



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2430452 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
G01N 33/574 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.11.24
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.06.25
(86)	Europeisk søknadsnr	10775626.4
(86)	Europeisk innleveringsdag	2010.05.14
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.03.21
(30)	Prioritet	2009.05.14, US, 216216 P 2009.06.03, US, 217679 P 2009.06.03, US, 217682 P
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	Arizona Board of Regents on Behalf of University of Arizona, 888 N. Euclid Avenue, Room 204, Tucson, AZ 85721, US-USA The Regents of the University of California, A California Corporation, 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, CA 94607, US-USA
(72)	Oppfinner	GERNER, Eugene, 1780 West Sunset Road, Tucson, AZ 85704-1718, US-USA ZELL, Jason, c/o Division of Hematology/Oncology University of California Irvine Medical Center101 The City Drive South, Orange, CA 92868, US-USA MCLAREN, Christine, c/o Epidemiology DepartmentUniversity of California, Irvine224 Irvine Hall, Irvine, CA 92697-7550, US-USA MEYSKENS, Frank, 30 Morning Breeze, Irvine, CA 92603, US-USA ANTON-CULVER, Hoda, c/o Dept. of Epidemiology Research Institute, School of MedicineUniversity of California, Irvine223 Irvine Hall, Irvine, CA 92697, US-USA THOMPSON, Patricia, A., c/o 2122 E. Adams, Tucson, AZ 85719, US-USA
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54) **Benevnelse** **Karsinomdiagnose og -behandlinger basert på ODC1-genotypen**

(56) **Anførte
publikasjoner**

US-A1- 2005 032 726

U. K. BASUROY: "Emerging Concepts in Targeting the Polyamine Metabolic Pathway in Epithelial Cancer Chemoprevention and Chemotherapy", JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 139, no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 27-33, XP55032902, ISSN: 0021-924X, DOI: 10.1093/jb/mvj022

R. A. HUBNER ET AL: "Ornithine Decarboxylase G316A Genotype Is Prognostic for Colorectal Adenoma Recurrence and Predicts Efficacy of Aspirin Chemoprevention", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 14, no. 8, 27 March 2008 (2008-03-27) , pages 2303-2309, XP55032903, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4599

E. W. GERNER ET AL: "Combination Chemoprevention for Colon Cancer Targeting Polyamine Synthesis and Inflammation", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 15, no. 3, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 758-761, XP55032904, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2235

J. A. ZELL ET AL: "Risk of Cardiovascular Events in a Randomized Placebo-Controlled, Double-

Blind Trial of Difluoromethylornithine plus Sulindac for the Prevention of Sporadic Colorectal Adenomas", CANCER PREVENTION RESEARCH, vol. 2, no. 3, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 209-212, XP55032906, ISSN: 1940-6207, DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0203

J. A. ZELL ET AL: "Associations of a Polymorphism in the Ornithine Decarboxylase Gene with Colorectal Cancer Survival", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 15, no. 19, 29 September 2009 (2009-09-29), pages 6208-6216, XP55032907, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0592

J. A. ZELL ET AL: "Ornithine Decarboxylase-1 Polymorphism, Chemoprevention With Eflornithine and Sulindac, and Outcomes Among Colorectal Adenoma Patients", JNCI JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, vol. 102, no. 19, 26 August 2010 (2010-08-26), pages 1513-1516, XP55032909, ISSN: 0027-8874, DOI: 10.1093/jnci/djq325

BASUROY ET AL.: 'Emerging Concepts in Targeting the Polyamine Metabolic Pathway in Epithelial Cancer Chemoprevention and Chemotherapy' J. BIOCHEM vol. 139, 31 October 2005, pages 27 - 33, XP055032902

KARSINOMDIAGNOSE OG -BEHANDLINGER BASERT PÅ ODC1-GENOTYPEN

I. Oppfinnelsens område

5

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører generelt det cancerbiologiske og medisinske feltet. Den vedrører nærmere bestemt fremgangsmåter for diagnose, forebygging og behandling av karsinomer og risikofaktorer for det.

II. Beskrivelse av beslektet teknikk

10

Et stort hinder for omsetting av forskning på cancerkjemoforebygging til klinisk praksis er marginal middeleffekt og en toksisitet som er større enn fordelene (Psaty and Potter, 2006; Lippman, 2006). Den påviste markerte effekten av polyamininhiberende kombinasjon av langvarig daglig oralt *D,L-a*-difluormetylnoritin (DFMO, eflornitin) og sulindak blant pasienter med kolorektalt adenom (CRA) ble for eksempel nylig påvist (Meyskens *et al.*, 2008), men behandling var assosiert med beskleden, subklinisk ototoksitet (McLaren *et al.*, 2008) og et større antall av kardiovaskulære hendelser blant pasienter med høy kardiovaskulær baselinerisiko (Zell *et al.*, 2009). Å identifisere genetiske trekk som identifiserer en pasients egnethet for et gitt forebyggende eller kurerende behandlingsregime, ville være en stor fordel.

20

Det er for eksempel fremdeles et behov for virkningsfulle og mindre toksiske fremgangsmåter for å behandle og forebygge kolorektale cancere og andre karsinomer. Ifølge National Cancer Institute var det ca. 147 000 nye tilfeller og 50 000 dødsfall på grunn av kolorektal cancer i USA i 2009. Nåværende behandlingsprotokoller, spesielt for tykktarmcancer og polypper, inkluderer tumorreseksjon, kjemoterapi og strålingsterapi. En enkelt nukleotidpolymorfisme (SNP) i intron-1 av det humane *ODC1*-genet påvirker *ODC1*-transkripsjon (Guo *et al.*, 2000) og er undersøkt som en genetisk markør for risiko for kolorektalt adenom (CRA) (Martinez *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2006; Hubner *et al.*, 2008). Den rapporterte frekvensen av lite A-allel er ca. 25 %, og tross forskjeller mellom rase/etnisitet er *ODC1*-genotypefordeling i Hardy-Weinberg-likevekt innenfor hver rase (O'Brien *et al.*, 2004; Zell *et al.*, 2009). Individuer som er homozygote for det lille A-allelet av *ODC1*, har redusert risiko for

35

adenomrekurrens sammenlignet med dem som har det store G-allelet (Martinez *et al.*, 2003; Hubner *et al.*, 2008). *ODC1*-A-allel (AA- eller GA-genotype, men ikke GG-genotype) og rapportert aspirinanvendelse er videre assosiert med redusert tykktarmpolypprekurrens (Martinez *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2006; Hubner *et al.*, 2008) og en statistisk signifikant 50 % redusert risiko for fremskredne adenomer (Barry *et al.*, 2006). Hvorvidt *ODC1*-genotypen differensielt påvirker adenomrekurrens, vevspolyaminresponser, toksisitetsprofiler og hvordan den kan anvendes for å bestemme egnetheten av forebyggende og kurerende behandlinger, ville være en stor fordel. Gerner and Meyskens (Clin. Cancer Res., 2009, 15(3) 758–761) beskriver en kombinasjon av DFMO og et NSAID for å forebygge tykktarmcancer.

KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende patentsøknaden beskriver således anvendelser for behandling, forebygging og/eller diagnose knyttet til å identifisere pasienters genotype ved posisjon +316 for minst ett *ODC1*-promotergenallel.

I et første aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en sammensetning omfattende α -difluormetylnitrit (DFMO) og et ikke-aspirinholdig ikke-steroid antiinflammatorisk legemiddel (NSAID) for anvendelse i den forebyggende eller kurerende behandlingen av kolorektalt karsinom eller risikofaktorer for det hos en pasient, hvori pasientens genotype ved posisjon +316 for minst ett *ODC1*-promotergenallel er G; og hvori behandling av risikofaktorer for kolorektalt karsinom hos pasienten forhindrer dannelse av nye aberrante kryptfokus, nye adenomatøse polyper eller nye adenomer med dysplasi hos pasienten; eventuelt hvori pasienten er et menneske.

I et andre aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en sammensetning omfattende α -difluormetylnitrit (DFMO) for anvendelse i den forebyggende eller kurerende behandlingen av kolorektalt karsinom eller risikofaktorer for det ifølge det første aspektet hos en pasient ifølge det første aspektet; hvori pasienten også administreres en sammensetning omfattende et ikke-aspirinholdig ikke-steroid antiinflammatorisk legemiddel (NSAID), idet pasienten administreres sammensetningen omfattende det ikke-aspirinholdige NSAID-et før, samtidig eller etter administrering av sammensetningen omfattende DFMO.

I et tredje aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en sammensetning omfattende et ikke-aspirinholdig ikke-steroid antiinflammatorisk legemiddel (NSAID) for anvendelse i den forebyggende eller kurerende behandlingen av kolorektalt karsinom, eller risikofaktorer for det ifølge det første aspektet hos en pasient ifølge det første aspektet; hvori pasienten også administreres en sammensetning omfattende α -difluormetylnoritin (DFMO), idet pasienten administreres sammensetningen omfattende DFMO før, samtidig eller etter administrering av sammensetningen omfattende det ikke-aspirinholdige NSAID-et.

I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen øker det ikke-aspirinholdige NSAID-et ekspresjonen av spermidin/spermin N^1 -acetyltransferase hos pasienten.

I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen kan pasientens genotype ved posisjon +316 for minst et *ODC1*-promotergenallel ha blitt bestemt ved å motta en rapport inneholdende genotypen eller ved å skrive ned en pasienthistorikk som viser resultatene. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen bestemmes pasientens genotype ved nukleotidbasen ved posisjon +316 for ett allel av pasientens *ODC1*-promotergen. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen bestemmes pasientens genotype ved posisjon +316 for begge alleler av *ODC1*-promotergen. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er pasientens genotype ved posisjon +316 for begge alleler av *ODC1*-promotergen GG. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er pasientens genotype ved posisjon +316 for begge alleler av *ODC1*-promotergen GA.

I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen omfatter de definerte anvendelsene ytterligere å øke doseringen av DFMO eller det ikke-aspirinholdige NSAID-et hvis pasienten allerede ble behandlet med den farmasøytiske terapien, men ved en lavere dosering, før oppnåelse av testresultatene. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen omfatter de definerte anvendelsene ytterligere å øke doseringen av DFMO og det ikke-aspirinholdige NSAID-et hvis

pasienten allerede ble behandlet med den farmasøytiske terapien, men ved en lavere dosering, før oppnåelse av testresultatene.

5 I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er det ikke-aspirinholdige NSAID-et en selektiv COX-2-inhibitor. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er det ikke-aspirinholdige NSAID-et sulindak eller celekoksib. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er det ikke-aspirinholdige NSAID-et sulindak.

10

I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen forhindrer den definerte anvendelsen dannelse av nye aberrante kryptfokus hos pasienten. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen forhindrer den definerte anvendelsen dannelse av nye adenomatøse polypper hos pasienten. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen forhindrer den definerte anvendelsen dannelse av nye adenomer med dysplasi hos pasienten.

15

I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen administreres DFMO og sulindak systemisk. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen administreres DFMO og sulindak ved distinktive veier. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen administreres DFMO eller det ikke-aspirinholdige NSAID-et oralt, intraarterielt eller intravenøst. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen administreres DFMO oralt. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er den virkningsfulle mengden av DFMO 500 mg/dag. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen administreres DFMO intravenøst. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er den virkningsfulle mengden av DFMO fra ca. 0,05 til ca. 5,0 g/m²/dag. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen formuleres DFMO og det ikke-aspirinholdige NSAID-et for oral administrering. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen formuleres DFMO og det ikke-aspirinholdige NSAID-et som en hard eller myk kapsel eller en tablett. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen administreres DFMO og det ikke-

20

25

30

35

- aspirinholdige NSAID-et hver 12. time. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen administreres DFMO og det ikke-aspirinholdige NSAID-et hver 24. time. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er den virkningsfulle mengden av sulindak fra ca. 10 til 1500 mg/dag. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er den virkningsfulle mengden av sulindak fra ca. 10 til 400 mg/dag. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er den virkningsfulle mengden av sulindak 150 mg/dag. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen administreres DFMO før sulindak. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen administreres DFMO etter sulindak. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen administreres DFMO før og etter sulindak. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen administreres DFMO samtidig med sulindak. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen administreres DFMO minst en andre gang. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen administreres sulindak minst en andre gang.
- I varianter av hvilke som helst av de ovenstående utførelsesformene av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen har pasienten en fast tumor, og den faste tumoren resekteres, og DFMO og sulindak administreres eventuelt før, eller etter, reseksjonen.
- I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er den kolorektale canceren stadie I. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er den kolorektale canceren stadie II. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er den kolorektale canceren stadie III. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er den kolorektale canceren stadie IV.
- I varianter av hvilke som helst av de ovenstående utførelsesformene av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen forhindrer den definerte anvendelsen dannelse av nye fremskredne kolorektale neoplasmer i pasienten. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved

oppfinnelsen forhindrer den definerte anvendelsen ototoksisitet eller risikoen for det hos pasienten. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen forhindrer den definerte anvendelsen dannelse av nye høyresidige fremskredne kolorektale neoplasmer. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen forhindrer den definerte anvendelsen dannelse av nye venstresidige fremskredne kolorektale neoplasmer.

I varianter av hvilke som helst av de ovenstående utførelsesformene av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er pasienten identifisert å ha én eller flere adenomatøse polypper i tykktarm, rektum eller blindtarm. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er pasienten identifisert å ha én eller flere fremskredne kolorektale neoplasmer. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er pasienten identifisert å ha én eller flere venstresidige fremskredne kolorektale neoplasmer. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er pasienten identifisert å ha én eller flere høyresidige fremskredne kolorektale neoplasmer. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er pasienten diagnostisert med familiær adenomatøs polypose. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er pasienten diagnostisert med Lynch syndrom. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen er pasienten diagnostisert med familiær kolorektal cancer type X. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen oppfyller pasienten Amsterdam-kriteriene eller Amsterdam-kriteriene II. I noen utførelsesformer av det første, andre og/eller tredje aspektet ved oppfinnelsen har pasienten tidligere reseksjon av ett eller flere kolorektale adenomer.

I varianter av noen av de ovenstående utførelsesformene er pasienten et menneske.

Anvendelsen av betegnelsene "en" eller "et", når de anvendes i kombinasjon med betegnelsen "omfattende" i kravene og/eller beskrivelsen, kan bety "én", men er også forenlig med betydningen av "én eller flere", "minst én" og "én eller flere enn én".

Gjennom hele denne patentsøknaden anvendes betegnelsen "ca." for å indikere at en verdi inkluderer den iboende variasjonen av feil for innretningen, idet fremgangsmåten benyttes for å bestemme verdien, eller variasjonen, som finnes blant studieindividene.

5

Betegnelsene "omfatte", "ha" og "inkludere" er åpne kopulaverb. Hvilke som helst former eller tider av ett eller flere av disse verbene, slik som "omfatter", "omfattende", "har", "inkluderer" og "inkludert" er også åpne. Hvilken som helst fremgangsmåte som "omfatter", "har" eller "inkluderer" ett eller flere trinn, er for eksempel ikke begrenset til å ha bare det ene eller flere trinnene og dekker også andre ikke anførte trinn.

10

Betegnelsen "virkningsfull", slik betegnelsen anvendes i beskrivelsen og/eller kravene, betyr tilstrekkelig til å oppnå et ønsket, forventet eller tiltenkt resultat.

15

Betegnelsen "IC₅₀" som anvendt heri betyr en inhiberende dose som er 50 % av den maksimale oppnådde responsen.

Betegnelsen "pasient" eller "individ" som anvendt heri betyr en levende mammalsk organisme, slik som menneske, ape, ku, sau, geit, hund, katt, mus, rotte, marsvin eller transgen art derav. I visse utførelsesformer er pasienten eller individet et primat. Ikke-begrensede eksempler på mennesker er voksne, ungdommer, spedbarn og foster.

20

"Farmasøytisk akseptabel" betyr det som er nyttig i fremstillingen av en farmasøytisk sammensetning som generelt er sikker, ikke-toksisk og verken biologisk eller på annen måte uønsket, og inkluderer det som er akseptabelt for veterinær anvendelse samt human farmasøytisk anvendelse.

25

"Forebygging" eller "forebygge" inkluderer: (1) inhibere debuten av en sykdom hos et individ eller en pasient som kan ha risiko og/eller være predisponert for sykdommen, men som ennå ikke opplever eller viser noen som helst eller alle sykdommens patologier eller symptomatologier, og/eller (2) bremse debuten av en sykdoms patologi eller symptomatologi hos et individ eller en pasient som kan ha risiko og/eller være predisponert for sykdommen, men som ennå ikke opplever eller viser noen som helst eller alle sykdommens patologier eller symptomatologier.

30

35

"Virkningsfull mengde", "terapeutisk virkningsfull mengde" eller "farmasøytisk virkningsfull mengde" betyr den mengden som, når den administreres til et individ eller en pasient for å behandle en sykdom, er tilstrekkelig til å påvirke slik behandling for sykdommen.

"Behandling" eller "behandle" inkluderer å (1) inhibere en sykdom hos et individ eller en pasient som opplever eller viser sykdommens patologi eller symptomatologi (f.eks. stanse videre utvikling av patologien og/eller symptomatologien), (2) forbedre en sykdom hos et individ eller en pasient som opplever eller viser sykdommens patologi eller symptomatologi (f.eks. reversere patologien og/eller symptomatologien) og/eller (3) påvirke eventuell målbar reduksjon i en sykdom hos et individ eller en pasient som opplever eller viser sykdommens patologi eller symptomatologi.

De ovenstående definisjonene gjelder før hvilken som helst motstridende definisjon i hvilken som helst av referansene anført heri. At visse betegnelser er definert, bør imidlertid ikke anses som indikativt for at en eventuell betegnelse som er udefinert, er ubestemt. Alle anvendte betegnelser antas i stedet å beskrive oppfinnelsen med slike betegnelser at fagmannen kan forstå omfanget og utøve den foreliggende oppfinnelsen.

Andre formål, trekk og fordeler med den foreliggende beskrivelsen vil fremgå av den følgende detaljerte beskrivelsen. Det skal imidlertid forstås at den detaljerte beskrivelsen og de spesifikke eksemplene som viser spesifikke utførelsesformer av oppfinnelsen, bare gis som illustrasjon, idet ulike endringer og modifikasjoner vil fremgå klart for fagmannen ut fra denne detaljerte beskrivelsen.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Følgende tegninger utgjør del av den foreliggende beskrivelsen og er inkludert for ytterligere å vise visse aspekter ved den foreliggende beskrivelsen. Oppfinnelsen kan bedre forstås under henvisning til én av disse tegningene i kombinasjon med den detaljerte beskrivelsen av spesifikke utførelsesformer presentert heri.

FIG. 1 - Differensielle effekter av polyaminregulering ved *MAD1* og *c-MYC*. Skjema som viser de foreslåtte differensielle effektene av

polyaminregulering ved *MAD1* og *c-MYC* på det lille A-allelet av *ODC1* +316. Effekter av ODC-inhibitoren DFMO (difluormetylnitrit) vises også.

FIG. 2 - Kolorektalcancerspesifikke overlevelsesrateanslag. Denne figuren viser Kaplan-Meier-kolorektalcancerspesifikke overlevelsesrateanslag for tilfeller med kolorektal cancer stadie III, stratifisert ved *ODC1* +316-genotype. Inkludert er tilfeller fra University of California Irvine Gene-Environment Study of Familial Colorectal Cancer diagnostisert i perioden 1994–1996 med oppfølging til og med mars 2008: *ODC1*-GG (64 tilfeller, 15 kolorektalcancerspesifikke dødsfall), *ODC1*-GA/AA (62 tilfeller, 25 kolorektalcancerspesifikke dødsfall).

FIG. 3A og B - Sted og analyse for *ODC1*-promoter-SNP. FIG. A viser A, stedet for *ODC1*-promoter-SNP. Den SNP som undersøkes i denne studien, er 316 nukleotider 3' av *ODC1*-transkripsjonsstartstedet (*). Denne SNP ligger mellom to konsensus E-bokser som vist av de understrekede sekvensene, og påvirker et PstI-restriksjonssted (boks) (SEQ ID NO:5). FIG. 3B viser en restriksjonsfragmentlengde-polymorfismeanalyse av *ODC1*-SNP. DNA-et ble oppnådd fra to celletyper, og regionen som omgir *ODC1*-SNP-stedet, ble sekvensert. Tykktarmavlede HT29-celler ble funnet å være heterozygot GA, mens HCT116-celler ble funnet å være homozygot GG ved *ODC1*-SNP-locus. Et 350-bp PCR-produkt av denne regionen ble oppnådd fra hver celletype og utsatt for fordøyelse med PstI. Tegn på et A-allel ble indikert ved restriksjonsprodukter < 350 bp.

FIG. 4A og B - Analyse av E-boks-ekspresjon og -immunutfelling. Sted for *ODC1*-promoter-SNP. FIG. 4A viser E-boks-proteinsekspresjon i tykktarmavlede celler. Ekspresjon av proteiner som skal evalueres for binding til +316-*ODC1*-SNP, ble vurdert ved Western Blotting-analyse. Ekstrakter av både HT29- og HCT116-celler ble evaluert for *c-MYC*, *MAD1* og *MAD4*; β -aktin ble anvendt som lastekontroll. FIG. 4B viser dokumentasjon for den allelspesifikke transkripsjonsfaktorbindingen ved kromatinimmunutfellingsanalyse, hvilket ble utført som beskrevet i eksempeldelen nedenfor. HT29-celler ble en kilde til *ODC1*-A-alleler, idet disse cellene er heterozygot GA ved dette stedet. HCT116-celler ble anvendt som en kilde til *ODC1*-G-alleler.

