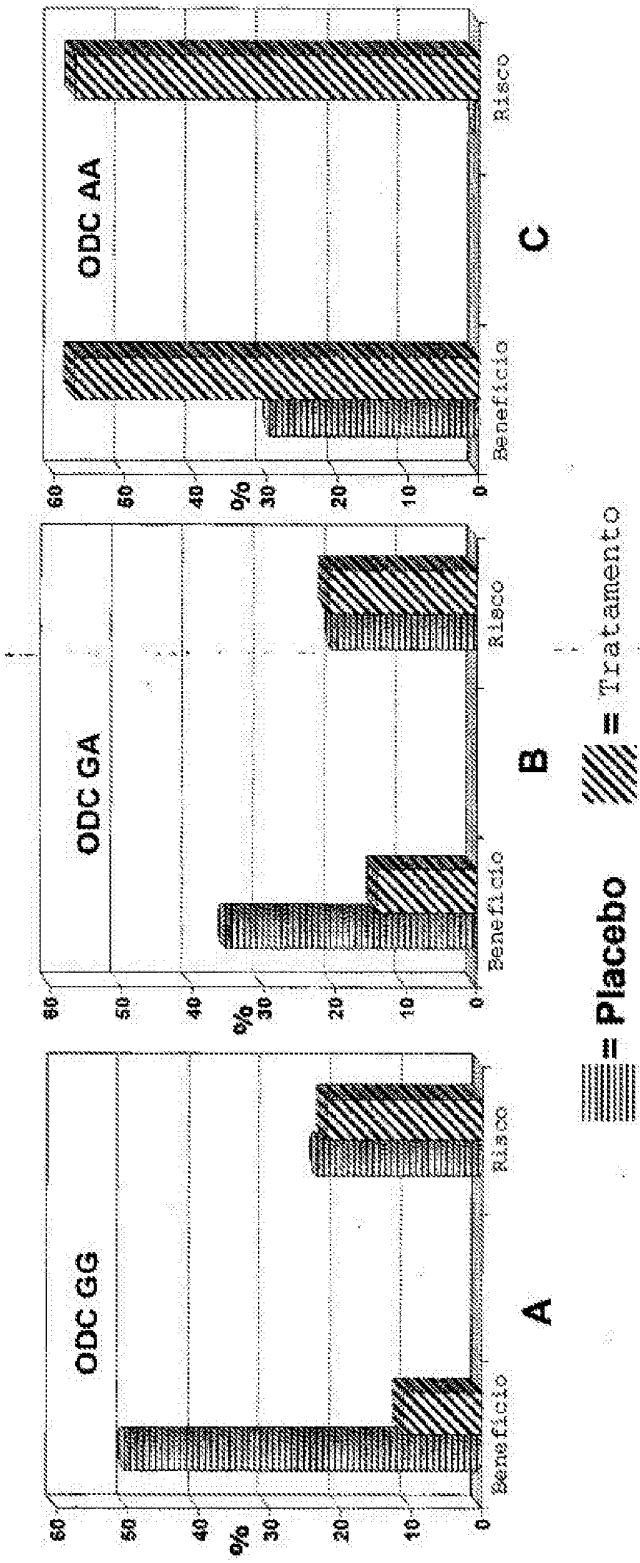


FIG. 7



FIGS. 8A-C