FIG. 5A og B - Effekter av *c-MYC*- og *MAD1*-ekspresjon på *ODC1*-aktivitet. FIG. 5A viser effekten av *c-MYC*-ekspresjon på *ODC1*-allelspesifikk promoteraktivitet i tykktarmavlede HT29-celler. Promoteraktivitet ble målt etter transfeksjon med *ODC1*-promoterreporterplasmider kotransfektet med

pcDNA 3.0-plasmid eller CMV-MYC-ekspresjonsvektor. Promoterkonstruksjoner skiller seg ved nærvær av det første E-boks-elementet, lokalisert i -485 til -480 bp ("vt E-boks 1" for villtypesekvensen eller "mut E-boks 1" for en mutantsekvens). Konstruksjonene er forskjellige også ved *ODC1* +316 SNP (" +316 G" eller " +316 A"). *, $P \leq 0,013$ for hver av de fire sammenligningene i forhold til promoteraktivitet med pcDNA 3.0-kotransfeksjon. FIG. 5B viser effekten av *MAD1*-ekspresjon på *ODC1*-allelspesifikk promoteraktivitet i tykktarmtumoravledede HT29-celler. Promoteraktivitet ble målt etter transfeksjon med *ODC1*-promoterreporterplasmider kotransfektet med pcDNA 3.1-plasmid eller med et pcDNA-*MAD1*-plasmid. Anvendte promoterkonstruksjoner ble beskrevet i forklaringen for panel A i denne figuren. *, $P = 0,027$, statistisk signifikans i forhold til promoteraktivitet med pcDNA 3.1-kotransfeksjon.

FIG. 6 - Reduksjon i adenomatøse polypper. Denne figuren viser prosentvis rekurrens av adenomatøse polypper hos pasienter som ble behandlet med DFMO og sulindak sammenlignet med placebo. Det var en 70 % reduksjon i totalt adenom, en 92 % reduksjon i fremskredent adenom og 95 % reduksjon i multipelt adenom.

FIG. 7 - Farmakogenomisk nytte/risiko-analyse basert på +316 *ODC1*-genotype. Denne figuren sammenligner reduksjon i % rekurrens av adenomer etter 3 år sammenlignet med placebo, med % ototoksisitet, for behandlings- og placebogrupeer som en funksjon av pasientens +316-*ODC1*-genotype. Ototoksisitet ble bestemt ved anvendelse av audiometrisk testing.

FIG. 8A-C - Farmakogenomisk nytte/risiko-analyse basert på +316 *ODC1*-genotype. Denne figuren sammenligner fordel, reduksjon i % rekurrens av adenomer etter 3 år, med risiko, % ototoksisitet, for behandlings- og placebogrupeer som en funksjon av pasientens +316-*ODC1*-genotype. Ototoksisitet ble bestemt ved anvendelse av audiometrisk testing.

FIG. 9 - Gjennomsnittlig antall tumorer etter størrelse i tykktarm hos *Min/+*-mus. Denne figuren viser det gjennomsnittlige antallet tumorer etter størrelse i tykktarmen hos tre behandlingsgrupper sammenlignet med ubehandlede kontroller. Mus, kjøpt fra The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Me.), ble avlet ved å krysse C57BL/6J- *Apc*^{Min/+}-hanner og C57/BL6-hunner. Heterozygot Min-mus (*Apc*^{Min} / *Apc*⁺): (heterozygot for en nonsens-mutasjon ved kodon 850 av *Apc*) ble identifisert ved genotyping ved delaktasjon ved et allelspesifikt PCR-assay ved anvendelse av DNA fra halespiss. Homozygot (*Apc*⁺

/Apc⁺) kullmedlemmer fungerte som kontroller. Én behandling besto av supplerings av drikkevann med 2 % DFMO (Merrell Dow Research Inst.) på den 8. studiedagen. I den andre behandlingen ble 167 ppm sulindak (Harlen Teklad) tilsatt i kostholdet hos AIN-93G-mus på studiens 21. dag. Den tredje
 5 behandlingen var en kombinasjon av DFMO og sulindak. Etter 114 dager ble musene avlivet gjennom CO₂-kvelning. Tynntarms- og tykktarmsegmentene ble fjernet fra mus og dissekert i lengderetningen, montert og fiksert i 70 % etanol og plassert ved 4 °C for tumorscoreing. Representative vev ble også tatt for histopatologisk evaluering.

10 **FIG. 10 - Gjennomsnittlig antall tumorer etter størrelse i tynntarmen hos *Min/+*-mus.** Denne figuren viser det gjennomsnittlige antallet tumorer etter størrelse i tynntarmen hos tre behandlingsgrupper sammenlignet med ubehandlede kontroller. Forsøksdetaljer er beskrevet i FIG. 9 beskrivelse ovenfor.

15 **FIG. 11 - Antall høygradige adenomer som en funksjon av terapi hos *Min/+*-mus.** Denne figuren viser hvordan antallet av høygradige adenomer er forskjellig avhengig av terapitype. Forsøksdetaljer er beskrevet i FIG. 9 beskrivelse ovenfor.

20 **BESKRIVELSE AV ILLUSTRATIVE UTFØRELSESFORMER**

Den foreliggende patentsøknaden beskriver fremgangsmåter og anvendelser som omfatter å predikere egnetheten, effekten, toksisiteten og/eller doseringen av anti-karsinom-kombinasjonsbehandlinger omfattende α-difluormetylnitritin
 25 (DFMO) og et ikke-aspirinholdig ikke-steroid antiinflammatorisk legemiddel (NSAID) som virker som en agonist for spermidin/spermin N¹-acetyltransferaseekspressjon, basert minst delvis på pasientens ODC1-promotergenotype. Oppfinnelsen er begrenset til å forebygge eller behandle kolorektalt karsinom eller risikofaktorer for det hos pasienter som har genotypen spesifisert i krav 1.

Den foreliggende oppfinnelsen involverer administrering av de ovennevnte terapeutiske forbindelsene til individer som viser precancerøse symptomer for å forebygge forekomst av kolorektalt karsinom og/eller for å forebygge forekomst
 35 av risikofaktorer for det, slik som dannelse av nye aberrante kryptfokus, dannelse av nye adenomatøse polypper eller nye adenomer med dysplasi. Celler

av denne kategorien inkluderer polypper og andre precancerøse lesjoner, pre-ondartetheter, preneoplastisk eller annen aberrant fenotype som indikerer sannsynlig progresjon til en cancerøs tilstand, basert minst delvis på pasientens *ODC1*-promotergenotype.

5 **I. Metabolisme av polyaminer**

Dannelse av overflødig polyamin har lenge vært implisert i epitelial karsinogenese, særlig kolorektal karsinogenese. Polyaminer er små allstedsnærværende molekyler involvert i forskjellige prosesser, inkludert transkripsjon, RNA-stabilisering, ionekanal gating med mer (Wallace, 2000). Ornitindekarboksylase (ODC), det første enzymet i polyaminsyntese, er vesentlig for normal utvikling og vevsreparasjon hos pattedyr, men er nedregulert i mesteparten av voksne vev (Gerner and Meyskens, 2004). Flere abnormiteter i kontrollen av polyaminmetabolisme og -transport resulterer i økte polyaminnivåer som kan fremme tumorigenese i flere vev (Thomas and Thomas, 2003).

Polyaminmetabolisme oppreguleres i intestinalt epitelvev hos mennesker med familiær adenomatøs polypose (FAP) (Giardiello *et al.*, 1997), et syndrom assosiert med høy risiko for tykktarmcancer og andre cancere.

FAP kan være forårsaket av mutasjoner i tumorsuppressorgenet for adenomatøs polyposis coli (*APC*), og *APC*-signalering er vist å regulere *ODC*-ekspresjon i både humane celler (Fultz and Gerner, 2002) og i en musemodell for FAP (Erdman *et al.*, 1999).

Ekspresjon av villtype *APC* fører til redusert ekspresjon av *ODC*, mens mutant *APC* fører til økt ekspresjon av *ODC*. Mekanismen for *APC*-avhengig regulering av *ODC* involverer E-boks-transkripsjonsfaktorer, inkludert den transkripsjonale aktivatoren *c-MYC* og den transkripsjonale repressoren *MAD1* (Fultz og Gerner, 2002; Martinez *et al.*, 2003). *c-MYC*, ble av andre vist å regulere *ODC*-transkripsjon (Bellofernandez *et al.*, 1993). Flere gener involvert i polyaminmetabolisme er vesentlige gener for optimal vekst i de fleste organismer og er nedregulert i ikke-prolifererende og/eller voksne celler og vev (Gerner and Meyskens, 2004). Polyaminene påvirker spesifikke cellulære

fenotyper delvis ved å påvirke genekspresjonsmønster, slik det er gjennomgått annetsteds (Childs *et al.*, 2003).

Som beskrevet nedenfor har en strategi som involverer inhibering av ODC-aktivitet (dvs. ratebegrensende enzym av polyaminsyntese) og/eller reduksjon av cellulære polyaminnivåer vist imponerende effekt i forebyggingen av rekurrens av kolorektale polypper hos mennesker. Epidemiologiske og eksperimentelle resultater fra den foreliggende forskningen viser betinget regulering av polyaminhomeostase ved genetisk polymorfisme i ODC, og antyder en modell i hvilken +316-ODC-SNP kan være beskyttende for tykktarmadenomrekurrens og skadelig for overlevelse etter tykktarmcancerdiagnose. Denne informasjonen kan anvendes for å bestemme tykktarmcancerprognose. Ved å identifisere pasienter med økt risiko for cancerprogresjon/-rekurrens kan tidlig implementasjon av tertiære forebyggingshåndteringsstrategier benyttes. Denne forskningen kan i tillegg anvendes for å identifisere pasienter med høy risiko for locoregional kolorektal cancer, men for øvrig optimalt behandlet, som ville dra fordel av tertiære cancerforebyggingsterapier.

Avhengig av en pasients kosthold kan problemet med overflødig polyamin forsterkes ved at polyaminer, f.eks. putrescin, er til stede i mange vanlige matvarer, slik som appelsinjuice, hvilket inneholder ca. 400 ppm putrescin. I denne forbindelse er et kosthold med mye polyamin kontraindikatorisk, og for noen av utførelsesformene tilveiebrakt heri skal et slikt kosthold unngås. Se provisorisk US-patentsøknad av Kavitha P. Raj, Jason A. Zell, Christine E. McLaren, Eugene W. Gerner, Frank L. Meyskens og Jeffrey Jacob, kalt "Cancer Prevention and Treatment Methods Based on Dietary Polyamine Content", inngitt 14.mai 2010.

II. Familiær adenomatøs polypose

Familiær adenomatøs polypose (FAP), et arvet polyposesyndrom, er resultatet av kjønnscelemutasjon av tumorsuppressorgenet for adenomatøs polyposis coli (APC) (Su *et al.*, 1992). Denne autosomale dominerende tilstanden med variabel ekspresjon er assosiert med utviklingen av hundrevis av tykktarmadenomer, som jevnt utvikler seg til adenokarsinom ved førtiårsalderen, to tiår tidligere enn gjennomsnittlig diagnosealder for sporadisk tykktarmcancer (Bussey, 1990). I

tidligere studier av presymptomatiske individer med FAP detekteres økte nivåer av polyaminene spermidin og spermin, og deres diaminforløper putrescin, i kolorektale biopsier med normalt utseende sammenlignet med normale familiemedlemskontroller (Giardiello *et al.*, 1997). Aktiviteten av ornitindekarboksylase (ODC), det første og ratebegrensende enzymet i mammalsk polyaminsyntese, er også forhøyet i tilsynelatende normale mukosale tykktarmbiopsier fra FAP-pasienter (Giardiello *et al.*, 1997; Luk and Baylin, 1984). Disse funnene er av interesse idet polyaminene er nødvendige for optimal celleproliferasjon (Pegg, 1986). Suppresjon av ODC-aktivitet, ved anvendelse av den enzymaktiverte irreversible inhibitoren DFMO, inhiberer videre tykktarmkarsinogenese hos karsinogenbehandlede gnagere (Kingsnorth *et al.*, 1983; Tempero *et al.*, 1989).

Som drøftet nærmere nedenfor, fungerer musene med Min (multippel intestinal neoplasi), hvilke deler en mutert *APC/apc*-genotype med FAP, som en nyttig forsøksdyremodell for humane FAP-pasienter (Lipkin, 1997). Min-musene kan utvikle mer enn 100 gastrointestinale adenomer/adenokarsinomer gjennom hele mage-tarm-kanalen i løpet av 120 levedager, hvilket fører til GI-blødning, obstruksjon og dødsfall. En kombinasjonsterapi med DFMO og sulindak ble vist å være virkningsfull i reduksjonen av adenomer hos disse musene (US-patentnr. 6,258,845; Gerner and Meyskens, 2004). Resultatene av å behandle Min-mus med enten DFMO alene, sulindak alene eller en kombinasjon av DFMO og sulindak på tumordannelse i enten tykktarm eller tynntarm er vist i FIG. 9–11.

III. Ornitindekarboksylase-1-polymorfisme

Aktivitet av ornitindekarboksylase (ODC), det første enzymet i polyaminsyntese, kreves for normal vekst, og er forhøyet ved mange cancere, inkludert kolorektal cancer. Assosiasjoner mellom +316-ODC-enkeltnukleotidpolymorfisme (SNP) og kolorektal cancer (CRC)-spesifikk overlevelse blant CRC-tilfeller ble undersøkt heri, og dens funksjonelle signifikans i tykktarmcancer celler ble undersøkt.

En enkelt nukleotidpolymorfisme (SNP) i intron-1 av det humane *ODC1*-genet påvirker *ODC1*-transkripsjon (Guo *et al.*, 2000) og er undersøkt som en genetisk markør for risiko for kolorektalt adenom (CRA) (Martinez *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2006; Hubner *et al.*, 2008). Den rapporterte frekvensen av lite A-allel er ca. 25 %, og tross forskjeller mellom rase/etnisitet er *ODC1*-genotypefordeling i

Hardy-Weinberg-likevekt innenfor hver rase (O'Brien *et al.*, 2004; Zell *et al.*, 2009). Individer som er homozygote for det lille A-allelet av *ODC1*, har redusert risiko for adenomrekurrens sammenlignet med dem med det store G-allelet (Martinez *et al.*, 2003; Hubner *et al.*, 2008). *ODC1*-A-allel (AA- eller GA-genotype, men ikke GG-genotype) og rapportert aspirinanvendelse er videre assosiert med redusert tykktarmpolypprekurrens (Martinez *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2006; Hubner *et al.*, 2008) og en statistisk signifikant 50 % redusert risiko for fremskredne adenomer (Barry *et al.*, 2006).

Den *ODC*-allelspesifikke bindingen av E-boks-transkripsjonsfaktorer ble undersøkt, og den funksjonelle signifikansen av +316-*ODC*-SNP, lokalisert mellom to E-bokser, ble evaluert (E-boks 2 og 3 som illustrert i FIG. 2A). Hver cellelinjegenotype påvirker et konsensus PstI-restriksjonssted i denne regionen. FIG. 2B viser at et polymerasekjedereaksjon (PCR)-produkt fremstilt fra HT29-celler fra human tykktarm var delvis sensitivt overfor PstI-kutting, hvilket antyder at disse cellene inneholdt minst ett *ODC*-A-allel. Et PCR-produkt fremstilt fra HCT116-celler fra human tykktarm ved anvendelse av samme primere var insensitive overfor PstI-virkning, hvilket antyder at disse cellene inneholdt bare *ODC*-G-alleler. Dette resultatet ble bekreftet ved direkte DNA-sekvensering.

Ekspresjon av spesifikke E-boks-bindingsproteiner, inkludert den transkripsjonale aktivatoren *c-MYC* og flere transkripsjonale repressorer i HT29- og HCT116-celler (f.eks. *MAD1* og *MAD4*), ble etablert ved Western Blotting (FIG. 3A). Analyse ved kromatinimmunutfelling (CHIP) av regionen som omgir *ODC*-promoterens +316, ble utført ved anvendelse av antistoffer rettet mot disse proteinene. Som vist i FIG. 3B ble *ODC*-promoterspesifikke PCR-produkter syntetisert fra HT29-DNA oppnådd etter immunutfelling av kromatin med antistoffer rettet mot *c-MYC*, *MAD1* eller *MAD4*. PCR-produkter syntetisert fra HCT116-DNA etter lignende kromatinimmunutfelling ble i det vesentlige redusert sammenlignet med dem syntetisert fra HT29-DNA. Kvantifisering av disse resultatene indikerte at *c-MYC*, *MAD1* og *MAD4* som binder til *ODC*-SNP-regionen, var 4–14 ganger større i HT29-celler, hvilke inneholdt ett *ODC*-A-allel, sammenlignet med HCT116-celler, hvilke inneholdt bare *ODC*-G-alleler.

ODC-allelspesifikk promoteraktivitet ble vurdert. Den hypotese at +316-*ODC*-SNP påvirket *ODC*-ekspresjon på en måte som var avhengig av ekspresjonen av E-boks-aktivatorer og -repressorer, ble testet som følger. Kortvarig

kotransfeksjon av tykktarmcanceravledede HT29-celler ble oppnådd med ODC-allelspesifikke promoterkonstruksjoner i kombinasjon med vektorer som uttrykker enten den transkripsjonale aktivatoren *c-MYC* eller repressoren *MAD1* (FIG. 4A og B). De viste standardfeilstolpene reflekterer variabiliteten i triplikate målinger i et enkelt representativt forsøk, hvilket er replikert. De allelspesifikke promoterreporterne anvendt i disse forsøkene inkluderte alle de tre E-boksene vist i FIG. 2A. Som vist i FIG. 4A hadde *c-MYC*-ekspresjon den største stimulerende effekten på promotere inneholdende tre konsensus-E-bokser og ODC-A-allelet (vt E-boks 1 +316 A, $P = 0,0014$). Delesjon av den oppstrøms E-boksen reduserte promoteraktivitet, men *c-MYC*-ekspresjon fortsatte å stimulere denne aktiviteten (mut E-boks 1 +316 A, $P = 0,0013$). Substitusjon av en G for A ved +316-SNP-posisjonen reduserte *c-MYC*s evne til å stimulere promoteraktivitet også med en intakt 5'-flankerende konsensus E-boks. Mutasjon av den 5'-flankerende konsensus E-boksen i kombinasjon med ODC-G-allelet reduserte promoteraktiviteten ytterligere.

Når *MAD1* i stedet for *c-MYC* ble kotransfektet med de ODC-allelspesifikke promoterreporterene (FIG. 4B), kunne repressoren bare redusere aktiviteten av ODC-promoteren som inneholdt alle de tre E-boksene og villtype +316-A-allelet ($P = 0,027$). Delesjon av den oppstrøms E-boksen (mut E-boks 1 +316A) reduserte effekten av *MAD1* på ODC-promoteraktivitet vesentlig. Substitusjon av G for A ved +316-posisjonen gjorde promotere inneholdende enten to eller tre E-bokser ikke-responsive overfor *MAD1*-suppresjon.

IV. Difluormetylnornitin (DFMO)

DFMO, også kjent som eflornitin, har følgende kjemiske betegnelse; 2-(difluormetyl)-*dl*-ornitin. Det er en enzymaktivert irreversibel inhibitor av ornitindekarboksylase (ODC), den polyaminbiosyntetiske reaksjonsveien. Som et resultat av denne inhiberingen av polyaminsyntese er forbindelsen virkningsfull i forebyggingen av cancerdannelse i mange organsystemer, hvilket inhiberer cancertvekst og reduserer tumorstørrelse. Det har også synergistisk virkning med andre antineoplastiske middel.

DFMO er funnet å redusere APC-avhengig intestinal tumorigenese hos mus (Erdman *et al.*, 1999). Oral DFMO administrert daglig til mennesker inhiberer ODC-enzymaktivitet og polyamininnhold i et antall epitellev (Love *et al.*, 1993;

Gerner *et al.*, 1994; Meyskens *et al.*, 1994; Meyskens *et al.*, 1998; Simoneau *et al.*, 2001; Simoneau *et al.*, 2008). Oppfinnerne rapporterte nylig at DFMO i kombinasjon med det ikke-steroide antiinflammatoriske legemiddelet (NSAID) sulindak, er rapportert markant å senke adenomrekurrenssraten blant individer med tykktarmadenomer sammenlignet med placeboer i en randomisert klinisk utprøving (Meyskens *et al.*, 2008).

DFMO ble opprinnelig syntetisert av Centre de Recherche Merrell, Strasbourg; nåværende FDA-godkjenninger inkluderer

- Afrikansk sovesyke. Systemisk IV-doseringsform i høy dose – ikke markedsført (Sanofi/WHO)
 - Topisk doseringsform for hirsutisme (androgenindusert overflødig hårvekst)
- Ingen orale formuleringer er for øyeblikket godkjent.

DFMO og dets anvendelse i behandlingen av godartet prostatahypertrofi er beskrevet i to patenter, US- pat. nr. 4,413,141 og 4,330,559. US- pat. nr. 4,413,141 beskriver DFMO som er en kraftig inhibitor av ODC, både *in vitro* og *in vivo*. Administrering av DFMO forårsaker en reduksjon i putrescin- og spermidinkonsentrasjoner i celler i hvilke disse polyaminene normalt aktivt produseres. DFMO er i tillegg funnet å kunne bremse neoplastisk celleproliferasjon når det testes i standard tumormodeller. US- pat. nr. 4,330,559 beskriver anvendelsen av DFMO- og DFMO-derivater for behandling av godartet prostatisk hypertrofi. Godartet prostatahypertrofi, i likhet med mange sykdomstilstander karakterisert ved hurtig celleproliferasjon, er ledsaget av unormal forhøyelse av polyaminkonsentrasjoner. Behandlingen beskrevet innenfor denne referansen kan administreres til en pasient, enten oralt eller parenteralt.

DFMO kan potensielt gis kontinuerlig med vesentlige antitumoreffekter. Dette legemiddelet er relativt ikke-toksisk ved lave doser på 0,4 g/m²/dag for mennesker, mens det produserer inhibering av putrescinsyntese i tumorer. Studier i en rottetumormodell viser at DFMO-infusjon kan produsere en 90 % reduksjon i tumorputrescinnivåer uten å undertrykke perifere blodplatetellinger.

Bivirkninger observert med DFMO inkluderer effekter på hørselen ved høye doser av 4 g/M²/dag som løses opp ved seponering. Disse effektene på hørselen er

ikke observert ved lavere doser på 0,4 g/M²/dag når de administreres i opp til ett år (Meyskens *et al.*, 1994). I tillegg er det observert noen tilfeller av svimmelhet/vertigo som forsvinner når legemiddelet stoppes. Trombocytopeni er rapportert hovedsakelig i studier som anvender høye "terapeutiske" doser av DFMO (> 1,0 g/m²/dag), og primært hos cancerpasienter som tidligere hadde gjennomgått kjemoterapi, eller pasienter med ødelagt benmarg. Selv om toksisiteten assosiert med DFMO-terapi generelt ikke er så alvorlig som andre typer kjemoterapi, er den i begrensede kliniske utprøvinger funnet å fremme en doserelatert trombocytopeni. Studier hos rotter har videre vist at kontinuerlig infusjon av DFMO i 12 dager vesentlig reduserer blodplattetellinger sammenlignet med kontroller. Andre undersøkelser har fremstilt lignende observasjoner i hvilke trombocytopeni er den viktigste toksisiteten ved kontinuerlig i.v.- DFMO-terapi. Disse funnene antyder at DFMO i vesentlig grad kan inhibere ODC-aktivitet av benmargsforløperne for megakaryocytter. DFMO kan inhibere proliferative reparasjonsprosesser, slik som epitelial sårtilheling.

En klinisk utprøving i fase III vurderte rekurrensen av adenomatøse polypper etter behandling i 36 måneder med difluormetylornitin (DFMO) pluss sulindak eller matchede placeboer. Midlertidig hørselstap er en kjent toksisitet ved behandling med DFMO, og en komplett tilnærming ble således utviklet for å analysere serielle luftledningsaudiogrammer. Den generaliserte anslagsligningsmetoden anslo middelforskjellen mellom behandlingsarmer med hensyn til endring i rentonterskler ved luftledning samtidig som det ble tatt hensyn til korrelasjon hos individet på grunn av gjentatte målinger ved frekvenser. Basert på 290 individer var det en gjennomsnittlig forskjell på 0,50 dB mellom individer behandlet med DFMO pluss sulindak sammenlignet med dem behandlet med placebo (95 % konfidensintervall, -0,64 til 1,63 dB; P = 0,39), justert for baselineverdier, alder og frekvenser. I det normale taleområdet fra 500 til 3000 Hz ble det detektert en anslått forskjell på 0,99 dB (-0,17 til 2,14 dB; P = 0,09). Doseintensitet tilførte ikke modellene informasjon. Det var 14 av 151 (9,3 %) i DFMO pluss sulindakgruppen og 4 av 139 (2,9 %) i placebogruppen som opplevde minst 15 dB hørselsreduksjon fra baseline i 2 eller flere sammenhengende frekvenser over hele det testede området (P = 0,02). Oppfølgingsluftledning utført minst 6 måneder etter endt behandling viste en justert middelforskjell i hørselsterskler på 1,08 dB (-0,81 til 2,96 dB; P = 0,26) mellom behandlingsarmer. Det var ingen vesentlig forskjell i andelen av individer i DFMO- pluss sulindakgruppen som opplevde klinisk signifikant hørselstap

sammenlignet med placebogruppen. Den anslåtte risikoen for ototoksisitet som kan tilskrives eksponering for legemiddelet, er 8,4 % (95 % konfidensintervall, - 2,0 % til 18,8 %; $P = 0,12$). Det er en < 2 dB forskjell i middelsterskel for pasienter behandlet med DFMO pluss sulindak sammenlignet med dem behandlet med placebo. Resultatene av denne studien er drøftet nærmere i McLaren *et al.*, 2008. Det tilveiebringes heri fremgangsmåter for å redusere og/eller forebygge ototoksisitet hos pasienter behandlet med middel slik som DFMO og sulindak.

V. NSAID-er

NSAID-er er antiflogistika som ikke er steroider. I tillegg til antiinflammatoriske virkninger har de analgetiske, antipyretiske og blodplateinhiberende virkninger. De anvendes primært i behandlingen av kroniske artrittiske tilstander og visse bløtvevslidelser assosiert med smerte og inflammasjon. De virker ved å blokkere syntesen av prostaglandiner ved å inhibere syklooksygenase, hvilket konverterer arakidonsyre til sykliske endoperoksider, forløpere av prostaglandiner. Inhibering av prostaglandinsyntese representerer deres analgetiske, antipyretiske og blodplateinhiberende virkninger; andre mekanismer kan bidra til deres antiinflammatoriske effekter. Visse NSAID-er kan også inhibere lipoksygenaseenzymer eller fosfolipase-C, eller kan modulere T-cellefunksjon. (AMA Drug Evaluations Annual, 1814–5, 1994).

De ikke-steroide antiinflammatoriske midlene (NSAID-ene), inkludert aspirin, ibuprofen, piroksikam (Reddy *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 1994), indometacin (Narisawa, 1981) og sulindak (Piazza *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1995), inhiberer virkningsfullt tykktarmkarsinogenese i modellen med AOM-behandlede rotter. NSAID-er inhiberer også utviklingen av tumorer som rommer en aktivert Ki-ras (Singh og Reddy, 1995). NSAID-er forekommer for å inhibere karsinogenese via induksjon av apoptose i tumorceller (Bedi *et al.*, 1995; Lupulescu, 1996; Piazza *et al.*, 1995; Piazza *et al.*, 1997b). Et antall studier antyder at NSAID-enes kjemoforebyggende egenskaper, inkludert induksjonen av apoptose, er en funksjon av deres evne til å inhibere prostaglandinsyntese (gjennomgått i DuBois *et al.*, 1996; Lupulescu, 1996; Vane and Botting, 1997). Studier indikerer imidlertid at NSAID-er kan fungere gjennom både prostaglanduavhengige og -avhengige mekanismer (Alberts *et al.*, 1995; Piazza *et al.*, 1997a; Thompson *et al.*, 1995; Hanif, 1996). Sulindaksulfon, en metabolitt av NSAID-et sulindak,

mangler COX-inhiberende aktivitet, men induserer apoptose i tumorceller (Piazza *et al.*, 1995; Piazza *et al.*, 1997b) og inhiberer tumorutvikling i flere gnagermodeller for karsinogenese (Thompson *et al.*, 1995; Piazza *et al.*, 1995, 1997a).

5

Flere NSAID-er undersøkes for deres effekter i humane kliniske utprøvinger. En fase IIa-utprøving (én måned) av ibuprofen ble fullført, og til og med ved dosen på 300 mg/dag ble det observert en signifikant reduksjon i prostoglandin E₂ (PGE₂)-nivåer i flate slimhinner. En dose på 300 mg ibuprofen er svært lav (terapeutiske doser går fra 1200 til 3000 mg/dag eller mer), og toksisitet blir svært usannsynligvis observert, også i det lange løp. I dyremodeller for kjemoforebygging er ibuprofen imidlertid mindre virkningsfullt enn andre NSAID-er.

10

A. Sulindak og dets viktigste metabolitter, sulindaksulfon og sulindaksulfid

15

Sulindak er et ikke-steroid, antiinflammatorisk indenderivat med følgende kjemiske betegnelse; (Z)-5-fluor-2-metyl-1-((4-(metylsulfinyl)fenyl)metylen)-1*H*-inden-3-eddiksyre (Physician's Desk Reference, 1999). Sulfinylenheten konverteres *in vivo* ved reversibel reduksjon til en sulfidmetabolitt, og ved irreversibel oksidering til en sulfonmetabolitt (eksisulind). Se US- patent 6,258,845. Sulindak, som også inhiberer Ki-ras-aktivering, metaboliseres til to forskjellige molekyler som skiller seg i sin evne til å inhibere COX, men begge er i stand til å vise kjemoforebyggende effekter via induksjonen av apoptose. Sulindaksulfon mangler COX-inhiberende aktivitet og letter sannsynligvis induksjonen av apoptose på en måte som er uavhengig av prostaglandinsyntese. Tilgjengelig materiale indikerer at sulfidderivatet er minst én av de biologisk aktive forbindelsene. Basert på dette kan sulindak anses som et prolegemiddel.

20

25

Sulindak (Clinoril®) er tilgjengelig for eksempel som 150 mg og 200 mg tabletter. Den vanligste doseringen for voksne er 150 til 200 mg to ganger per dag, med en største daglig dose på 400 mg. Etter oral administrering absorberes ca. 90 % av legemiddelet. Topplasmanivåer oppnås på ca. 2 timer hos fastende pasienter, og 3 til 4 timer ved administrering sammen med mat. Middelhalveringstiden for sulindak er 7,8 timer: Sulfidemetabolittens

30

35

middelhalveringstid er 16,4 timer. US- pat. nr. 3,647,858 og 3,654,349 omfatter fremstillinger av sulindak.

5 Sulindak er indisert til akutt og langvarig lindring av tegn og symptomer på
 artrose, revmatoid artritt, ankyloserende spondylitt, akutt gikt og akutt vond
 skulder. De analgetiske og antiinflammatoriske effektene av sulindak (400 mg
 per dag) er sammenlignbare med dem som oppnås av aspirin (4 g per dag),
 ibuprofen (1200 mg per dag), indometacin (125 mg per dag) og fenylbutazon
 (400 til 600 mg per dag). Bivirkninger av sulindak inkluderer milde
 10 gastrointestinale effekter hos nesten 20 % av pasientene, hvor abdominal
 smerte og kvalme er de hyppigste klagene. CNS-bivirkninger observeres hos
 opptil 10 % av pasientene, og døsighet, hodepine og nervøsitet er det som oftest
 rapporteres. Hudutslett og pruritt forekommer hos 5 % av pasientene. Kronisk
 behandling med sulindak kan føre til alvorlig gastrointestinal toksisitet slik som
 15 blødning, ulcerasjon og perforasjon.

Den potensielle anvendelsen av sulindak for kjemoforebygging av cancere, og
 særlig kolorektale polypper, er godt studert. To nylige US- pat. nr. 5,814,625 og
 5,843,929 beskriver potensielle kjemoforebyggende anvendelser av sulindak hos
 20 mennesker. Doser av sulindak anført i kravene i US- pat. nr. 5,814,625 går fra
 10 mg til 1500 mg per dag, med foretrukne doser på 50 mg til 500 mg per dag.
 Ved de høyere dosene er det største problemet med anvendelsen av sulindak
 som et enkelt middel i kjemoforebygging dets velkjente toksisitet og moderat
 høye risiko for intoleranse. De eldre synes å være spesielt sårbare, idet
 25 insidensen av bivirkninger er høyere hos dem over 60. Det skal bemerkes at
 denne aldersgruppen har størst sannsynlighet for å utvikle kolorektal cancer og
 drar derfor sannsynligvis fordel av kjemoforebygging.

30 Sulindak og dets sulfonmetabolitt eksisulind er testet og fortsetter å bli testet
 klinisk for forebygging og behandling av flere cancertyper. Clinical Trials.gov, en
 amerikansk National Institutes of Health-database som tilveiebringer følgende
 oversikt per 10. mai 2010.

Status	Klinisk utprøving	
Rekrutterende	En randomisert studie av sulindak i orale premaligne lesjoner	
	Tilstander:	Leukoplaki, oral; godartede neoplasmer
	Intervensjoner:	Legemiddel: sulindak; legemiddel: Placebo

Status	Klinisk utprøving	
	Sponsorer:	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center;
		Head and Neck Surgery, AIMS, Cochin, India;
		Weill Medical College of Cornell University;
		Regional Cancer Centre (RCC), Trivandrum, India; Mazumdar Shaw Cancer Center (MSCC)
	Fase:	Ikke anført
Rekrutterende	Sulindak i forebyggingen av melanom hos friske deltagere som har økt risiko for melanom	
	Tilstand:	Precancerøs tilstand
	Intervensjoner:	Legemiddel: sulindak; andre: placebo
	Sponsorer:	University of Arizona;
		National Cancer Institute (NCI)
	Fase:	Fase II
Aktiv, ikke-rekrutterende	Eflornitin og sulindak i forebyggingen av kolorektal cancer hos pasienter med tykktarmpolypper	
	Tilstander:	Kolorektal cancer; precancerøs/ikke-ondartet tilstand
	Intervensjon:	Legemiddel: eflornitin pluss sulindak
	Sponsorer:	University of California, Irvine;
		Chao Family Comprehensive Cancer Center; National Cancer Institute (NCI)
	Fase:	Fase III
Fullført	Sulindak i forebyggingen av brystcancer hos kvinner med høy risiko for brystcancer	
	Tilstand:	Brystcancer
	Intervensjoner:	Legemiddel: sulindak;
		Andre: laboratoriebiomarkøranalyse
	Sponsorer:	University of Arizona;

Status	Klinisk utprøving	
		National Cancer Institute (NCI)
	Fase:	Fase I
Fullført	Sulindakkapsler sammenlignet med sulindaktabletter hos friske frivillige	
	Tilstand:	Uspesifisert adult fast tumor, protokollspesifikk
	Intervensjoner:	Legemiddel: sulindak; andre: farmakologisk studie
	Sponsorer:	Mayo Clinic; National Cancer Institute (NCI)
	Fase:	
Aktiv, ikke-rekrutterende	Eflornitin pluss sulindak i forebyggingen av kolorektal cancer hos pasienter med godartede kolorektale polypper	
	Tilstand:	Kolorektal cancer
	Intervensjon:	Legemiddel: eflornitin pluss sulindak
	Sponsorer:	University of California, Irvine;
		Chao Family Comprehensive Cancer Center; National Cancer Institute (NCI)
	Fase:	Fase II
Aktiv, ikke-rekrutterende	Bevacizumab/tarceva og tarceva/sulindak i plateepitelkarsinom i hode og hals	
	Tilstand:	Plateepitelkarsinom i hode og
		hals (SCCHN)
	Intervensjoner:	Legemiddel: Bevacizumab; legemiddel: erlotinib;
		Legemiddel: Sulindak
	Sponsorer:	Massachusetts General Hospital; Dana-
		Farber Cancer Institute; Emory University;
		University of North Carolina, Chapel Hill;
		Genentech; OSI Pharmaceuticals

Status	Klinisk utprøving	
	Fase:	Fase II
Aktiv, ikke-rekrutterende	Sulindak i forebyggingen av lungecancer hos nåværende eller tidligere røykere med bronkial dysplasi	
	Tilstander:	Lungecancer; precancerøs tilstand
		Lidelse knyttet til tobakksbruk
	Intervensjoner:	Legemiddel: sulindak; andre: placebo
	Sponsorer:	Mayo Clinic;
		National Cancer Institute (NCI)
	Fase:	Fase II
Fullført	Sulindak og tamoksifen i behandlingen av pasienter med desmoid tumor	
	Tilstand:	Desmoidtumor
	Intervensjoner:	Legemiddel: sulindak; legemiddel: tamoksifensitrat
	Sponsorer:	Children's Oncology Group;
		National Cancer Institute (NCI)
	Fase:	Fase II
Rekrutterende	Sulindak og epirubicin i behandlingen av pasienter med metastatisk malign melanom	
	Tilstand:	Melanom (hud)
	Intervensjoner:	Legemiddel: epirubicinhydroklorid; legemiddel: sulindak;
		Andre: immunologisk teknikk
	Sponsor:	All Ireland Cooperative Oncology Research Group
	Fase:	Fase II
Fullført	Atorvastatin, oligofruktoseanriket inulin eller sulindak i forebyggingen av cancer hos pasienter ved økt risiko for utvikling av kolorektal neoplas	

Status	Klinisk utprøving	
	Tilstander:	Kolorektal cancer; precancerøs tilstand
	Intervensjoner:	Kosttilskudd: oligofruktoseanriket inulin; legemiddel: atorvastatinkalsium; legemiddel: sulindak; andre: placebo
	Sponsorer:	Mayo Clinic;
		National Cancer Institute (NCI)
	Fase:	Fase II
Suspendert	Sulindak og planteforbindelser i forebyggingen av tykktarmcancer	
	Tilstand:	Kolorektal cancer
	Intervensjoner:	Kosttilskudd: kursumin;
		Kosttilskudd: rutin; legemiddel: quercetin; legemiddel: sulindak
	Sponsor:	Rockefeller University
	Fase:	
Aktiv, ikke-rekrutterende	Sammenligning av sulindak, aspirin og ursodiol i forebyggingen av kolorektal cancer	
	Tilstand:	Kolorektal cancer
	Intervensjoner:	Legemiddel: acetylsalisylsyre; legemiddel: sulindak; legemiddel: ursodiol
	Sponsorer:	M.D. Anderson Cancer Center;
		National Cancer Institute (NCI)
	Fase:	Fase II
Fullført	Sulindak og docetaxel i behandlingen av kvinner med metastatisk eller residiverende brystcancer	
	Tilstand:	Brystcancer
	Intervensjoner:	Legemiddel: docetaxel; legemiddel: sulindak
	Sponsorer:	Fox Chase Cancer Center;
		National Cancer Institute (NCI)

Status	Klinisk utprøving	
	Fase:	Fase II
Rekrutterende	Innflytelse av sulindak og probiotika på utviklingen av poseadenomer hos pasienter med familiær adenomatøs polypose	
	Tilstand:	Adenomatøs polyposis coli
	Intervensjoner:	Legemiddel: Sulindak (legemiddel);
		Legemiddel: VSL nr. 3 (probiotisk);
		Legemiddel: Inulin (probiotisk)
	Sponsorer:	Radboud University; Dutch Cancer Society
	Fase:	Fase II
Avsluttet	Effektene av kurkuminoider på aberrante kryptfokus i human tykktarm	
	Tilstand:	Aberrante kryptfokus
	Intervensjoner:	Legemiddel: sulindak; legemiddel: kurkumin
	Sponsor:	University of Medicine and Dentistry New Jersey
	Fase:	
Rekrutterende	Anvendelse av kursumin for behandling av intestinale adenomer ved familiær adenomatøs polypose (FAP)	
	Tilstander:	Polypper i nedre kanal hos pasienter med FAP;
		Polypper i øvre kanal hos pasienter med FAP
	Intervensjoner:	Legemiddel: Kalsumin (kursumin);
		Andre: Risikofaktorspørreskjema;
		Andre: Blodprøver;
		Andre: Biopsier (sigmoidoskopi);
		Andre: Biopsier (øvre endoskopi)
	Sponsor:	University of Puerto Rico
	Fase:	

Status	Klinisk utprøving	
Aktiv, ikke-rekrutterende	For å forlenge varigheten av behandlingsoppholdet ved intermitterende androgensuppresjon	
	Tilstand:	Prostatacancer
	Intervensjoner:	Legemiddel: Flutamid; legemiddel: Leuprolidacetat; legemiddel: Eksisulind
	Sponsorer:	University of Washington;
		OSI Pharmaceuticals
	Fase:	Fase II
Fullført	Sikkerhet, effekt og farmakokinetikk mellom kapecitabin og eksisulind hos metastatiske brystcancerpasienter	
	Tilstander:	Brystneoplasmer; metastaser, neoplasme
	Intervensjoner:	Legemiddel: Kapecitabin; legemiddel: Eksisulind
	Sponsorer:	M.D. Anderson Cancer Center;
		Cell Pathways
	Faser:	Fase I / fase II
Fullført	<u>Neoadjuvant eksisulind i behandlingen av pasienter som gjennomgår radikal prostatektomi for prostatacancer i stadie II eller stadie III</u>	
	Tilstand:	Prostatacancer
	Intervensjoner:	Legemiddel: eksisulind;
		Prosedyre: konvensjonell kirurgi;
		Prosedyre: neoadjuvant terapi
	Sponsorer:	Mayo Clinic;
		National Cancer Institute (NCI)
	Fase:	Fase II
Fullført	<u>Kombinasjonskjemoterapi i behandlingen av pasienter med fremskreden ikke-småcellet lungecancer</u>	
	Tilstand:	Lungecancer

Status	Klinisk utprøving	
	Intervensjoner:	Legemiddel: karboplatin; legemiddel: eksisulind;
		Legemiddel: gemcitabinhydroklorid
	Sponsorer:	Eastern Cooperative Oncology Group;
		National Cancer Institute (NCI)
	Fase:	Fase II
Fullført	<u>Fase II-studie av taksoter i kombinasjon med eksisulind hos pasienter med ikke-småcellet lungecancer (NSCLC)</u>	
	Tilstand:	NSCLC
	Intervensjon:	Legemiddel: Eksisulind
	Sponsor:	OSI Pharmaceuticals
	Faser:	Fase I / fase II
Fullført	<u>En fase III-studie av effekten av taksoter/aptosyn sammenlignet med taksoter/placebo hos pasienter med ikke-småcellet lungecancer</u>	
	Tilstand:	Ikke-småcellet lungecancer
	Intervensjon:	Legemiddel: Eksisulind
	Sponsor:	OSI Pharmaceuticals
	Fase:	Fase III
Fullført	<u>Eksisulind sammenlignet med placebo etter kirurgisk fjerning av prostata</u>	
	Tilstand:	Prostatiske neoplasmer
	Intervensjon:	Legemiddel: Eksisulind
	Sponsorer:	Mayo Clinic; OSI Pharmaceuticals
	Fase:	Fase II
Fullført	<u>Docetaksel, estramustin og eksisulind i behandlingen av pasienter med metastatisk prostatacancer som ikke har respondert på hormonterapi</u>	
	Tilstand:	Prostatacancer

Status	Klinisk utprøving	
	Intervensjoner:	Legemiddel: docetaxel;
		Legemiddel: estramustinfosfatnatrium;
		Legemiddel: eksisulind
	Sponsorer:	Cancer and Leukemia Group B;
		National Cancer Institute (NCI)
	Fase:	Fase II
Fullført	<u>Kombinasjonskjemoterapi og eksisulind i behandlingen av pasienter med småcellet lungecancer i utbredt stadie</u>	
	Tilstand:	Lungecancer
	Intervensjoner:	Legemiddel: karboplatin; legemiddel: etoposid;
		Legemiddel: eksisulind
	Sponsorer:	Cancer and Leukemia Group B;
		National Cancer Institute (NCI)
	Fase:	Fase II
Aktiv, ikke-rekrutterende	<u>Eksisulind i forebyggingen av polypper hos pasienter med familiær adenomatøs polypose</u>	
	Tilstander:	Kolorektal cancer; tynntarmcancer
	Intervensjon:	Legemiddel: eksisulind
	Sponsor:	University of Utah
	Faser:	Fase II / fase III
Fullført	<u>Eksisulind før radikal prostatektomi</u>	
	Tilstand:	Prostatiske neoplasmer
	Intervensjon:	Legemiddel: Eksisulindterapi
	Sponsorer:	Mayo Clinic;
		National Cancer Institute (NCI)
	Fase:	Fase II

B. Piroksikam

Et ikke-steroid antiflogistikum som er veletablert i behandlingen av revmatoid artritt og artrose med følgende kjemiske betegnelse; 4-hydroksy-2-metyl-*N*-2-pyridyl-2*H*-1,2-benzotiazin-3-karboksamid-1,1-dioksid. Dets nytteighet er også vist i behandlingen av muskel- og skjelettlidelser, dysmenoré og postoperativ smerte. Dets lange halveringstid gjør det mulig å administrere det én gang daglig. Legemiddelet er funnet å være virkningsfullt hvis det administreres rektalt. Gastrointestinale klager er de hyppigst rapporterte bivirkningene.