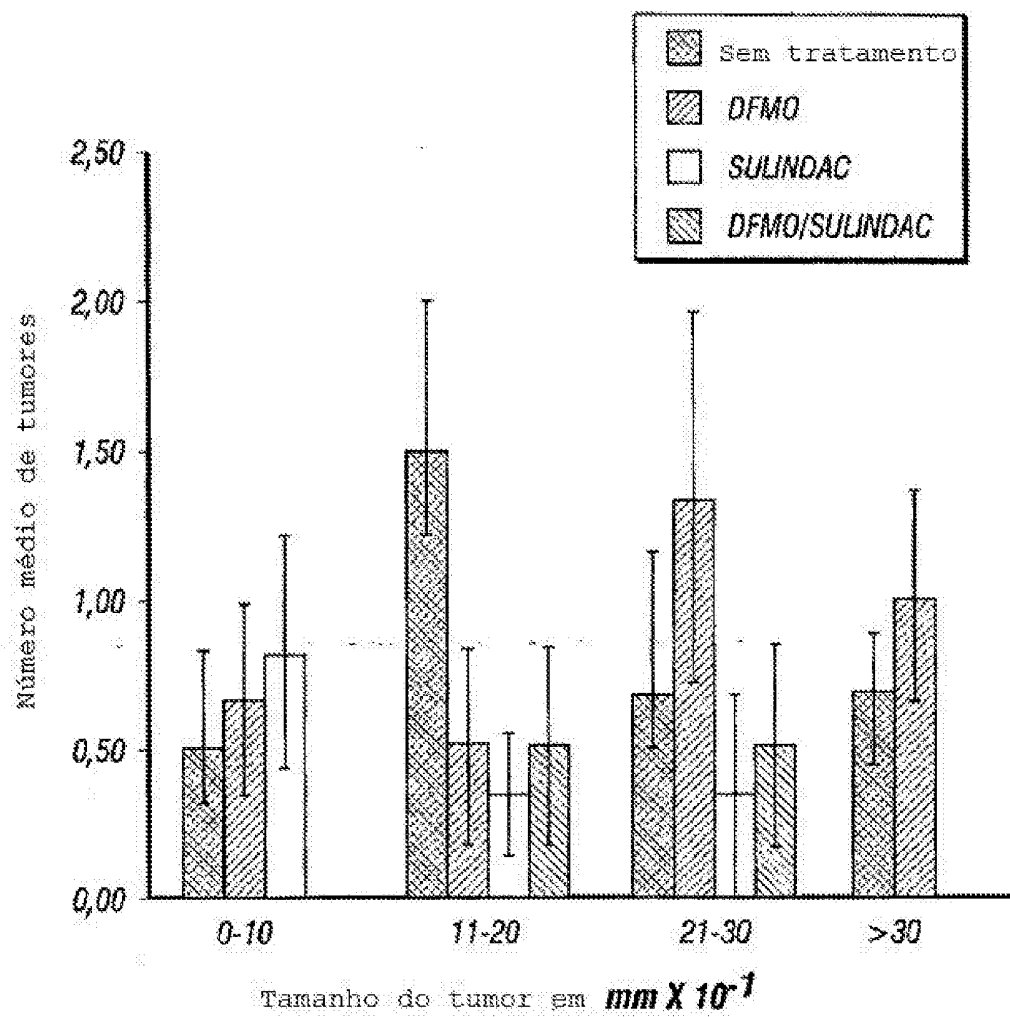


FIG. 9

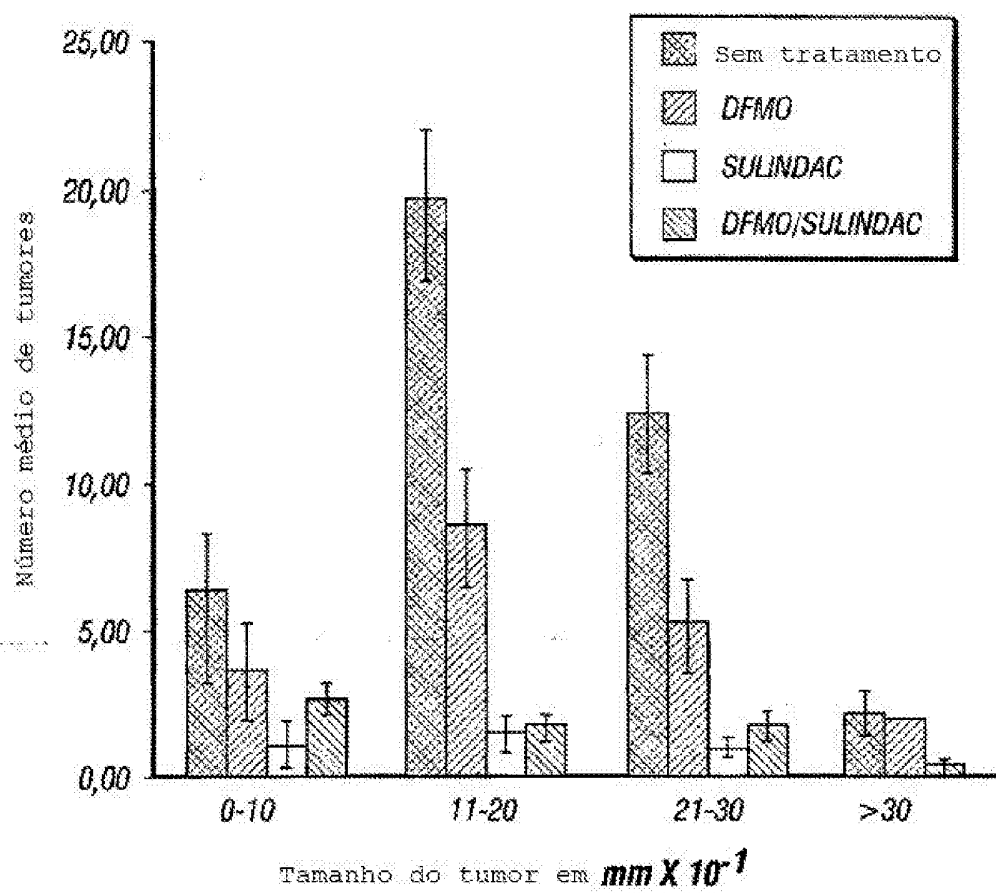