Piroksikam er funnet å være et effektivt kjemoforebyggingsmiddel i dyremodeller (Pollard and Luckert, 1989; Reddy *et al.*, 1987), selv om det viste bivirkninger i en nylig IIb-utprøving. En stor metaanalyse av bivirkningene av NSAID-ene indikerer også at piroksikam har flere bivirkninger enn andre NSAID-er (Lanza *et al.*, 1995). Sulindak er funnet å produsere regresjon av adenomer hos pasienter med familiær adenomatøs polypose (FAP) (Muscat *et al.*, 1994), selv om minst én studie på sporadiske adenomer har vist ingen slik effekt (Ladenheim *et al.*, 1995).

Kombinasjonen av DFMO og piroksikam er funnet å ha en synergistisk kjemoforebyggende effekt i modellen med AOM-behandlede rotter for tykktarmkarsinogenese (Reddy *et al.*, 1990), selv om DFMO utøvde en større suppressiv effekt enn piroksikam på Ki-ras-mutasjon og tumorigenese når hvert middel ble administrert separat (Reddy *et al.*, 1990). I én studie reduserte administrering av DFMO eller piroksikam til AOM-behandlede rotter antallet tumorer i Ki-ras-mutasjoner fra henholdsvis 90 % til 36 % og 25 % (Singh *et al.*, 1994). Begge middel reduserte også mengden av biokjemisk aktiv p21-ras i eksisterende tumorer.

C. Kombinasjoner av NSAID-er

Kombinasjoner av forskjellige NSAID-er anvendes også for forskjellige formål. Ved anvendelse av lavere doser av to eller flere NSAID-er er det mulig å redusere bivirkningene eller toksisitetene assosiert med høyere doser av individuelle NSAID-er. I noen utførelsesformer kan for eksempel sulindak anvendes sammen med celekoksib. I noen utførelsesformer er det ene eller begge NSAID-ene selektive COX-2-inhibitorer. Eksempel på NSAID-er som

anvendes enten alene eller i kombinasjon, inkluderer, men er ikke begrenset til, følgende: ibuprofen, naproksen, fenoprofen, ketoprofen, flurbiprofen, oksaprozin, indometacin, sulindak, etodolak, diklofenak, piroksikam, meloksikam, tenoksikam, droksikam, lomoksikam, isoksikam, mefenamsyre, meklofenamsyre, flufenamsyre, tolfenamsyre, celekoksib, rofekoksib, valdekoksib, parekoksib, lumirakoksib eller etorikoksib.

VI. Eflornitin/sulindak-kombinasjonsbehandling

Prekliniske studier av kjemoforebyggingsmiddel gitt i kombinasjon ved lave doser viser imponerende effekt i forebyggingen av adenomer med liten ytterligere toksisitet, hvilket antyder en strategi for å forbedre nytte/risikoforhold for å forebygge residiverende adenomer.

Som bemerkt ovenfor fungerer musene med *Min* (multippel intestinal neoplasi), hvilke deler en mutert *APC/apc*-genotype med FAP, som en nyttig forsøksdyremodell for humane FAP-pasienter (Lipkin, 1997). *Min*-musene kan utvikle mer enn 100 gastrointestinale adenomer/adenokarsinomer gjennom hele mage-tarm-kanalen i løpet av 120 levedager, hvilket fører til GI-blødning, obstruksjon og dødsfall. En kombinasjonsterapi med DFMO og sulindak ble vist å være virkningsfull i reduksjonen av adenomer hos disse musene (US-patentnr. 6,258,845; Gerner and Meyskens, 2004). Resultatene av å behandle *Min*-mus med enten DFMO alene, sulindak alene eller en kombinasjon av DFMO og sulindak på tumordannelse i enten tykktarm eller tynntarm er vist i FIG. 9 og 10. FIG. 9 viser det gjennomsnittlige antallet tumorer etter størrelse i tykktarmen hos tre behandlingsgrupper sammenlignet med ubehandlede kontroller. FIG. 10 viser det gjennomsnittlige antallet tumorer etter størrelse i tynntarmen hos tre behandlingsgrupper sammenlignet med ubehandlede kontroller. FIG. 11 viser hvordan antallet av høygradige adenomer er forskjellige avhengig av terapi, enkelt- eller kombinasjonsterapi.

VII. Effekt av polyamininhiberende terapi basert på pasientprofil

Effekten av en polyamininhiberende kombinasjon av langvarig daglig oralt *D,L*- α -difluormetylnornitin (DFMO, eflornitin) og sulindak blant CRA-pasienter ble vist (Meyskens *et al.*, 2008), men behandling ble assosiert med beskjeden, subklinisk ototoksitet (McLaren *et al.*, 2008) og et større antall av kardiovaskulære hendelser blant pasienter med høy kardiovaskulær baselinerisiko (Zell *et al.*,

2009). Oppfinnerne har nå undersøkt og bestemt at *ODC1*-genotypen differensielt påvirker adenomrekurrens, vevspolyaminresponser eller toksisitetsprofiler etter eflornitin- og sulindakbehandling sammenlignet med placebo.

5

Tre hundre og syttifem pasienter med tidligere resekterte ($>$ eller $=$ 3 mm) adenomer ble tilfeldig tilordnet for å motta oral difluormetylnornitin (DFMO) 500 mg og sulindak 150 mg én gang daglig eller matchede placeboer i 36 måneder, stratifisert ved anvendelse av lavdoseaspirin (81 mg) ved baseline og klinisk sted. Oppfølgingskolonoskopi ble utført 3 år etter randomisering eller fravær fra studie. Rekurrens av kolorektalt adenom ble sammenlignet blant gruppene med binomial log-regresjon. Ved å sammenligne utfallet hos pasienter som mottar placebo, med dem som mottar aktiv intervensjon, (a) var rekurrensen av ett eller flere adenomer 41,1 % og 12,3 % (risikoforhold, 0,30; 95 % konfidensintervall, 0,18–0,49; $P < 0,001$); (b) 8,5 % hadde ett eller flere fremskredne adenomer sammenlignet med 0,7 % av pasientene (risikoforhold, 0,085; 95 % konfidensintervall, 0,011–0,65; $P < 0,001$); og (c) 17 (13,2 %) pasienter hadde flere adenomer (> 1) ved sluttkolonoskopien, sammenlignet med 1 (0,7 %; risikoforhold, 0,055; 0,0074–0,41; $P < 0,001$). Alvorlige bivirkninger (grad $>$ eller $=$ 3) forekom hos 8,2 % av pasientene i placebogruppen, sammenlignet med 11 % i den aktive intervensjonsgruppen ($P = 0,35$). Der var ingen signifikant forskjell i andelen av pasienter som rapporterte hørselsendringer fra baseline. Residiverende adenomatøse polypper kan reduseres vesentlig ved en kombinasjon av lave orale doser av DFMO og sulindak og med få bivirkninger. Detaljene i denne studien drøftes nærmere nedenfor og i Meyskens *et al.*, 2008.

25

Studien ble stoppet av det uavhengige overvåkningspanelet for datasikkerhet (DSMB) etter at 267 pasienter hadde fullført studiesluttkolonoskopi (idet studien nådde sitt effektendepunkt). DSMB overvåket alle sikkerhet- og effektendepunkter. Som drøftet nærmere i eksempeldelen, involverer denne studien analyse av pasientdata fra fase III-multisenterutprøving for tykktarmadenomforebygging. Se også (Meyskens *et al.*, 2008).

30

A. *ODC1*-genotypefordeling

35

I alt tilfeller av 440 kolorektal cancer (CRC) identifisert fra UC Irvine CRC-genmiljøstudien ble anvendt i analysen av bare tilfeller. Median oppfølgingsvarighet ble 11 år. Det var 270 (61 %) tykktarmcancertilfeller, 162 (37 %) rektalcancertilfeller og 8 (2 %) CRC-tilfeller med uspesifisert sted.

Klinikopatologiske data for tykktarm- og rektalcancertilfeller er vist i tabell 1. ODC +316-genotypefordeling blant alle CRC-tilfeller var 53 % GG, 41 % GA og 7 % AA. ODC +316-genotypefordeling var likeledes blant CRC-tilfeller med og uten familiehistorie. Det var ingen vesentlige forskjeller i ODC-genotypefordeling etter alder ($P = 0,38$), kjønn ($P = 0,56$), familiehistorie ($P = 0,94$), sted i kolorektum ($P = 0,55$), histologi ($P = 0,46$) eller tumorgrad ($P = 0,73$). ODC-genotypefordeling er ikke vesentlig forskjellig etter diagnosestadium: stadium I (49 % GG, 42 % GA, 8 % AA), stadium II (56 % GG, 38 % GA, 6 % AA), stadium III (51 % GG, 43 % GA, 6 % AA), stadium IV (59 % GG, 37 % GA, 4 % AA) ($P = 0,87$). ODC-genotypefordeling etter etnisitet viste vesentlige forskjeller: Hvit (382 tilfeller: 53 % GG, 41 % GA, 6 % AA, frekvens av små A-alleler = 26 %), afrikansk-amerikansk (7 tilfeller: 71 % GG, 29 % GA, 0 % AA, frekvens av små A-alleler = 15 %), latinamerikanere (21 tilfeller: 57 % GG, 43 % GA, 0 % AA, frekvens av små A-alleler = 21 %), og asiater (27 tilfeller: 33 % GG, 41 % GA, 26 % AA, frekvens av små A-alleler = 46 %) ($P = 0,009$). Innenfor hver rase var ODC-genotypefordeling imidlertid i Hardy-Weinberg-likevekt (hvite $P = 0,36$, afrikansk-amerikanere $P = 0,66$, latinamerikanere $P = 0,21$, asiater $P = 0,35$).

B. Adenomrekurrens

ODC1-genotypefordeling var: 126 GG (55 %), 87 GA (38 %) og 15 AA (7 %).

Kliniske baselinekarakteristika viste forskjeller, som vist i tabell 1. I regresjonsmodeller med prediktorene alder, kjønn, rase, aspirinanvendelse, behandling, ODC1-genotype og behandling var behandlingen den eneste faktoren assosiert med forskjeller i adenomrekurrens, vevspolyaminrespons og ototoksisitet. En statistisk signifikant interaksjon ble detektert for ODC1-genotype og behandling i den fulle modellen for adenomrekurrens ($P = 0,021$), slik at mønsteret av adenomrekurrens blant placebopasienter ble: GG-50 %, GA-35 %, AA-29 % sammenlignet med eflornitin/sulindak-pasienter: GG-11 %, GA-14 %, AA-57 %.

En statistisk signifikant interaksjon ble detektert mellom ODC1-genotype og behandling i denne modellen ($P = 0,038$). ODC1-genotype ble ikke vesentlig

assosiert med en vevsputrescinsrespons eller spermidin/spermin-forholdsrespons i de fulle regresjonsmodellene (data ikke vist). Den relative risikoen (RR) for adenomrekurrens knyttet til behandling etter justering i den fulle regresjonsmodellen var 0,39 (95 % CI 0,24–0,66). Det var ingen signifikante assosiasjoner mellom behandling og *ODC1*-genotypegruppe med hensyn til kardiovaskulære eller gastrointestinale bivirkninger (tabellene 3 og 4).

Her ble det observert at den adenomnhiberende effekten av eflornitin og sulindak var større blant dem med den store G-homozygote *ODC1*-genotypen, i motsetning til tidligere rapporter som viste redusert risiko for residiverende adenom blant CRA-pasienter som mottar aspirin som bærer minst ett A-allel (Martinez *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2006; Hubner *et al.*, 2008). *ODC1*-genotypefordeling var lignende den rapportert i tidligere aspirinbaserte utprøvinger (Martinez *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2006; Hubner *et al.*, 2008), og A-allelet var assosiert med en ikke-vesentlig lavere residiverende adenomrisiko hos placebogruppen som var forenlig med tidligere rapporter (Martinez *et al.*, 2003; Hubner *et al.*, 2008). Disse resultatene viser at *ODC1*-A-allelbærere skiller seg i responsen på forlenget eksponering med eflornitin og sulindak sammenlignet med GG-genotypepasienter, med A-allelbærere som opplever mindre fordel med hensyn til adenomrekurrens og potensial for forhøyet risiko for utvikling av ototoksisitet, spesielt blant AA-homozygotene.

C. Overlevelsesanalyse

av de 440 CRC-tilfellene, var 138 (31 %) døde på analysetidspunktet. Sekstifire (46 %) dødsfall forekom i tilfeller som bærer GG-genotypen, sammenlignet med 74 (54 %) dødsfall i tilfeller med AA/AG-genotypene. Dødsårsak var tilgjengelig for 102 av de 138 avdøde CRC-tilfellene. Åttifem (83 %) CRC-tilfeller døde som et resultat av CRC. En statistisk signifikant forbedring i CRC-spesifikk overlevelse ble observert blant alle CRC-tilfeller som var homozygote for ODC-G-allelet (10 års overlevelse = 84 %) sammenlignet med tilfeller med minst ett A-allel (ODC-GA/AA) (10 års overlevelse = 76 %; $P = 0,031$). CRC-spesifikk overlevelsesanalyse etter stadie viste at vesentlig forskjellige overlevelsesforskjeller ikke ble observert for AJCC-stadie I ($P = 0,055$), II ($P = 0,61$) eller IV ($P = 0,65$) CRC. Blant tilfeller med stadie III-CRC ble ODC-GG-genotypen imidlertid assosiert med forbedret 10 års CRC-spesifikk overlevelse: 75 % sammenlignet med 60 % for ODC-GA/AA-genotypetilfeller; $P = 0,024$

(FIG. 1). Blant tykktarmcancertilfeller ble det observert en statistisk signifikant CRC-spesifikk overlevelsesfordel for dem med ODC-GG-genotype sammenlignet med ODC-GA/AA-tilfeller (10 års overlevelsesrate = 87 % sammenlignet med 79 %; $P = 0,029$); dette ble ikke observert for rektalcancertilfeller (10 års overlevelse = 78 % for ODC-GG-tilfeller sammenlignet med 72 % for ODC-GA/AA-tilfeller; $P = 0,42$).

Blant alle CRC-tilfellene var CRC-spesifikke overlevelsesanslag basert på ODC-genotype etter justering for alder (år), kjønn, etnisitet, tidligere CRC i familien, TNM-stadie ved diagnose, tumorsted i tykktarmen, histologisk undertype, behandling med kirurgi, strålingsterapi og kjemoterapi som følger: ODC-GG-fareforhold (HR) = 1,00 (referent), ODC GA h = 1,73 og ODC-AA-genotype HR = 1,73 (P -trend = 0,0283). Blant bare tykktarmtilfeller viste CRC-spesifikk overlevelsesanalyse at ODC +316-SNP var en uavhengig prediktor for CRC-spesifikk overlevelse, etter justering for ovenstående kliniske variabler. Sammenlignet med ODC-GG-tykktarmcancertilfeller var den CRC-spesifikke risikoen for dødsfall (h) 2,31 (1,15–4,64) for ODC-GA-genotype og 3,73 (0,93–14,99) for ODC-AA-genotype (P -trend = 0,006) (tabell 2). Samlet overlevelsesanalyse for disse tykktarmcancertilfellene var forenlig med den CRC-spesifikke overlevelsesanalysen (tabell 2). Blant rektalcancertilfeller viste CRC-spesifikk overlevelsesanalyse at ODC +316-SNP ikke var en uavhengig prediktor av CRC-spesifikk overlevelse etter justering for de ovennevnte kliniske variablene. Sammenlignet med ODC-GG-rektalcancertilfeller (HR = 1,00, referanse) var den CRC-spesifikke risikoen for dødsfall (h) 1,72 (0,83–3,57) for ODC-GA-heterozygoter og 1,93 (0,56–6,67) for ODC-AA-homozygoter (P -trend = 0,12).

Som bemerket ovenfor var ODC +316-genotypefordelingen forskjellig avhengig av etnisitet. Den observerte dødelighetsrisikoen, bortsett fra ved tilfældighet, reflekterer sannsynligvis forskjeller basert på ODC-genotype, men risikoen kan være begrenset til en særlig etnisk gruppe. Multivariatanalyser ble således utført blant tykktarmcancertilfeller blant hvite for å vurdere genotypespesifikk dødelighetsrisiko innenfor denne enkelte etniske gruppen. Blant de 234 tykktarmcancertilfellene blant hvite var det 37 CRC-relaterte dødsfall. Multivariatanalyse av CRC-spesifikk overlevelse viste at ODC +316-SNP var en uavhengig prediktor for CRC-spesifikk overlevelse blant tykktarmcancertilfeller blant hvite etter justering for de ovennevnte relevante kliniske variablene.

Sammenlignet med tilfeller med ODC-GG-genotype (HR = 1,00, referanse) var den CRC-spesifikke risikoen for dødsfall (h) 2,67 (1,22–5,82) for ODC-GA-genotype og 6,28 (1,46–26,95) for ODC-AA-genotype (P-trend = 0,0018).

5 Genotypespesifikke overlevelsesforskjeller blant CRC-tilfeller ble begrenset til tykktarmcancertilfeller: sammenlignet med ODC-GG-genotypetilfeller (HR = 1,00, referanse) var det justerte CRC-SS-fareforholdet (h) 2,31 (1,15–4,64) for ODC-GA-tilfeller og 3,73 (0,93–14,99) for ODC-AA-tilfeller (P-trend = 0,006). I tykktarmcancer celler predikerer ODC +316 SNP, omgitt av to E-bokser, ODC-
10 promoteraktivitet. E-boks-aktivatoren *c-MYC* og repressorene *MAD1* og *MAD4* binder foretrukket til små A-alleler, sammenlignet med store G-alleler, i dyrkede celler.

Basert på denne populasjonbaserte analysen av kolorektalcancertilfeller med
15 elleve års oppfølgingsvarighet ble det observert at +316-ODC-SNP var assosiert med kolorektalcancerspesifikk overlevelse blant tykktarmcancertilfeller. En statistisk signifikant økt risiko for CRC-spesifikk dødelighet ble observert med hvert ytterligere ODC-A-allel blant tilfeller av tykktarmcancer, dvs. fra ODC-GG til -GA til -AA (P-trend = 0,006), etter justering for alder, kjønn, etnisitet,
20 tumorstadiet, tidligere CRC i familien, tumorsted, histologi, behandling med kirurgi, strålingsterapi og kjemoterapi.

D. Allelspesifikk regulering av transkripsjonsfaktorer

Forsøksdataene presentert her tilveiebringer innsikt i potensielle biologiske
25 mekanismer som ligger under våre kliniske observasjoner. I tykktarmcancer epitelceller har vi vist at ODC +316-SNP er funksjonelt vesentlig, som vist ved økt binding av E-boks-transkripsjonsfaktorer til promoterelementer inneholdende A- sammenlignet med G-alleler. Både aktivatoren *c-MYC* og repressoren *MAD1* viser større effekter på promoteraktivitet i rapportelementer
30 inneholdende A- sammenlignet med G-alleler. Disse resultatene antyder allelspesifikk regulering av ODC ved E-boks-transkripsjonsfaktorer. ODC-proteinenzymaktivitet påvirkes tilsynelatende ikke av ODC +316-SNP-genotypen, hvilket vi antar påvirker ODC-transkripsjon.

35 I tykktarmceller er det vist at betinget ekspresjon av villtype *APC*, et gen uttrykt i normale tykktarmslimhinner, undertrykker *c-MYC*- og øker *MAD1*-ekspresjon

(Fultz and Gerner, 2002). Det er videre rapportert at villtype *APC* kan regulere ODC-promoteraktivitet på en måte som er avhengig av +316-SNP (*Martinez et al.*, 2003). Villtype *APC* uttrykkes i de tilsynelatende normale tykktarmslimhinnene hos individer som ikke er påvirket av FAP, mens flertallet av sporadiske tykktarmadenomer viser tegn på mutert eller slettet *APC* (Iwamoto *et al.*, 2000). *MYC* uttrykkes ved lave nivåer i normale intestinale slimhinner, men økes i intestinale adenomer av *APC^{Min/+}*-mus. Betinget knockout av intestinal epitelial *MYC*-ekspressjon undertrykker intestinal tumorigenese i *APC^{Min/+}*-mus (Ignatenko *et al.*, 2006). Som beskrevet ovenfor viste tidligere arbeid utført av vår gruppe (*Martinez et al.*, 2003) og andre (Hubner *et al.*, 2008) en beskyttende rolle for ODC-A-allelet, spesielt hos aspirinbrukere, mot rekurrens av tykktarmpolypper i kliniske forebyggingsutprøvinger. I den populasjonsbaserte studien presentert her var ODC-A-allelet imidlertid assosiert med dårlig overlevelse. Denne åpenbare motsigelsen kan forklares ved resultatene vist her, hvilke indikerer at både E-boks-aktivatorer og -repressorer binder ODC- A-allelet selektivt. Oppfinnerne funderer på om overgangen fra normalt epitel, som uttrykker E-boks-repressorer, til neoplastisk epitel kan forsinkes hos individer med ODC-A-alleler. Denne effekten kan skyldes suppresjon av polyaminsyntese. Hvis det transformerte epitelet begynner å uttrykke E-boks-aktivatorer (slik som *c-MYC*), har cancerprogresjonen imidlertid større sannsynlighet for å forekomme hos individer med ODC-A-genotypen. Våre resultater for risiko for tykktarmcancerspesifikk dødelighet er forenlige med dem fra andre som viser at risiko for prostatacancer kan være assosiert med ODC-A-allelet blant spesifikke individer som resultat av genmiljøinteraksjoner (O'Brien *et al.*, 2004; Visvanathan *et al.*, 2004). Slik tykktarmcancerprogresjon kan skyldes forbedret polyaminsyntese, slik det allerede er vist for prostatacancer (Simoneau *et al.*, 2008).

Dette funnet at en faktor, slik som ODC-SNP, kan ha både fremmende og inhiberende virkninger på karsinogenese, er ikke unikt. Transformerende vekstfaktor-beta (*TGF-β*) har for eksempel forskjellige roller i karsinogenese og cancerprogresjon (Derynck *et al.*, 2001; Pardali and Moustakas, 2007; Roberts and Wakefield, 2003). *TGF-β* i ikke-transformerte celler inhiberer celleproliferasjon og induserer apoptose. Likevel er det overuttrykt i alle humane tumorer og er assosiert med sen cancerprogresjon, spesifikt tumorinvasjon og metastase. En enkelt studie som rapporterer ODC-aktivitet i humane kolorektale tumorer, viste at høye nivåer av ODC-ekspressjon var vesentlig assosiert med

forbedret overlevelse (Matsubara *et al.*, 1995). Dette antyder at, selv om ODC-overekspresjon fremmer dannelse av humane kolorektale adenomer, er det mulig at ODC-overekspresjon forårsaker forbedret proliferasjon i etablerte lesjoner og er assosiert med forbedret respons på antiproliferative behandlinger.

5 Den studien inkluderte imidlertid ikke stratifisering etter ODC-genotype, så det er ikke kjent om disse effektene er uavhengige av ODC-genotype.

De observerte assosiasjonene av ODC +316-SNP med CRC-spesifikk dødelighet var begrenset til tykktarmcancertilfeller. Blant tykktarmcancertilfeller ble særlig

10 sterke effekter observert for hvite. Lignende andre rapporter varierer ODC +316-SNP-allelfrekvensen betraktelig etter etnisitet (O'Brien *et al.*, 2004). Når oppfinnerne begrenset overlevelsesanalysen til bare hvite (dvs. den eneste etniske gruppen med tilstrekkelig kraft for en slik analyse), var assosiasjonene av ODC +316-SNP vesentlige og av større omfang enn anslagene observert for

15 hele kohorten.

Den epidemiologiske studien deler begrensninger med andre populasjonsbaserte analyser, inkludert mangel på data om komorbide tilstander, ytelsesstatus og særlige kjemoterapeutiske benyttede regimer. Vevsbiopsiprøvene oppnådd fra

20 deltagere i UC Irvine Gene Environment Study of Familial Colorectal Cancer er i tillegg parafinintegreerte prøver, og kan derfor ikke anvendes for nøyaktig vurdering av vevspolyaminkvantifisering ved høytytelsesvæskrokromatografi (HPLC). Det er også potensialet for seleksjonsskjevhet, hvilket favoriserer en relativt frisk gruppe av CRC-overlevende, idet det var en median 16 måneders

25 forsinkelse fra tiden for CRC-diagnosen til studieregistrering. Andre faktorer som påvirker polyaminmetabolisme som ikke var representert i den foreliggende studien, kan forklare våre observasjoner. Aspirin aktiverer for eksempel polyaminacetylering og eksporterer og virker med ODC-A-allelet for å redusere celle- og vevspolyamininnhold (Gerner *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2003; Babbar *et al.*, 2006).

30

Kort oppsummert har oppfinnerne observert kliniske konsekvenser av ODC +316-SNP på CRC-spesifikk dødelighet blant tykktarmcancertilfeller. Oppfinnerne har i tillegg ytterligere etablert den funksjonelle betydningen av ODC +316-SNP i

35 den *c-MYC*- og *MAD1*-avhengige transkripsjonen av dette genet i humane tykktarmcancerceller. Disse eksperimentelle og epidemiologiske funnene antyder sammen roller for ODC +316-SNP i progresjonen av tykktarmcancer som er

distinktive fra dens tidligere rapporterte rolle i progresjonen til tykktarmadenomer. Disse funnene kan anvendes for å vurdere risikoen for tykktarmcancerprogresjon og kan anvendes for direkte pasientspesifikk farmakogenetisk håndtering, overvåkning og informasjon av hittil ukjente målrettede tilnærminger til sekundær og tertiær tykktarmcancerforebygging.

E. Sammendrag

En statistisk signifikant interaksjon ble detektert for *ODC1*-genotype og behandling i den fulle modellen for adenomrekurrens ($P = 0,021$), slik at mønsteret for adenom rekurrens blant placebopasienter ble: GG-50 %, GA-35 %, AA-29 % sammenlignet med eflornitin/sulindak-pasienter: GG-11 %, GA-14 %, AA-57 %. Her ble det observert at den adenominhiberende effekten av eflornitin og sulindak var større blant dem med den store G-homozygote *ODC1*-genotypen, i motsetning til tidligere rapporter som viser redusert risiko for residiverende adenom blant CRA-pasienter som får aspirin som bærer minst ett A-allel (*Martinez et al.*, 2003; *Barry et al.*, 2006; *Hubner et al.*, 2008). Disse resultatene viser at *ODC1*-A-allelbærere skiller seg i responsen på forlenget eksponering med eflornitin og sulindak sammenlignet med GG-genotypepasienter, med A-allelbærere som opplever mindre fordel med hensyn til adenomrekurrens og potensialet for forhøyet risiko for utvikling av ototoksitet, spesielt blant AA-homozygotene.

VIII. Polymorfismeanalyse

Genotypen ved +316-posisjonen i pasientens *ODC1*-promotergen kan bestemmes ved anvendelse av fremgangsmåtene tilveiebrakt nedenfor, inkludert de spesifikke fremgangsmåtene beskrevet i eksempeldelen. Disse fremgangsmåtene kan ytterligere modifiseres og optimaliseres ved anvendelse av prinsippene og teknikkene i molekylær biologi som utført av fagmannen. Slike prinsipper og teknikker er beskrevet for eksempel i *Small et al.*, (2002). Generelle fremgangsmåter benyttet for identifisering av enkelte nukleotidpolymorfismer (SNP-er) tilveiebringes nedenfor. Referansen i Kwok og Chen (2003) og Kwok (2001) tilveiebringer oversikt over noen av disse fremgangsmåtene.

SNP-er relatert til *ODC1* kan være karakterisert ved anvendelsen av hvilke som helst av disse fremgangsmåtene eller egnet modifisering derav. Slike

fremgangsmåter inkluderer den direkte eller indirekte sekvenseringen av stedet, anvendelsen av restriksjonsenzymene hvor stedets respektive alleler danner eller ødelegger et restriksjonssted, anvendelsen av allelspesifikke hybridiseringsprober, anvendelsen av antistoffer som er spesifikke for proteinene kodet av de forskjellige polymorfismens forskjellige alleler eller hvilken som helst annen biokjemisk tolkning.

A. DNA-sekvensering

En vanlig anvendt fremgangsmåte for å karakterisere en polymorfisme er direkte DNA-sekvensering av den genetiske plasseringen som omgir og inkluderer polymorfismen. En slik analyse kan oppnås ved anvendelse av enten den "dideoksymedierte kjedetermineringsmetoden", også kjent som "Sanger-metoden" (Sanger *et al.*, 1975), eller den "kjemiske degradasjonsmetoden", også kjent som "Maxam-Gilbert-metoden" (Maxam *et al.*, 1977). Sekvensering i kombinasjon med genomiske sekvensspesifikke amplifikasjonsteknologier, slik som polymerasekjedereaksjon, kan benyttes for å lette gjenvinningen av de ønskede genene (Mullis *et al.*, 1986; europeisk patentsøknad 50,424; europeisk patentsøknad. 84,796, europeisk patentsøknad 258,017, europeisk patentsøknad. 237,362; europeisk patentsøknad. 201,184; US- patentene 4,683,202; 4,582,788; og 4,683,194).

B. Eks nukleaseresistens

Andre fremgangsmåter som kan benyttes for å bestemme identiteten til et nukleotid som er til stede ved et polymorft sted, benytter et spesialisert eks nukleaseresistent nukleotidderivat (US- patent. 4,656,127). En primer som er komplementær med en allelsekvens umiddelbart 3'- til det polymorfe stedet, hybridiseres til DNA-et under overvåkning. Hvis det polymorfe stedet på DNA-et inneholder et nukleotid som er komplementært med det særlige eks nukleotidresistente nukleotidderivatet som er til stede, vil det derivatet bli inkorporert av en polymerase i enden av den hybridiserte primeren. Slik inkorporering gjør primeren resistent overfor eks nukleasespalting og tillater derved dens detektering. Idet det eks nukleotidresistente derivatets identitet er kjent, er det mulig å bestemme det spesifikke nukleotidet som er til stede på DNA-ets polymorfe sted.

C. Mikrosekvenseringsmetoder

Flere andre primerveiledede nukleotidinkorporeringsprosedyrer for å analysere polymorfe steder i DNA er beskrevet (Komher *et al.*, 1989; Sokolov, 1990; Syvanen 1990; Kuppaswamy *et al.*, 1991; Prezant *et al.*, 1992; Ugozzoli *et al.*, 1992; Nyren *et al.*, 1993). Disse fremgangsmåtene er avhengige av inkorporering av merkede deoksynukleotider for å skille mellom baser på et polymorft sted. Idet signalet er proporsjonalt med antallet inkorporerte deoksynukleotider, resulterer polymorfismer som forekommer i serier av det samme nukleotidet, i et signal som er proporsjonalt med seriens lengde (Syvanen *et al.*, 1990).

D. Utvidelse i løsning

Fransk patent 2,650,840 og PCT-søknad WO91/02087 drøfter en løsningsbasert fremgangsmåte for å bestemme nukleotidets identitet på et polymorft sted. Ifølge disse fremgangsmåtene anvendes en primer som er komplementær med allelsekvenser umiddelbart 3'- til et polymorft sted. Identiteten til det stedets nukleotid bestemmes ved anvendelse av merkede dideoksynukleotidderivater som er inkorporert i enden av primeren, hvis de er komplementære med det polymorfe stedets nukleotid.

E. Genetisk bitanalyse eller fastfaseutvidelse

PCT-administrering WO92/15712 beskriver en fremgangsmåte som anvender blandinger av merkede terminatorer og en primer som er komplementær med sekvensen 3' til et polymorft sted. Den merkede enden som blir inkorporert, er komplementær med nukleotidet som er til stede på det polymorfe stedet på målmolekylet som skal evalueres og således identifiseres. Her immobiliseres primeren eller målmolekylet til en fast fase.

F. Oligonukleotidligeringsassay (OLA)

Dette er en annen fastfasemetode som anvender annen metode (Landegren *et al.*, 1988). Det anvendes to oligonukleotider som kan hybridisere til tilstøtende sekvenser av en enkelt tråd av et mål-DNA. Ett av disse oligonukleotidene er biotinyllert, mens den andre er detekterbart merket. Hvis den presise komplementære sekvensen finnes i et målmolekyl, vil oligonukleotidene hybridisere slik at deres termini ligger mot hverandre og danner et

ligasjonssubstrat. Ligering muliggjør gjenvinning av det merkede oligonukleotidet ved anvendelse av avidin. Andre nukleinsyredetekteringsassayer, basert på denne fremgangsmåten, kombinert med PCR er også beskrevet (Nickerson *et al.*, 1990). Her blir PCR anvendt for å oppnå den eksponentielle amplifikasjonen av mål-DNA, som deretter blir påvist ved anvendelse av OLA.

G. Ligase-/polymerasemediert genetisk bitanalyse

US- patent 5,952,174 beskriver en fremgangsmåte som også involverer to primere som kan hybridisere til tilgrensende sekvenser av et målmolekyl. Det hybridiserte produktet dannes på et fast underlag til hvilket målet immobiliseres. Her forekommer hybridiseringen slik at primerne separeres fra hverandre i en avstand på et enkelt nukleotid. Å inkubere dette hybridiserte produktet i nærvær av en polymerase, en ligase og en nukleosidtrifosfatblanding inneholdende minst ett deoksynukleosidtrifosfat tillater ligering av hvilket som helst par av tilgrensende hybridiserte oligonukleotider. Tilsetning av en ligase resulterer i to hendelser som er nødvendige for å generere et signal, en utvidelse og en ligering. Dette tilveiebringer en høyere spesifisitet og lavere "støy" enn fremgangsmåter som anvender enten utvidelse eller ligering alene, og i motsetning til polymerasebaserte assayer forbedrer denne fremgangsmåten polymerasetrinnetts spesifisitet ved å kombinere det med en andre hybridisering og et ligeringstrinn for at et signal skal festes til den faste fasen.

H. Invasive spaltingsreaksjoner

Invasive spaltingsreaksjoner kan anvendes for å evaluere cellulært DNA for en særlig polymorfisme. En teknologi kalt INVADER® benytter slike reaksjoner (f.eks. de Arruda *et al.*, 2002; Stevens *et al.*, 2003). Det er generelt tre nukleinsyremolekyler: 1) et oligonukleotid oppstrøms av målstedet ("oppstrøms oligo"), 2) et probeoligonukleotid som dekker målstedet ("probe"), og 3) et enkelttrådet DNA med målstedet ("mål"). Det oppstrøms oligoet og proben overlapper ikke, men de inneholder tilgrensende sekvenser. Proben inneholder et donorfluorfor, slik som fluorscein, og en akseptorfarge, slik som dabcyt. Nukleotidet i den 3'-terminale enden av det oppstrøms oligoet overlapper ("invaderer") det første baseparet av et probemåldupleks. Proben spaltes deretter ved en strukturspesifikk 5'-nuklease som forårsaker separering av

fluorfor/quencher-paret, hvilket øker mengden av fluorescens som kan detekteres. Se Lu *et al.*, 2004.

I noen tilfeller utføres assayet på en fast overflate eller i et rekkeformat.

5 **I. Andre fremgangsmåter for å detektere SNP-er**

Flere andre spesifikke fremgangsmåter for polymorfismedetektering og -identifisering presenteres nedenfor og kan anvendes som sådan eller med egnede modifiseringer i kombinasjon med å identifisere polymorfismer av *ODC1*-genet i den foreliggende oppfinnelsen. Flere andre fremgangsmåter er også beskrevet på NCBI's SNP-nettsted på ncbi.nlm.nih.gov/SNP.

I en særlig utførelsesform kan utstrakte haplotyper bestemmes ved hvilken som helst gitt locus i en populasjon, hvilket gjør det mulig å identifisere nøyaktig hvilke SNP-er som vil være redundante, og hvilke som vil være vesentlige i assosiasjonsstudier. Sistnevnte betegnes "haplotypetag-SNP-er (htSNP-er)", markører som fanger haplotypene av et gen eller en region med manglende bindingslikevekt. Eksempelmetoder er beskrevet i Johnson *et al.* (2001) og Ke and Cardon (2003).

VDA-assayet benytter PCR-amplifikasjon av genomiske segmenter ved lange PCR-metoder ved anvendelse av TaKaRa LA Taq-reagenser og andre standard reaksjonsbetingelser. Den lange amplifikasjonen kan amplifisere DNA-størrelser på ca. 2000–12 000 bp. Hybridisering av produkter til variantdetektorserie (VDA) kan utføres ved et Affymetrix High Throughput Screening Center og analyseres med dataprogramvare.

En fremgangsmåte kalt "Chip Assay" anvender PCR-amplifikasjon av genomiske segmenter ved standard eller lange PCR-protokoller. Hybridiseringsprodukter analyseres av VDA, Halushka *et al.* (1999). SNP-er klassifiseres generelt som "sikre" eller "sannsynlige" basert på datamaskinanalyse av hybridiseringsmønster. Ved sammenligning med alternative detekteringsfremgangsmåter slik som nukleotidsekvensering bekreftes "visse" SNP-er 100 % av tiden; og "sannsynlige" SNP-er bekreftes 73 % av tiden ved denne fremgangsmåten.

Andre fremgangsmåter involverer simpelthen PCR-amplifikasjon etter fordøyelse med det relevante restriksjonsenzymet. Ytterligere andre involverer å sekvensere rensede PCR-produkter fra kjente genomiske regioner.

5 I enda en annen fremgangsmåte PCR-amplifiseres individuelle eksoner eller overlappende fragmenter av store eksoner. Primere er utformet fra publiserte sekvenser eller databasesekvenser, og PCR-amplifikasjon av genomisk DNA utføres ved anvendelse av følgende betingelser: 200 ng DNA-templat, 0,5 μ M hver primer, 80 μ M hver av dCTP, dATP, dTTP og dGTP, 5 % formamid, 1,5 mM
10 $MgCl_2$, 0,5 U Taq-polymerase og 0,1 volum Taq-buffer. Termisk sirkulering utføres, og resulterende PCR-produkter analyseres ved analyse av PCR-enkeltrådet konformasjonspolymorfisme (PCR-SSCP), under en rekke betingelser, f.eks. 5 eller 10 % polyakrylamidgel med 15 % urea, med eller uten 5 % glyserol. Elektroforese utføres over natten. PCR-produkter som viser
15 mobilitetsendringer, reamplifiseres og sekvenseres for å identifisere nukleotidvariasjon.

I en fremgangsmåte kalt CGAP-GAI (DEMIGLACE) lastes sekvens- og sammenstillingsdata (fra en PHRAP.ace-fil), kvalitetsscorer for
20 sekvensbaseidentifiseringene (fra PHRED kvalitetsfiler), avstandsinformasjon (fra PHYLIP dnadist og naboprogrammer) og baseidentifiseringsdata (fra PHRED '-d'-bryter) inn i minnet. Sekvenser sammenstilles og undersøkes for hver vertikal del ("skive") av den resulterende sammenstillingen for uoverensstemmelse. Hvilken som helst slik skive anses som en kandidat-SNP (DEMIGLACE). En rekke
25 filter anvendes av DEMIGLACE for å eliminere skiver som sannsynligvis ikke representerer ekte polymorfismer. Disse inkluderer filter som: (i) ekskluderer sekvenser i hvilken som helst gitt skive av SNP-hensyn hvor omkringliggende sekvenskvalitetsscorer faller 40 % eller mer; (ii) ekskluderer identifiseringer i hvilke toppamplituden er under femten prosent av alle baseidentifiseringer for
30 den nukleotidtypen; (iii) diskvalifiserer regioner av en sekvens med et høyt antall av uoverensstemmelser med konsensusen fra å delta i SNP-beregninger; (iv) fjerner fra vurderingen enhver baseidentifisering med en alternativ identifisering i hvilken toppen opptar 25 % eller mer av arealet av den identifiserte toppen; (v) ekskluderer varianter som forekommer i bare én
35 avlesningsretning. PHRED-kvalitetsscorer ble konvertert til feilsannsynlighetsverdier for hvert nukleotid i skiven. Standard bayesianske

fremgangsmåter anvendes for å beregne den posteriore sannsynligheten for at det er tegn på nukleotidheterogenitet ved en gitt lokalisering.

5 I en fremgangsmåte kalt CU-RDF (RESEQ) utføres PCR-amplifikasjon fra DNA isolert fra blod ved anvendelse av spesifikke primere for hver SNP, og etter typiske renseprotokoller for å fjerne ubrukte primere og frie nukleotider, direkte sekvensering ved anvendelse av de samme eller flettede primerne.

10 I en fremgangsmåte kalt DEBNICK (fremgangsmåte B) utføres en komparativ analyse av grupperte EST-sekvenser, hvilken bekreftes ved fluorescensbasert DNA-sekvensering. I en relatert fremgangsmåte, kalt DEBNICK (fremgangsmåte C), utføres komparativ analyse av grupperte EST-sekvenser med phred-kvalitet > 20 ved uoverensstemmelsesstedet, gjennomsnittlig phred-kvalitet > = 20 over 5 baser 5'-FLANK og 3' til SNP, ingen uoverensstemmelser i 5 baser 5' og 3' til SNP, minst to forekomster av hvert allel, hvilken bekreftes ved å undersøke spor.

20 I en fremgangsmåte identifisert ved ERO (RESEQ) utformes nye primersett for elektronisk publiserte STS-er og anvendes for å amplifisere DNA fra 10 forskjellige musestammer. Amplifikasjonsproduktet fra hver stamme gelses deretter og sekvenseres ved anvendelse av en standard dideoksysyklussekvenseringsteknikk med ³³P-merkede terminatorer. Alle de ddATP-terminerte reaksjonene lastes deretter i tilgrensende baner med en sekvenseringsgel etterfulgt av alle ddGTP-reaksjonene osv. SNP-er identifiseres ved å skanne radiografene visuelt.

30 I en annen fremgangsmåte identifisert som ERO (RESEQ-HT) utformes nye primersett for elektronisk publiserte murine DNA-sekvenser og anvendes for å amplifisere DNA fra 10 forskjellige musestammer. Amplifikasjonsproduktet fra hver stamme fremstilles for sekvensering ved behandling med eksonuklease I og alkalisk fosfatase fra reke. Sekvensering utføres ved anvendelse av ABI Prism Big Dye Terminator Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer), og sekvensprøver kjøres på 3700 DNA Analyzer (96 Capillary Sequencer).

35 FGU-CBT (SCA2-SNP) identifiserer en fremgangsmåte hvor regionen inneholdende SNP ble PCR-amplifisert ved anvendelse av primerne SCA2-FP3 og SCA2-RP3. Ca. 100 ng av genomisk DNA amplifiseres i et 50 ml reaksjonsvolum

inneholdende en sluttkonsentrasjon på 5 mM Tris, 25 mM KCl, 0,75 mM MgCl₂, 0,05 % gelatin, 20 pmol av hver primer og 0,5 U Taq DNA-polymerase. Prøver denatureres, annealeres og utvides, og PCR-produktet renses fra et bånd kuttet ut av agarosegelen ved anvendelse av for eksempel QIAquick-gelelektasjonskitet (Qiagen) og sekvenseres ved anvendelse av fargeterminator kjemi på en ABI Prism 377 automatisert DNA-sekvensator med PCR-primerne.