FIG. 10

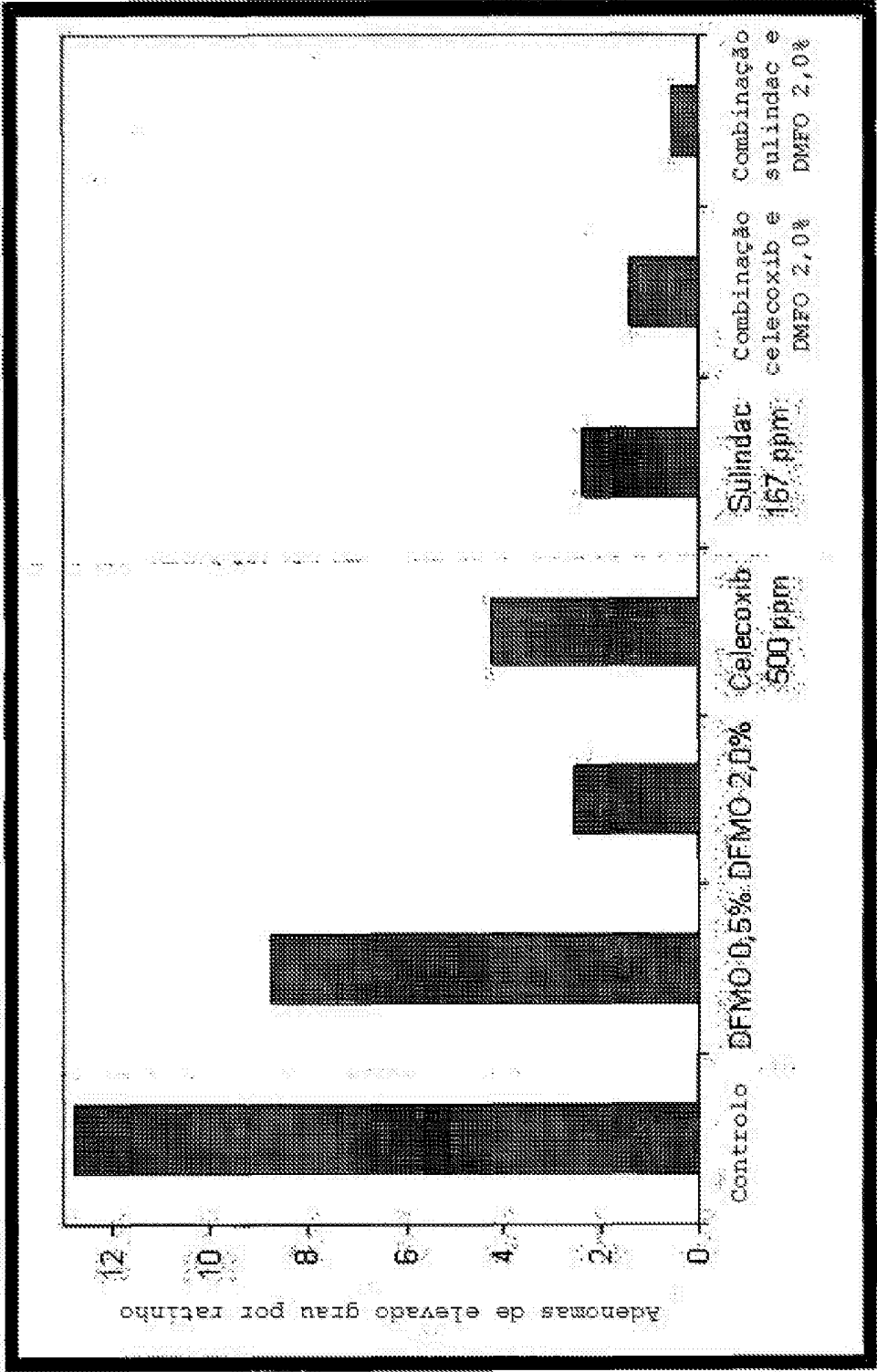


FIG. 11