5

I en fremgangsmåte identifisert som JBLACK (SEQ/RESTRICT) utføres to uavhengige PCR-reaksjoner med genomisk DNA. Produkter fra den første reaksjonen analyseres ved sekvensering og indikerer et unikt FspI-restriksjonssted. Mutasjonen bekreftes i produktet av den andre PCR-reaksjonen ved fordøyelse med Fsp I.

10

I en fremgangsmåte beskrevet som KWOK(1) identifiseres SNP-er ved å sammenligne genomiske sekvensdata av høy kvalitet fra fire tilfeldig valgte individer ved direkte DNA-sekvensering av PCR-produkter med fargeterminator kjemi (se Kwok *et al.*, 1996). I en relatert fremgangsmåte identifisert som KWOK(2) identifiseres SNP-er ved å sammenligne genomiske sekvensdata av høy kvalitet fra overlappende large-insert-kloner slik som bakterielle kunstige kromosomer (BAC-er) eller P1-baserte kunstige kromosomer (PAC-er). En STS inneholdende denne SNP utvikles deretter, og forekomsten av SNP i forskjellige populasjoner bekreftes ved poollet DNA-sekvensering (se Taillon-Miller *et al.*, 1998). I en annen lignende fremgangsmåte kalt KWOK(3) identifiseres SNP-er ved å sammenligne genomiske sekvensdata av høy kvalitet fra overlappende large-insert-kloner, BAC-er eller PAC-er. SNP-ene som ble funnet ved denne tilnærmingen, representerer DNA-sekvensvarianter mellom de to donorkromosomene, men allelfrekvensene i den generelle populasjonen er ennå ikke bestemt. I fremgangsmåten KWOK(5) identifiseres SNP-er ved sammenligning av genomiske sekvensdata med høy kvalitet fra en homozygot DNA-prøve, og én eller flere poolede DNA-prøver ved direkte DNA-sekvensering av PCR-produkter med fargeterminator kjemi. De anvendte STS-ene er utviklet fra sekvensdata funnet i offentlig tilgjengelige databaser. Disse STS-ene amplifiseres spesifikt ved PCR mot en komplett hydatidiformmol (CHM) som er funnet å være homozygot ved alle loci og en pool av DNA-prøver fra 80 CEPH-foreldre (se Kwok *et al.*, 1994).

15

20

25

30

35

I en annen slik fremgangsmåte, KWOK (OverlapSnpDetectionWithPolyBayes), oppdages SNP-er ved automatisert datamaskinanalyse av overlappende regioner av humane genomiske large-insert-klonsekvenser. For datainnhenting oppnås klonsekvenser direkte fra sekvenseringssenter i stor skala. Dette er nødvendig idet basekvalitetsekvensene ikke er til stede / tilgjengelige gjennom GenBank. Rådataprosessering involverer analyse av klonsekvenser og medfølgende basekvalitetsinformasjon for konsekvens. Fullførte ("baseperfekt", feilrate under 1 til 10 000 bp) sekvenser uten assosierte basekvalitetssekvenser tilordnes en jevn basekvalitetsverdi på 40 (1 til 10 000 bp feilrate). Utkastsekvenser uten basekvalitetsverdier avvises. Prosesserte sekvenser registreres i en lokal database. En versjon av hver sekvens hvor kjente humane repetisjoner er maskert, er også lagret. Repetisjonsmaskeringer utføres med programmet "MASKERAID". Overlappingsdetektering: Antatte overlappinger detekteres med programmet "WUBLAST". Flere filtreringstrinn fulgte for å eliminere falske overlappingsdetekteringsresultater, dvs. likheter mellom et par klonsekvenser som oppstår på grunn av sekvensduplisering i motsetning til virkelig overlapping. Total overlappingslengde, samlet prosentvis likhet, antall sekvensforskjeller mellom nukleotider med høy basekvalitetsverdi, "høykvalitetsuoverensstemmelser". Resultater sammenlignes også med resultater av restriksjonsfragmentkartlegging av genomiske kloner ved Washington University Genome Sequencing Center, elektroferogramgranskerens (eng: finisher) rapporter om overlappinger og resultater av sekvens-contig-byggingsinnsats ved NCBI. SNP-detektering: Overlappende par av klonsekvens analyseres for kandidat-SNP-steder med "POLYBAYES" SNP-detekteringsprogramvaren. Sekvensforskjeller mellom paret av sekvenser scores for sannsynligheten for å representere virkelig sekvensvariasjon i motsetning til sekvenseringsfeil. Denne prosessen krever forekomst av basekvalitetsverdier for begge sekvenser. Høyt scorende kandidater trekkes ut. Søket er begrenset til enkle baseparvarianter av substitusjonstypen. Konfidensresultat hos kandidat-SNP beregnes med POLYBAYES-programvaren.

I fremgangsmåten identifisert ved KWOK (TaqMan assay) anvendes TaqMan-assayet for å bestemme genotyper for 90 tilfeldige individer. I fremgangsmåten identifisert ved KYUGEN(Q1) pooles og analyseres DNA-prøver av indikerte populasjoner av PLACE-SSCP. Toppføyder av hvert allel i den poolde analysen korrigeres av dem i en heterozygot, og anvendes deretter for beregning av allelfrekvenser. Allelfrekvenser som er høyere enn 10 %, kvantifiseres pålitelig

ved denne fremgangsmåten. Allelfrekvens = 0 (zero) betyr at allelet ble funnet blant individer, men den tilsvarende toppen er ikke observert i undersøkelsen av poolen. Allelfrekvens = 0–0,1 indikerer at små alleler detekteres i poolen, men toppene er for lave til å bli pålitelig kvantifisert.

5

I enda en annen fremgangsmåte identifisert som KYUGEN (Method1) ettermerkes PCR-produkter med fluorescerende farger og analyseres med et automatisert kapillært elektroforesesystem under SSCP-betingelser (PLACE-SSCP). Fire eller flere individuelle DNA-er analyseres med eller uten to poolede DNA (Japansk pool og CEPH foreldrepool) i en serie forsøk. Alleler identifiseres ved visuell inspeksjon. Individuelle DNA-er med forskjellige genotyper sekvenseres, og SNP-er identifiseres. Allelfrekvensene anslås fra topphøyder i de poolede prøvene etter korleksjon for signalskjevhet ved anvendelse av topphøyder i heterozygoter. For PCR-primene er tagget for å ha 5'-ATT eller 5'-GTT i sine ender for ettermerking av begge tråder. DNA-prøver (10 ng/ul) amplifiseres i reaksjonsblandingene inneholdende bufferen (10 mM Tris-HCl, pH 8,3 eller 9,3, 50 mM KCl, 2,0 mM MgCl₂), 0,25 µM av hver primer, 200 µM av hver dNTP og 0,025 enheter/µl av Taq DNA-polymerase forhåndsblendet med anti-Taq-antistoff. De to trådene av PCR-produkter er differensielt merket med nukleotider modifisert med R110 og R6G ved en byttreaksjon av Klenow-fragment av DNA-polymerase I. Reaksjonen stoppes ved å tilsette EDTA, og ikke-inkorporerte nukleotider defosforyleres ved å tilsette alkalisk fosfatase fra kalvetarmer. For SSCP: en alikvot av fluorescensmerkede PCR-produkter og TAMRA-merkede interne markører tilsettes i deionisert formamid og denatureres. Elektroforese utføres i et kapillærrør ved anvendelse av en ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Genescan-programvare (P-E Biosystems) anvendes for datainnhenting og dataprosessering. DNA fra individer (to til elleve), inkludert dem som viste forskjellige genotyper på SSCP, utsettes for direkte sekvensering ved anvendelse av storfargeterminatorkjemi på ABI Prism 310-sekvensatorer. Flere sekvenssporfiler oppnådd fra ABI Prism 310 prosesseres og sammenstilles med Phred/Phrap og vises ved anvendelse av Consed-visningsprogram. SNP-er identifiseres med PolyPhred-programvare og visuell inspeksjon.

25

30

35

I enda en annen fremgangsmåte identifisert som KYUGEN (fremgangsmåte 2) søkes individer med forskjellige genotyper ved å denaturere HPLC (DHPLC) eller PLACE-SSCP (Inazuka *et al.*, 1997), og deres sekvenser bestemmes for å identifisere SNP-er. PCR utføres med primere tagget med 5'-ATT eller 5'-GTT i

sine ender for ettermerking av begge tråder. DHPLC-analyse utføres ved anvendelse av WAVE DNA-fragmentanalyzesystemet (Transgenomic). PCR-produkter injiseres i DNASep-kolonne og separeres under betingelsene bestemt ved anvendelse av WAVEMaker-program (Transgenomic). De to trådene av PCR-

5 produkter er differensielt merket med nukleotider modifisert med R110 og R6G ved en byttreaksjon av Klenow-fragment av DNA-polymerase I. Reaksjonen stoppes ved å tilsette EDTA, og ikke-inkorporerte nukleotider defosforyleres ved å tilsette alkalisk fosfatase fra kalvetarmer. SSCP etterfulgt av elektroforese utføres i et kapillærrør ved anvendelse av en ABI Prism 310 genetisk analysator.

10 Genescan-programvare (P-E Biosystems). DNA fra individer, inkludert dem som viste forskjellige genotyper på DHPLC eller SSCP, utsettes for direkte sekvensering ved anvendelse av stormiddelterminatorkjemi på ABI Prism 310-sekvensator. Flere sekvenssporfiler oppnådd fra ABI Prism 310 prosesseres og sammenstilles med Phred/Phrap og vises ved anvendelse av Consed-

15 visningsprogram. SNP-er identifiseres med PolyPhred-programvare og visuell inspeksjon. Sporkromatogramdata av EST-sekvenser i Unigene prosesseres med PHRED. For å identifisere sannsynlige SNP-er, rapporteres enkelte baseuoverensstemmelser fra flere sekvenssammenstillinger produsert av programmene PHRAP, BRO og POA for hver Unigene-gruppe. BRO korrigerer

20 mulige feilrapporterte EST-orienteringer, mens POA identifiserte og analyserte ikke-lineære sammenstillingsstrukturer som er indikative for genblanding/-kimærer som kan produsere spuriøse SNP-er. Bayesiansk inferens anvendes for å veie tegn på ekte polymorfisme sammenlignet med sekvenseringsfeil, feilsammenstilling eller flertydighet, feilgruppering eller kimære EST-sekvenser,

25 vurdering av data slik som råkromatogramhøyde, skarphet, overlapping og avstand; sekvenseringsfeilrater; kontekstsensitivitet; cDNA-bibliotekopprinnelse osv.

IX. Farmasøytiske formuleringer og administreringsveier

30 De terapeutiske forbindelsene ifølge den foreliggende beskrivelsen kan administreres ved en rekke fremgangsmåter, f.eks. oralt eller ved injeksjon (f.eks. subkutan, intravenøst, intraperitonealt osv.). Avhengig av administreringsveien kan de aktive forbindelsene være overtrukket i et materiale for å beskytte forbindelsen mot virkning av syrer og andre naturlig betingelser

35 som kan inaktivere forbindelsen. De kan også administreres ved kontinuerlig perfusjon/infusjon av et sykdoms- eller sårsted.

For å administrere den terapeutiske forbindelsen ved annet enn parenteral administrering kan det være nødvendig å overtrekke eller parallelt administrere forbindelsen med et materiale for å forebygge dens inaktivering. Den terapeutiske forbindelsen kan for eksempel administreres til en pasient i en egnet bærer, f.eks. liposomer eller en fortynner. Farmasøytisk akseptable fortynnere inkluderer saltholdige og vandige bufferløsninger. Liposomer inkluderer vann-i-olje-i-vann-CGF-emulsjoner samt konvensjonelle liposomer (Strejan *et al.*, 1984).

Den terapeutiske forbindelsen kan også administreres parenteralt, intraperitonealt, intraspinalt eller intracerebralt. Dispersjoner kan fremstilles i glyserol, flytende polyetylglykoler og blandinger derav og i oljer. Under vanlige betingelser for oppbevaring og anvendelse kan disse fremstillingene inneholde et konserveringsmiddel for å forebygge veksten av mikroorganismer.

Farmasøytiske sammensetninger som er egnet til injiserbar anvendelse, inkluderer sterile vandige løsninger (hvor de er vannløselige) eller dispersjoner og sterile pulvere for provisorisk fremstilling av sterile injiserbare løsninger eller dispersjon. I alle tilfeller må sammensetningen være steril og må være flytende slik at den enkelt kan anvendes i sprøyter. Den må være stabil under produksjon- og oppbevaringsbetingelsene og må konserveres mot kontamineringsvirkningen av mikroorganismer slik som bakterier og sopp. Bæreren kan være et løsemiddel eller dispersjonsmedium inneholdende for eksempel vann, etanol, polyol (slik som glyserol, propylenglykol og flytende polyetylglykol og lignende), egnede blandinger derav og vegetabiliske oljer. Riktig fluiditet kan for eksempel opprettholdes ved anvendelse av et overtrekk, slik som lecitin, ved opprettholdelse av den nødvendige partikkelstørrelsen ved dispersjon og ved anvendelse av surfaktanter. Forebygging av virkningen av mikroorganismer kan oppnås ved forskjellige antibakterielle og antifungale middel, f.eks. parabener, klorbutanol, fenol, askorbinsyre, timerosal og lignende. I mange tilfeller vil det være foretrukket å inkludere isotoniske middel, f.eks. sukkerarter, natriumklorid eller polyalkoholer slik som mannitol og sorbitol, i sammensetningen. Forlenget absorpsjon av de injiserbare sammensetningene kan tilveiebringes ved å inkludere i sammensetningen et middel som forsinker absorpsjon, f.eks. aluminiummonostearat eller gelatin.

Sterile injiserbare løsninger kan fremstilles ved inkorporering av den terapeutiske forbindelsen i nødvendig mengde i et egnet løsemiddel med én eller en kombinasjon av ingredienser nevnt ovenfor etter behov, etterfulgt av filtrert sterilisering. Dispersjoner fremstilles generelt ved å inkorporere den terapeutiske forbindelsen i en steril bærer som inneholder et basisk dispersjonsmedium og de nødvendige andre ingrediensene fra dem nevnt ovenfor. I tilfelle sterile pulvere for fremstilling av sterile injiserbare løsninger er de foretrukne fremgangsmåtene for fremstilling vakuumbørking og frysetørking, hvilket gir et pulver av den aktive ingrediensen (dvs. den terapeutiske forbindelsen) pluss eventuell ytterligere ønsket ingrediens fra en tidligere sterilfiltrert løsning derav.

De terapeutiske forbindelsene kan administreres oralt, f.eks. med en inert fortynner eller en assimilerbar spiselig bærer. Den terapeutiske forbindelsen og andre ingredienser kan også innkapsles i en gelatinkapsel med hardt eller mykt skall, sammenpresses til tabletter eller inkorporeres direkte i individets kosthold. For oral terapeutisk administrering kan den terapeutiske forbindelsen inkorporeres med eksipienter og anvendes i form av svelgbare tabletter, bukkale tabletter, pastiller, kapsler, eliksirer, suspensjoner, siruper, skiver og lignende. Prosentandelen av den terapeutiske forbindelsen i sammensetningene og fremstillingene kan selvfølgelig varieres. Mengden av den terapeutiske forbindelsen i slike terapeutisk nyttige sammensetninger er slik at en egnet dosering vil bli oppnådd.

Det er spesielt fordelaktig å danne parenterale sammensetninger i doseringsenhetsform for å lette administrering og doseringsensartethet. Doseringsenhetsform som anvendt heri betyr fysisk atskilte enheter som er egnet som enhetsdoseringer for individene som skal behandles; idet hver enhet inneholder en forhåndsbestemt kvantitet av terapeutisk forbindelse beregnet på å produsere den ønskede terapeutiske effekten i forbindelse med den nødvendige farmasøytiske bæreren. Beskrivelsen for doseringsenhetsformene ifølge oppfinnelsen er styrt og direkte avhengige av (a) de unike karakteristikaene ved den terapeutiske forbindelsen og den særlige terapeutiske effekten som skal oppnås, og (b) begrensningene som finnes i teknikken for å blande av en slik terapeutisk forbindelse for behandling av en valgt tilstand hos en pasient.

Den terapeutiske forbindelsen kan også administreres topisk til hud, øye eller slimhinner. Hvis lokal administrering til lungene er ønsket, kan den terapeutiske forbindelsen alternativt administreres ved inhalering i en tørrpulver- eller aerosolformulering.

5

Aktive forbindelser administreres ved en terapeutisk virkningsfull dosering som er tilstrekkelig til å behandle en tilstand assosiert med en tilstand hos en pasient. Effekten av en forbindelse kan for eksempel evalueres i et dyremodellsystem som kan være prediktivt for effekt i behandlingen av sykdommen hos mennesker, slik som modellsystemene vist i eksemplene og tegningene.

10

Den faktiske doseringsmengden av en forbindelse ifølge den foreliggende beskrivelsen eller en sammensetning omfattende en forbindelse ifølge den foreliggende beskrivelsen administrert til et individ kan bestemmes ved fysiske og fysiologiske faktorer slik som alder, kjønn, kroppsvekt, tilstandens alvorlighetsgrad, typen sykdom som behandles, tidligere eller samtidig terapeutiske intervensjoner, individets idiopati og administreringsveien. Disse faktorene kan bestemmes av fagmannen. Legen som er ansvarlig for administrering, vil typisk bestemme konsentrasjonen av aktiv(e) ingrediens(er) i en sammensetning og egnet dose(r) for det individuelle individet. Doseringen kan justeres av den individuelle legen i tilfelle komplikasjoner.

15

20

25

30

En virkningsfull mengde vil typisk variere fra ca. 0,001 mg/kg til ca. 1000 mg/kg, fra ca. 0,01 mg/kg til ca. 750 mg/kg, fra ca. 100 mg/kg til ca. 500 mg/kg, fra ca. 1,0 mg/kg til ca. 250 mg/kg, fra ca. 10,0 mg/kg til ca. 150 mg/kg i én eller flere daglige doseadministreringer, i én eller flere dager (naturligvis avhengig av administreringsmåten og faktorene drøftet ovenfor). Andre egnede doseområder inkluderer 1 mg til 10 000 mg per dag, 100 mg til 10000 mg per dag, 500 mg til 10 000 mg per dag og 500 mg til 1000 mg per dag. I noen særlige utførelsesformer er mengden mindre enn 10 000 mg per dag med et område fra 750 mg til 9000 mg per dag.

35

Den virkningsfulle mengden kan være mindre enn 1 mg/kg/dag, mindre enn 500 mg/kg/dag, mindre enn 250 mg/kg/dag, mindre enn 100 mg/kg/dag, mindre enn 50 mg/kg/dag, mindre enn 25 mg/kg/dag eller mindre enn 10 mg/kg/dag. Den kan alternativt være i området fra 1 mg/kg/dag til 200 mg/kg/dag. Vedrørende behandling av diabetiske pasienter kan

enhetsdoseringen for eksempel være en mengde som reduserer blodglukose med minst 40 % sammenlignet med et ubehandlet individ. I en annen utførelsesform er enhetsdoseringen en mengde som reduserer blodglukose til et nivå som er ± 10 % av blodglukosenivået hos et ikke-diabetisk individ.

5

I andre ikke-begrensende eksempel kan en dose også omfatte fra ca.

1 mikrogram/kg/kroppsvekt, ca. 5 mikrogram/kg/kroppsvekt, ca.

10 mikrogram/kg/kroppsvekt, ca. 50 mikrogram/kg/kroppsvekt, ca.

100 mikrogram/kg/kroppsvekt, ca. 200 mikrogram/kg/kroppsvekt, ca.

10

350 mikrogram/kg/kroppsvekt, ca. 500 mikrogram/kg/kroppsvekt, ca.

1 milligram/kg/kroppsvekt, ca. 5 milligram/kg/kroppsvekt, ca.

10 milligram/kg/kroppsvekt, ca. 50 milligram/kg/kroppsvekt, ca.

100 milligram/kg/kroppsvekt, ca. 200 milligram/kg/kroppsvekt, ca.

350 milligram/kg/kroppsvekt, ca. 500 milligram/kg/kroppsvekt, til ca.

15

1000 mg/kg/kroppsvekt eller mer per administrering, og hvilket som helst

område som kan avledes deri. I ikke-begrensende eksempel på et avledbart

område fra antallene anført heri kan det administreres et område på ca.

5 mg/kg/kroppsvekt til ca. 100 mg/kg/kroppsvekt, ca.

5 mikrogram/kg/kroppsvekt til ca. 500 milligram/kg/kroppsvekt osv., basert på

20

antallene beskrevet ovenfor.

I visse utførelsesformer kan en farmasøytisk sammensetning ifølge den foreliggende beskrivelsen omfatte for eksempel minst ca. 0,1 % av en

forbindelse ifølge den foreliggende beskrivelsen. I andre utførelsesformer kan

25

forbindelsen ifølge den foreliggende beskrivelsen omfatte mellom ca. 2 % og ca.

75 % av enhetens vekt, eller for eksempel mellom ca. 25 % og ca. 60 %, og

hvilket som helst område som kan avledes deri.

Enkelt- eller multidoser av midlene er aktuelle. Ønskede tidsintervaller for

30

administrering av multidoser kan bestemmes av fagmannen som ikke benytter

mer enn rutineeksperimentering. Som et eksempel kan individer få administrert

to doser daglig ved ca. 12 timers intervaller. I noen utførelsesformer

administreres middelet én gang per dag.

35

Middelet/midlene kan administreres etter et rutineskjema. Et rutineskjema som

anvendt heri betyr en forhåndsbestemt betegnet tidsperiode. Rutineskjemaet

kan omfatte tidsperioder som er identiske, eller som er forskjellige i lengde, så

lenge skjemaet er forhåndsbestemt. Rutineskjemaet kan eksempelvis involvere administrering to ganger per dag, hver dag, annenhver dager, hver tredje dag, hver fjerde dag, hver femte dag, hver sjette dag, ukentlig, månedlig eller hvilket som helst antall dager eller uker derimellom. Det forhåndsbestemte rutineskjemaet kan alternativt involvere administrering to ganger daglig for den første uken, etterfulgt av et daglig grunnlag i flere måneder osv. I andre utførelsesformer sikrer oppfinnelsen at middelet/midlene kan tas oralt, og at tidspunktet for dette er eller ikke er avhengig av matinntak. Middelet kan således tas for eksempel hver morgen og/eller hver kveld, uavhengig av når individet har spist eller vil spise.

X. Kombinasjonsbehandling

Virkningsfull kombinasjonsbehandling kan oppnås med en enkelt sammensetning eller farmakologisk formulering som inkluderer begge middel, eller med to distinktive sammensetninger eller formuleringer, administrert samtidig, hvori én sammensetning inkluderer en forbindelse ifølge denne oppfinnelsen og den andre inkluderer de(t) andre middelet/midlene. Terapien kan alternativt komme før eller etter den andre middelbehandlingen ved intervaller som går fra minutter til måneder.

Forskjellige kombinasjoner kan benyttes, slik som hvor "A" representerer det første middelet (dvs. DFMO) og "B" representerer et sekundært middel (dvs. et ikke-aspirinholdig NSAID, f.eks. sulindak), hvorav ikke-begrensede eksempler beskrives nedenfor:

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. Eksempel

Følgende eksempel er inkludert for å vise foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen. Fagmannen skal forstå at teknikkene beskrevet i eksemplene som følger, representerer teknikker som ifølge oppfinnerens oppdagelse fungerer godt i utøvelsen av oppfinnelsen, og kan således anses å utgjøre foretrukne måter å utøve den på. Fagmannen bør imidlertid, i lys av den foreliggende beskrivelsen,

forstå at mange endringer kan foretas i de spesifikke utførelsesformene som beskrives, og fremdeles oppnå et lignende resultat.

Eksempel 1 – Epidemiologiske studier: ODC +316-SNP-assosiasjoner med CRC-spesifikk overlevelse

5

Forsøksmetode: Studien inkluderte 440 tilhørende CRC-tilfeller fra den populasjonsbaserte UC Irvine Gene-Environment Study of Familial CRC (diagnostisert 1994–1996 med oppfølging til og med mars 2008). Det primære utfallet var CRC-spesifikk overlevelse (CRC-SS) avhengig av ODC-genotype (GG sammenlignet med AA/GA). I humane tykktarmcancer cellelinjer ble ODC-allelspesifikk binding av E-boks-transkripsjonsfaktorer bestemt via Western Blotting og assayer ved kromatinimmunutfelling (CHIP). ODC-allelspesifikk promoteraktivitet ble bestemt ved anvendelse av promoterkonstruksjoner i kombinasjon med vektorer som uttrykker enten den transkripsjonale aktivatoren *c-MYC* eller repressoren *MAD1*.

10

15

Resultater: Genotypespesifikke overlevelsesforskjeller blant CRC-tilfeller ble begrenset til tykktarmcancer tilfeller: Sammenlignet med ODC-GG-genotypetilfeller (HR = 1,00, referanse) var det justerte CRC-SS-fareforholdet (h) 2,31 (1,15–4,64) for ODC-GA-tilfeller og 3,73 (0,93–14,99) for ODC-AA-tilfeller (P-trend = 0,006). I tykktarmcancer celler predikerer ODC +316 SNP, omgitt av to E-bokser, ODC-promoteraktivitet. E-boks-aktivatoren *-MYC* og repressorene *MAD1* og *MAD4* binder foretrukket til små A-alleler, sammenlignet med store G-alleler, i dyrkede celler.

20

25

Studiepopulasjon. Vi studerte tilhørende tilfeller av invasiv CRC registrert i University of California, Irvine Gene-Environment Study of Familial Colorectal Cancer (Peel *et al.*, 2000; Zell *et al.*, 2007) i 1994–1996 med oppfølging til og med mars 2008. Morstudien ble utformet for å bestemme insidensen av HNPCC i en stor, populasjonbasert kohort av kolorektalcancer tilfeller. Deltagere ble identifisert gjennom de populasjonsbaserte cancerregistrene til Cancer Surveillance Program of Orange County/San Diego Imperial Organization for Cancer Control ved anvendelse av datafilen fra april 2008. I morstudien (Peel *et al.*, 2000) ble alle individer med CRC diagnostisert ved alle aldre i Orange County, CA, fra 1994 til 1996 kartlagt. Alle individer diagnostisert i San Diego og Imperial Counties, CA, i alderen < 65 og mellom 1994 og 1995 ble også

30

35

bestemt. Tilfeller ble deretter kontaktet hvis de ble valgt ut for studien (levde på bestemmelsestidspunktet og hadde en kontaktadresse), og hvis legene deres ikke nektet tillatelse til å ta kontakt. Samtidig med studiestarten signerte studiedeltagerne et samtykkeskjema som ga mulighet for blodtaking og utgivelse av medisinsk informasjon. Denne studien ble godkjent av UC Irvine Institutional Review Board (nr. 93–257). Kliniske og demografiske data inkludert vital status og oppfølging ble oppnådd gjennom kobling til de regionale cancerregisterdatabasene som tidligere beskrevet (Peel *et al.*, 2000; Zell *et al.*, 2007; Zell *et al.*, 2008). Stadeinndeling av tumor, node, metastase (TNM) ble avledet fra eksisterende AJCC-koder hvor slike var tilgjengelige, og konvertering av sykdomsomsfangskoder, som tidligere rapportert (Le *et al.*, 2008). Tidligere cancer i nærmeste familie ble bestemt ved selvrapportering under et telefonintervju utført ved registrering (Zell *et al.*, 2008; Ziogas and Anton-Culver, 2003). Tjueto tilfeller med arvelig ikke-polypose-tykktarmcancer (HNPCC), som definert ved Amsterdam-kriteriene, ble identifisert og ekskludert fra analysen. Mediantiden fra CRC-diagnose inntil studieregistrering (dvs. dato for familiehistorieintervju) var 16 måneder (95 % CI 12–23 måneder).

DNA-ekstraksjon og ODC +316-SNP-genotyping. DNA ble ekstrahert fra 2,0 ml røde blodcellekoagulatprøver ved anvendelse av QIAGEN QIAamp DNA Midi- eller Minikit, (Qiagen) etter produsentens bruksanvisning. Genotyping av ODC +316-SNP ble utført ved anvendelse av oligonukleotidprimere utformet for å amplifisere et 172-bp-fragment inneholdende polymorfbasen ved +316 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Allelspesifikke TaqMan-prober ble syntetisert med forskjellige 5'-etiketter (6-karboksyfluorescein eller VIC) og samme 3' quencherfarge (6-karboksyetrametylrodamin) (23). Hver PCR-reaksjon (5 µl total) inneholdt 10 ng deltager-DNA, 30 pmol av hver primer, 12,5 pmol av hver TaqMan-probe og 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), som tidligere rapportert (Martinez *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2000).

Statistisk analyse – populasjonsbasert studie. Prøvestørrelse ble bestemt basert på et anslått 1:1-forhold mellom ODC-GG-genotype og ODC-GA/AA-genotype (Martinez *et al.*, 2003; Barry *et al.* 2006; Hubner *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2000). Tidligere analyse av data fra 1154 tykktarm- og rektalcancertilfeller i UC Irvine Gene-Environment Study of Familial CRC viste at 10 års CRC-spesifikk overlevelse var tilnærmet 66 % (Zell *et al.*, 2008). Oppfinnerne foreslo en 15 %

eller større forskjell i CRC-spesifikk overlevelse basert på ODC-genotype alene for våre prøvestørrelsesberegninger. Totalt 315 individer var således nødvendig for å detektere den foreslåtte forskjellen i 10 års CRC-spesifikk overlevelse mellom to grupper ved 5 % signifikansnivå med 80 % styrke: 55 % i gruppe 1 sammenlignet med 70 % i gruppe 2. 440 av 481 DNA-prøver ble genotypet med hell. 41 tilfeller (8,5 %) resulterte i en ubestemt ODC +316-genotype på grunn av lav DNA-konsentrasjon og/eller dårlig DNA-kvalitet, men det ble observert ingen klinikopatologiske forskjeller mellom de vellykkede genotype- og ikke vellykkede genotypetilfellene. Studien var således tilstrekkelig sterk til å overkomme det primære endepunktet.

Sammenligninger av demografiske, kliniske og patologiske variabler blant tykktarm- og rektaltilfeller ble utført ved anvendelse av Pearsons kjikvadratstatistikk eller Fishers nøyaktighetstest for nominelle variabler og Students t-test for kontinuerlige variabler. Kolorektalcancerspesifikk overlevelse ble definert som dødelighet fra selve CRC, og datasensurering forekom i følgende tilfeller: levde ved oppfølgingens slutt, tapt for oppfølging eller død av hvilken som helst annen årsak enn CRC. Samlet overlevelse (OS) ble definert med dødelighet av hvilken som helst årsak. Overlevelseskurver ble konstruert for tykktarm- og rektalcancertilfeller ved anvendelse av Kaplan-Meier-metoden, og analysert med log-rangeringstesten for univariatanalyser. Cox' proporsjonale faremodellering ble utført for alle CRC-tilfeller, tykktarmcancertilfeller og rektalcancertilfeller ved anvendelse av tid siden diagnose for å profilere den justerte risikoen for samlede og CRC-spesifikke dødsfall basert på ODC-genotype. Effektene av ODC-genotype (GG, GA eller AA) på overlevelse ble analysert i Cox-modellene med justering for følgende kovariater: alder, kjønn, etnisitet, tidligere CRC i familien, TNM-stadie ved diagnose, tumorsted i tykktarmen, histologisk undertype, behandling med kirurgi, strålingsterapi og kjemoterapi. Hver variabel i modellen ble kodet ved anvendelse av blindvariabler. Alle analysene ble utført ved anvendelse av SAS 9,2 statistisk programvare (SAS Institute, Cary, NC). Statistisk signifikans ble antatt for en 2-halet P-verdi $< 0,05$.

Eksempel 2 – Forsøksstudier: ODC +316-SNP-regulering i tykktarmcancer celler

Cellekultur. De humane tykktarmcancer cellelinjene HT29 og HCT116 ble opprettholdt i McCoy's 5A-medium (Invitrogen, Carlsbad, CA). Alle anvendte medium ble supplert med 10 % FBS pluss 1 % penicillin/streptomycinløsning (Invitrogen, Carlsbad, CA). Kulturer ble holdt ved 37 °C i en fuktet atmosfære av 5 % CO₂.

Genotyping assay. DNA-prøver fra HT29- og HCT116-celler ble utsatt for en PCR-RFLP- prosedyre for å detektere det polymorfe PstI-stedet. Sekvenser ble amplifisert ved PCR, ved anvendelse av følgende primere: 5'-TCTGCGCTTCCCCATGGGGCT-3' (SEQ ID NO:1) og 5'-TTTCCCAACCCTTCG-3' (SEQ ID NO:2). Hver reaksjon inneholdt –1 µl DNA, 4 pmol av hver primer, 12,5 µl 2x PCR PreMixes-buffer "G" (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI) og 0,5 enhet Taq DNA-polymerase, i et sluttvolum på 25 µl. PCR-produktets forventede størrelse var 351 bp. Etter amplifikasjon ble 10–20 µl av PCR-produktet fordøyd med 10 enheter PstI i 30 µl i 2 timer ved 37 °C. DNA fra HT29-celler (GA), inneholdende PstI-stedet, ga to fragmenter på 156 og 195 bp.

Western Blotting-analyse. Celler ble høstet og lysert, og proteiner ble separert på en 12,5 % SDS-PAGE-gel. Proteiner ble overført ved elektroforese på en Hybond-C-membran. Membranen ble blokkert med Blotto A (5 % blokkeringsgradig tørrmelk i TTBS-løsning) og probet ved anvendelse av 1:300 fortynninger av primære antistoffer (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) i Blotto A. Primære antistoffer ble inkubert ved 4 °C over natten, etterfulgt av inkubering med et egnet HRP-tagget sekundært antistoff (1:1000 fortynning) i 1 time ved romtemperatur. Kjemiluminescerende detektering ble utført ved anvendelse av ECL Western Detection-reagens (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) og fremkalt på Biomax XAR-film (Kodak).

Kromatinimmunutfelling (CHIP). CHIP-assayer ble utført ved anvendelse av et kommersielt kit, som anbefalt av produsenten (Upstate Biotech, Lake Placid, NY, USA). Celler ble kort behandlet med 1 % formaldehyd for å kryssbinde DNA og proteiner, og DNA-proteinkomplekser ble forstyrret ved sonifisering til lengder på mellom 200 til 1000 bp. Lysater ble fortynnet 10 ganger med immunutfelling (IP)-fortynningsbuffer inneholdende proteaseinhibitorer. Antistoffer for c-MYC, MAD1 og MAD4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) ble anvendt for å utfelle kromatin, mens ytterligere prøve ble etterlatt som en minus-antistoff (-Ab)-kontroll. Prøver ble immunutfelt over natten ved 4 °C med rotasjon.

Immunkomplekser ble oppnådd ved å tilsette 60 µl DNA/protein A-agaroseslurry fra laksesperm og inkubere i en time ved 4 °C med rotasjon etterfulgt av forsiktig sentrifugering (1000 o/min, 1 min). Protein A-agarosepelletter ble vasket med lavsaltbuffer, høysaltbuffer, LiCl-buffer og TE-buffer. Kompleksene ble deretter eluert ved tilsetning av 250 µl elueringsbuffer (0,1 M NaHCO₃, 1 % SDS) to ganger, og DNA-proteinkryssbindinger ble reversert med 0,2 M NaCl ved oppvarming ved 65 °C i 4 timer for alle prøvene, inkludert input-DNA-et og -Ab DNA-kontrollene. DNA ble resuspendert i 30 µl ddH₂O. For visualisering av PCR-produkt og dets størrelse ble det utført standard PCR-reaksjoner. Sekvensene av ODC-primere som anvendes for PCR, var 5'-CCTGGGCGCTCTGAGGT-3' (SEQ ID NO:3) (17mer) og 5'-AGGAAGCGGCGCCTCAA-3' (SEQ ID NO:4) (17mer). Kvantitativ sanntids-PCR ble utført ved anvendelse av TaqMan-genekspresjonsassaykit (Applied Biosystems, Foster City, CA) på et ABI7700-sekvensdetekteringssystem. Detaljer for beregning av relativ binding finnes på produsentens nettsted (<http://www.appliedbiosystems.com/>).

Kortvarige transfeksjoner. Kortvarige transfeksjoner ble utført ved anvendelse av LipofectAMINE-reagens (Invitrogen, Carlsbad, CA) ifølge produsentens protokoll, som angitt i tilleggssfilen. HCT116- og HT29-celler ble transfektert med 1 µg pGL3-ODC/A- eller pGL3-ODC/G-plasmider (Martinez *et al.*, 2003) sammen med 0,01 µg Renilla-TK-plasmid. Renilla-TK-plasmidet ble kjøpt fra Promega (Madison, WI) og anvendt som transfeksjonseffektivitetskontroll i alle promoter-reporter-transfeksjonsforsøk. For *c-MYC*-forsøk ble ODC pGL3-plasmider kotransfektet med enten pcDNA 3,0 eller CMV-*c-MYC*-ekspresjonsvektor (OriGene, Rockville, MD). For *MAD1*-forsøk ble ODC-plasmidene kotransfektet med enten pcDNA 3,1 eller pcDNA-*MAD1*. For *c-MYC*- og *MAD1*-kotransfeksjon ble det fremstilt ODC-promoterreporterkonstruksjoner, som inneholder de første 1,6 Kb av ODC-genet klonet i en pGL3-vektor. Konstruksjonene inkludert E-boks 1 (-485 til -480 bp) intakte (vt E-boks 1) eller slettet (mut E-boks 1). Begge varianter av +316-ODC-SNP ble i tillegg anvendt, hvilket dannet i alt 4 forskjellige konstruksjoner. Etter 6 timer med inkubering ble celler supplert med komplett medium inneholdende 20 % FBS og dyrket over natten. Dagen etter transfeksjon ble 20 % FBS-holdig komplett medium erstattet med 10 % FBS-holdig medium. 48 timer etter transfeksjon ble celler vasket med PBS og lysert i passiv lysebuffer fra Dual Luciferase Assay-kitet (Promega, Madison, WI). Dobbelte luciferaseaktiviteter ble målt ved anvendelse av et Turner Designs TD-20/20 luminometer, som

beskrevet av produsenten, og presentert som relative luciferaseenheter (RLU). Forsøk ble utført i triplikater og gjentatt minst 2 ganger.

Statistisk analyse – forsøksstudier. For kortvarige transfeksjonsforsøk ble det anvendt toprøvers t-tester (Microsoft Excel Microsoft Corp., Redmond, WA). Effekten av *c-MYC*-ekspresjon på ODC-allelspesifikk promoteraktivitet ble undersøkt i HT29-tykktarmcancerceller ved anvendelse av ODC-promoterkonstruksjoner som skiller seg ved nærvær av det første E-boks-elementet: (a) villtype (vt) E-boks 1+316 G, (b) mutant (mut) E-boks 1 + 316 G, (c) vt E-boks 1 + 316 A, og (d) mut E-boks 1 + 316 A. For hver promoterkonstruksjon ble det anvendt toprøvers t-tester for å sammenligne promoteraktivitet mellom celler kotransfektet med pcDNA3.0-plasmid sammenlignet med dem transfektet med CMV-*c-MYC*-ekspresjonsvektoren. For å undersøke effekten av *MAD1*-ekspresjon på ODC-allelspesifikk promoteraktivitet ble toprøvers t-tester imidlertid anvendt for å sammenligne effekten av promoteraktivitet i promoterkonstruksjoner kotransfektet med pcDNA3.1-plasmid sammenlignet med dem transfektet med pcDNA-*MAD1*-plasmid. Statistisk signifikans ble antatt for en 2-halet P-verdi $< 0,05$.

Eksempel 3 – Differensielle effekter av ODC1-genotype

Denne studien involverer analyse av pasientdata fra fase III-multisenterutprøving for tykktarmadenomforebygging (Meyskens *et al.*, 2008). 375 pasienter ble registrert, og studien ble stoppet av det uavhengige overvåkningspanelet for datasikkerhet (DSMB) etter at 267 pasienter hadde fullført studiesluttkolonoskopi (idet studien nådde sitt effektendepunkt). DSMB overvåket alle sikkerhet- og effektendepunkter. Blodprøver ble tatt fra 228 samtykkende studiepasienter for genotypeanalyse etter november 2002 (inkludert 159 av 246 pasienter randomisert før, og 69 av 129 pasienter randomisert etter denne datoen) da protokollen ble modifisert i lys av data som viste betydningen av *ODC1*-SNP (2). *ODC1* (rs2302615)-genotyping ble utført på pasientavledet genomisk DNA ved anvendelse av allelspesifikke TaqMan-prober som beskrevet tidligere (Guo *et al.*, 2000). Rektalvevspolyamininnhold ble bestemt som beskrevet tidligere (Meyskens *et al.*, 1998; Seiler og Knodgen, 1980) ved anvendelse av 3 av 8 tilfeldig valgte rektale mukosale biopsiprøver. Vevspolyaminrespons ble utført for responsverdier fra 25 % til 45 %.

ODC1-genotype ble analysert under en dominerende modell: AA/GA-sammenlignet med GG-pasienter. Wilcoxon Rank Sums-tester ble utført på unormalt fordelte kontinuerlige variabler over to genotypegrupper. Kjikvadrattester eller Fishers nøyaktighetstest ble benyttet for å vurdere assosiasjonen mellom kategoriske baselinevariabler og genotypegruppe. Binomial log-regresjon ble utført på det primære utfallet (adenomrekurrens) med prediktorer: behandlingsgruppe, alder, kjønn, rase (hvit sammenlignet med andre), aspirinanvendelse, *ODC1*-genotype (i den dominerende modellen) og en betegnelse som representerer behandlingen etter genotypeinteraksjon. For sekundære utfall (rektalvevpolyaminrespons, toksisitet) ble effektene av behandlingsgruppe, genotype og interaksjon mellom behandling og genotype undersøkt ved anvendelse av fulle binomiale log-modeller. Statistiske analyserer ble utført ved anvendelse av SAS 9.2 statistisk programvare (SAS Inc., Cary, NC). Pasienter signerte informert samtykke for inkludering i utprøving og prøvetaking/-analyse. Studien ble godkjent etter full komitégjennomgåelse av UC Irvine institutional review board (IRB-protokoll nr. 2002–2261) og gjennomgåelse av hver av de lokale IRB-ene ved deltagende studiesteder.

ODC1-genotypefordeling var: 126 GG (55 %), 87 GA (38 %) og 15 AA (7 %). Kliniske baselinekarakteristika viste forskjeller, som vist i tabell 1. Den relative risikoen (RR) for adenomrekurrens knyttet til behandling etter justering i den fulle regresjonsmodellen var 0,39 (95 % CI 0,24–0,66). Blant pasienter som mottok henholdsvis placebo eller behandling, forekom ototoksitet hos 23 % sammenlignet med 22 % av *ODC1*-GG-pasienter, 20 % sammenlignet med 21 % av *ODC1*-GA-pasienter og 0 % (0 av 7) sammenlignet med 57 % (4 av 7) av *ODC1*-AA-pasienter.

Tabell 1. Kliniske karakteristika for alle individer ved baseline (n=228) ved *ODC1*-genotype.

	<i>ODC1</i> -AA/GA-genotype (n = 102)	<i>ODC1</i> -GG-genotype (n=126)	<i>p</i> *
Middelalder (år ± standardavvik)	60,2 ±8,4 SD	62,6 ±8,7 SD	0,024 [†]
Kjønn (n, %)			
Mann	77 (75 %)	96 (76 %)	0,90
Kvinne	25 (25 %)	30 (24 %)	

	<i>ODC1</i> -AA/GA-genotype (n = 102)	<i>ODC1</i> -GG-genotype (n=126)	<i>p</i> *
Rase (n, %)			
Hvit	84 (82 %)	107 (85 %)	0,007 [‡]
Svart	3 (3 %)	4 (3 %)	
Latinamerikansk	4 (4 %)	12 (10 %)	
Asiatisk	9 (9 %)	1 (1 %)	
Andre	2 (2 %)	2 (2 %)	
Behandlingsgruppe (n, %)			
Eflornitin + sulindak	46 (45 %)	71 (56 %)	0,09
Placebo	56 (55 %)	55 (44 %)	
Anvendelse av lavdoseaspirin (n, %)			
Ja	44 (43 %)	54 (43 %)	0,97
Nei	58 (57 %)	72 (57 %)	
Mediannr. (med minimum-maksimum)	2,00 (1,11)	2,00 (1,16)	0,41 [†]
Sted for største tidligere polypp (n, %)			
Rektum	26 (25 %)	23 (18 %)	0,19
Tykkttarm	76 (75 %)	103 (82 %)	
Tidligere polypphistologi (n, %)			
Tubulært	76 (75 %)	99 (79 %)	0,03 [‡]
Adenom-NOS	6 (6 %)	8 (6 %)	
Tubulovilløs	10 (10 %)	17 (13 %)	
Villøst	7 (7 %)	1 (1 %)	
Karsinom in-situ	3 (3 %)	0 (0 %)	
Tubulært adenom, høygradig	0 (0 %)	1 (1 %)	

	<i>ODC1</i> -AA/GA-genotype (n = 102)	<i>ODC1</i> -GG-genotype (n=126)	<i>p</i> *
Dysplasi			
Største polypp ≥ 1 cm (n, %)	25 (25 %)	40 (32 %)	0,23
Behandling gitt for tidligere polypp (n, %)	92 (90 %)	117 (93 %)	0,47
Kirurgi for komplett endoskopisk fjerning	10 (10 %)	9 (7 %)	
Baselinevevspolyamininnhold [§]			
(median, nmol/mg protein, område)			
Putrescin	0,47 (0,01–4,60)	0,56 (0,01–5,29)	0,48 [†]
Spermidin	1,99 (0,76–9,18)	2,17 (1,05–8,97)	0,08 [†]
Spermin	6,82 (2,29–19,86)	7,29 (2,72–22,85)	0,23 [†]
Spermidin/spermin-forhold	0,30 (0,19–0,98)	0,31 (0,19–0,76)	0,23 [†]
*<i>p</i>-verdi for χ^2-testen er anført med mindre annet er angitt. [†]<i>p</i>-verdi for Wilcoxon Rank Sums-testen. [‡]<i>p</i>-verdi for Fishers nøyaktighetstesten. [§]Vevspolyamindata mangler for 1 individ med <i>ODC1</i>-GG-genotype og 1 individ med <i>ODC1</i>-AA/GA-genotype			

Tabell 2. Multivariatanalyse av samlet overlevelse og kolorektalcancerspesifikk overlevelse for kolorektalcancertilfeller basert på *ODC1*-genotype.

	<i>ODC1</i> -genotype		<i>P</i>
	GG	GA/AA	
Samlet dødelighet			
Antall hendelser	47	62	

	ODC1-genotype		P
	GG	GA/AA	
Antall utsatt for risiko	208	192	
Ikke-justert HR (95 % CI)	1 (referanse)	1,57 (1,07–2,29)	0,020
Justert HR (95 % CI)*	1 (referanse)	1,58 (1,07–2,34)	0,021
CRC-spesifikk dødelighet			
Antall hendelser	22	37	
Antall utsatt for risiko	208	192	
Ikke-justert HR (95 % CI)	1 (referanse)	1,97 (1,16–3,34)	0,012
Justert HR (95 % CI)*	1 (referanse)	2,02 (1,17–3,50)	0,012
Forkortelse: 95 % CI, 95 % konfidensintervall.			
*Inkluderer stratifisering for stadie (I, II, III) og justering for alder (y), kjønn, etnisitet, tidligere kolorektal cancer i familien, TNM-stadie ved diagnose, tumorsted i kolorektum, histologisk undertype, behandling med kirurgi, strålingsterapi og kjemoterapi.			

Tabell 3. Insidens av hendelser etter randomisering og stratifisering av ODC1-genotype (dominerende modell).

	Placebo (n = 111)		Eflornitin/sulindak (n = 117)		P*
	<i>ODC1</i> -GG	<i>ODC1</i> -GA eller -AA	<i>ODC1</i> -GG	<i>ODC1</i> -GA eller -AA	
Eventuelt adenomrekurrens	22/44 (50)	18/53 (34)	7/64 (11)	9/42 (21)	< 0,0001
Eventuell bivirkning – ant. pasienter med bivirkninger (%)					
Kardiovaskulære hendelser [†] ant. pasienter (%)	8/55 (15)	8/56 (14)	13/71 (18)	9/46 (20)	0,30
Gastrointestinale	4/55	8/56	9/71 (13)	7/46 (15)	0,54

	Placebo (n = 111)		Eflornitin/sulindak (n = 117)		P*
	<i>ODC1</i> -GG	<i>ODC1</i> -GA eller -AA	<i>ODC1</i> -GG	<i>ODC1</i> -GA eller -AA	
hendelser [†] , ant. pasienter (%)	(7)	(14)			
Hørselstap minst 15 dB ved ≥ 2 frekvenser, ant. pasienter (%)	10/44 (23)	9/52 (17)	14/63 (22)	11/41 (27)	0,26

*P-verdi for sannsynlighetsforholdstest for behandlingseffekt (eflornitin og sulindak sammenlignet med placebo) på adenomrekurrens i den fulle modellen, hvilket inkluderer alder, kjønn, rase/etnisitet, aspirinanvendelse, behandling, genotype og behandlings- og genotypeinteraksjon som kovariater. En statistisk signifikant interaksjon ble detektert i den fulle modellen for adenomrekurrens ($P = 0,038$); ingen interaksjon ble detektert for kardiovaskulær toksisitet, gastrointestinal toksisitet eller ototoksitet.

[†]Kardiovaskulære hendelser inkludert koronararteriesykdom, myokardialt infarkt, cerebrovaskulær hendelse, kongestiv hjertesvikt og brystsmerte.

[‡]Gastrointestinale hendelser inkludert gastrointestinal blødning (fra hvilken som helst region) slik som rektal blødning, øvre gastrointestinal blødning, hematokesi eller okkult blod i avføringen.

Tabell 4. Effekt og bivirkninger og *ODC1*+316-SNP.

	Placebo (N = 111)			DFMO/sulindak (N = 117)			<i>P</i>
	<i>ODC</i> GG (N = 55)	<i>ODC</i> GA (N = 48)	<i>ODC</i> AA (N=8)	<i>ODC</i> GG (N = 71)	<i>ODC</i> GA (N = 39)	<i>ODC</i> AA (N=7)	
Eventuelt adenomrekurrens (%)	22/44 (50)	(35)	(29)	7/64 (11)	(14)	(57)	< 0,0001
Kardiovaskulære hendelser antall pasienter (%)a	8/55 (15)	7/48 (15)	1/8 (13)	13/71 (18)	7/39 (18)	2/7 (29)	0,37
Gastrointestinale	4/55	8/48	0/8 (0)	9/71	5/39	2/7	0,45

	Placebo (N = 111)			DFMO/sulindak (N = 117)			<i>p</i>
	<i>ODC</i> <i>GG</i> (N = 55)	<i>ODC</i> <i>GA</i> (N = 48)	<i>ODC</i> <i>AA</i> (N=8)	<i>ODC</i> <i>GG</i> (N = 71)	<i>ODC</i> <i>GA</i> (N = 39)	<i>ODC</i> <i>AA</i> (N=7)	
hendelser antall pasienter (%) ^b	(7)	(17)		(13)	(13)	(29)	
Hørselestap minst 15 dB ved > 2 frekvenser, ant. pasienter (%) ^c	10/44 (23)	9/45 (20)	0/8 (0)	14/63 (22)	7/34 (21)	4/7 (57)	0,020

Litteraturliste

- 5 U.S. Patent. 3,647,858
U.S. Patent. 3,654,349
U.S. Patent. 4,330,559
U.S. Patent. 4,413,141
U.S. Patent. 4,582,788
- 10 U.S. Patent. 4,656,127
U.S. Patent. 4,683,194
U.S. Patent. 4,683,202
U.S. Patent. 5,814,625
U.S. Patent. 5,843,929
- 15 U.S. Patent. 5,952,174
U.S. Patent. 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.
- 20 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
- 5 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.
- 10 European Appln. 201,184
- European Appln. 237,362
- European Appln. 258,017
- European Appln. 50,424
- European Appln. 84,796
- 15 French Appln. 2,650,840
- Fultz and Gerner, Mol. Carcinog., 34:10-8, 2002.
- Gerner and Meyskens, Nature Rev. Cancer, 4:781-92., 2004.
- Gerner et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 3:325-330, 1994.
- Giardiello et al., Cancer Res., (57):199-201, 1997.
- 20 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.
- 25 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 and Cardon Bioinformatics, 19(2):287-288, 2003.
- Keller and 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 and Chen, *Curr Issues Mol. Biol.*, Apr;5(2):43-60, 2003.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 Lu et al., *Eukaryot Cell.*, 3(6):1544-56, 2004.
- Luk and 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.
- 20 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.
- 25 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 and Moustakas, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1775:21-62, 2007.
- PCT Appln. WO91/02087
- PCT Appln. WO92/15712
- 5 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.
- 10 Piazza et al., *Cancer Res.*, (57):2452-2459, 1997a.
- Piazza et al., *Cancer Res.*, (57):2909-2915, 1997b.
- Pollard and Luckert, *Cancer Res.*, 49:6471-6473, 1989.
- Prezant et al., *Hum. Mutat.*, 1:159-164, 1992.
- Psaty and Potter, *N. Engl. J. Med.*, 355(9):950-2, 2006.
- 15 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 and Wakefield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:8621-3, 2003.
- 20 Sanger et al., *J. Molec. Biol.*, 94:441, 1975.
- Seiler and 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 and Reddy, *Annals. NY Acad. Sci.*, (768):205-209, 1995.
- 25 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.
- 30 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 and Thomas, *J Cell Mol. Med.*, 7:113-26, 2003.
- 5 Thompson et al., *J Natl. Cancer Inst.*, (87):125-1260, 1995.
- Ugozzoli et al., *GATA* 9:107-112, 1992.
- Vane and 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.
- 10 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 and Anton-Culver, *Am. J Prev. Med.*, 24:190-8, 2003.

Patentkrav

1. Sammensetning, omfattende α -difluormetylnitritin (DFMO) og et ikke-aspirinholdig ikke-steroid antiinflammatorisk legemiddel (NSAID) for anvendelse i den forebyggende eller kurerende behandlingen av kolorektalt karsinom eller risikofaktorer for det hos en pasient;

hvor pasientens genotype ved posisjon +316 for minst ett *ODC1*-promotergenallel er G; og

hvor behandling av risikofaktorer for kolorektalt karsinom hos pasienten forhindrer dannelse av nye aberrante kryptfokus, nye adenomatøse polypper eller nye adenomer med dysplasi hos pasienten; eventuelt hvor pasienten er et menneske.

2. Sammensetning, omfattende α -difluormetylnitritin (DFMO) for anvendelse i den forebyggende eller kurerende behandlingen av kolorektalt karsinom eller risikofaktorer for det ifølge krav 1 hos en pasient ifølge krav 1;

hvor pasienten også administreres en sammensetning omfattende et ikke-aspirinholdig ikke-steroid antiinflammatorisk legemiddel (NSAID), idet pasienten administreres sammensetningen omfattende det ikke-aspirinholdige NSAID-et før, samtidig med eller etter administrering av sammensetningen omfattende DFMO.

3. Sammensetning, omfattende et ikke-aspirinholdig ikke-steroid antiinflammatorisk legemiddel (NSAID) for anvendelse i den forebyggende eller kurerende behandlingen av kolorektalt karsinom eller risikofaktorer for det ifølge krav 1 hos en pasient ifølge krav 1;

hvor pasienten også administreres en sammensetning omfattende α -difluormetylnitritin (DFMO), idet pasienten administreres sammensetningen omfattende DFMO før, samtidig med eller etter administrering av sammensetningen omfattende det ikke-aspirinholdige NSAID-et.

4. Sammensetningen for anvendelse ifølge hvilke som helst av kravene 1–3, hvor pasientens genotype bestemmes ved å motta en rapport inneholdende genotypen eller ved å skrive ned en pasienthistorikk som viser resultatene; eller ved å bestemme nukleotidbasen ved posisjon +316 for ett allel av pasientens *ODC1*-promotergen; eller ved å bestemme nukleotidbasen ved posisjon +316 for begge allelene av pasientens *ODC1*-promotergen.

- 5.** Sammensetningen for anvendelse ifølge hvilke som helst av kravene 1–3, hvori pasientens genotype ved posisjon +316 for begge allelene av *ODC1*-promotergen er GG eller GA.
- 5 **6.** Sammensetningen for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1–5, hvori pasienten, før pasientens genotype er bestemt, allerede ble behandlet med en sammensetning omfattende DMFO og/eller et ikke-aspirinholdig NSAID, men ved en lavere dosering av DMFO og/eller det ikke-aspirinholdige NSAID-et.
- 10 **7.** Sammensetningen for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6, hvori det ikke-aspirinholdige NSAID-et er valgt fra gruppen bestående av en selektiv COX-2-inhibitor, sulindak og celekoksib.
- 15 **8.** Sammensetningen for anvendelse ifølge hvilke som helst av kravene 1–7, hvori det ikke-aspirinholdige NSAID-et er sulindak, og hvori
- (i) DFMO administreres oralt, eventuelt hvori den virkningsfulle mengden av DFMO er 500 mg/dag;
- (ii) DFMO administreres intravenøst, eventuelt hvori den virkningsfulle mengden av DFMO er fra 0,05 til 5,0 g/m²/dag; eller
- 20 (iii) DFMO administreres minst en andre gang.
- 9.** Sammensetningen for anvendelse ifølge hvilke som helst av kravene 1–7, hvori det ikke-aspirinholdige NSAID-et er sulindak, og hvori den virkningsfulle mengden av sulindak er fra 10 til 1500 mg/dag, slik som fra 10 til 400 mg/dag, eller slik som 150 mg/dag; eller hvori sulindak administreres minst en andre gang.
- 25 **10.** Sammensetningen for anvendelse ifølge hvilke som helst av kravene 1–7, hvori pasienten har en fast tumor, og den faste tumoren er resektet.
- 30 **11.** Sammensetningen for anvendelse ifølge hvilke som helst av kravene 1–10, hvori den kolorektale canceren er stadie I eller stadie II eller stadie III eller stadie IV.
- 35 **12.** Sammensetningen for anvendelse ifølge hvilke som helst av kravene 1–11, hvori behandlingen forhindrer dannelse av nye fremskredne kolorektale

neoplasmer (f.eks. nye høyresidige fremskredne kolorektale neoplasmer eller nye venstresidige fremskredne kolorektale neoplasmer) hos pasienten, eller behandlingen forhindrer ototoksisitet eller risikoen for det hos pasienten.

5 **13.** Sammensetningen for anvendelse ifølge hvilke som helst av kravene 1–12, hvori pasienten er identifisert å ha

(i) én eller flere adenomatøse polypper i tykktarm, rektum eller blindtarm;

(ii) én eller flere fremskredne kolorektale neoplasmer; eller

(iii) en diagnose av familiær adenomatøs polypose.

10

14. Sammensetningen for anvendelse ifølge hvilke som helst av kravene 1–13, hvori pasienten har tidligere reseksjon av ett eller flere kolorektale adenomer.

SEKVENSLISTE

<110> GERNER, EUGENE

ZELL, JASON

MCLAREN, CHRISTINE

MEYSKENS, FRANK

ANTON-CULBER, HODA

THOMPSON, PATRICIA A.

<120> CARCINOMA DIAGNOSIS AND TREATMENT, BASED ON ODC1 GENOTYPE

<130> CAPP:006WO

<140> UNKNOWN

<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 version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer

<400> 1

tctgcgcttc cccatggggc t 21

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer

<400> 2

tttccaacc cttcg 15

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer

<400> 3

cctgggcgct ctgaggt 17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer

<400> 4

aggaagcggc gcctcaa 17

<210> 5

<211> 42

<212> DNA

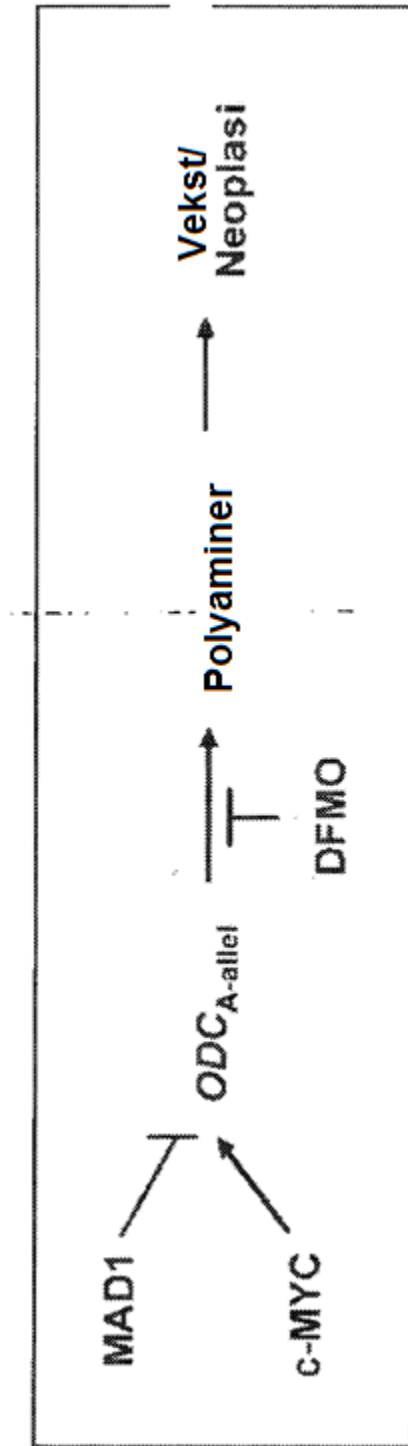
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer

<400> 5

gcacgtgtgc ggcgcgcctc gccggcctgc ggagacacgt gg 42

**FIG. 1**

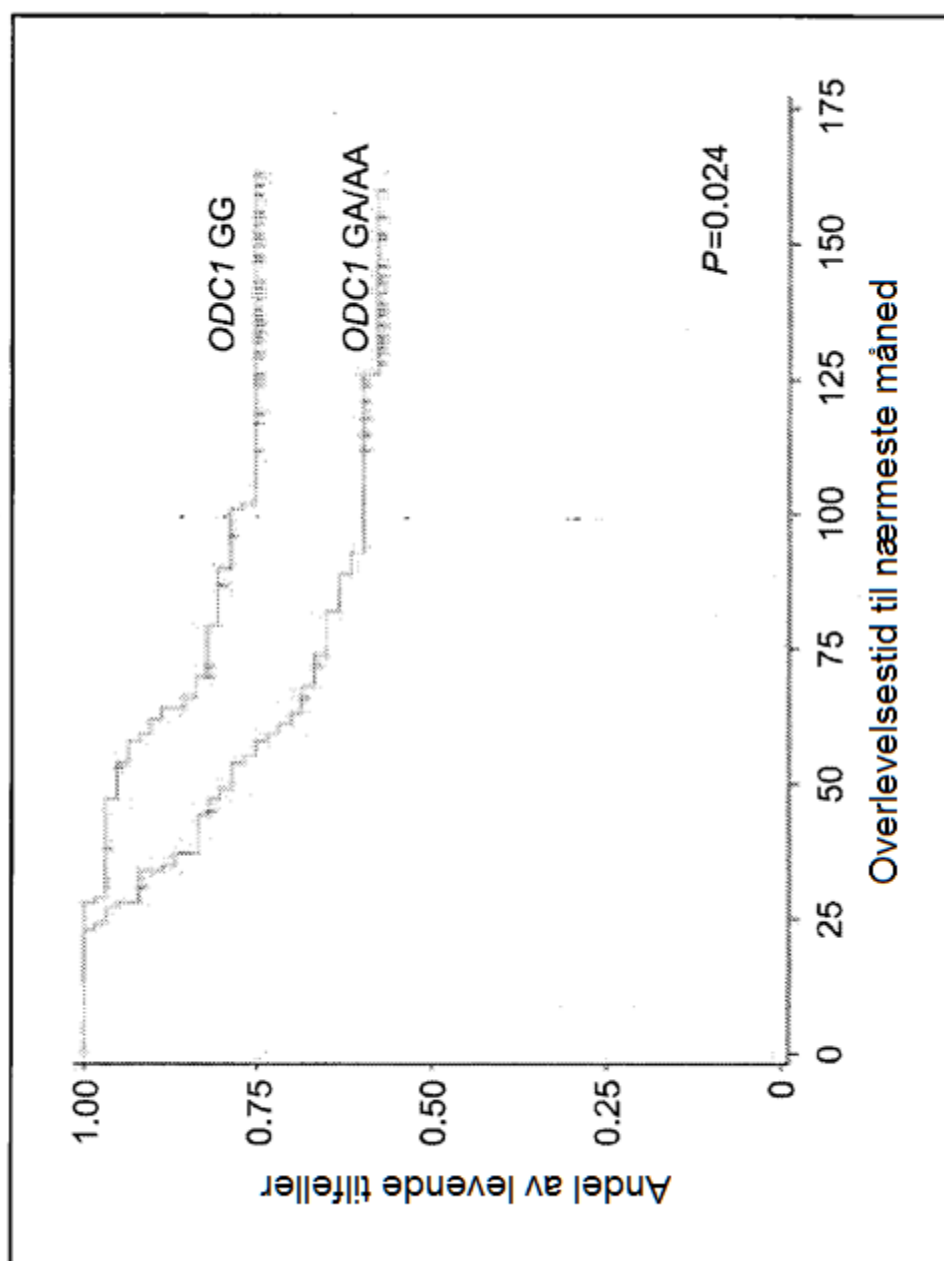
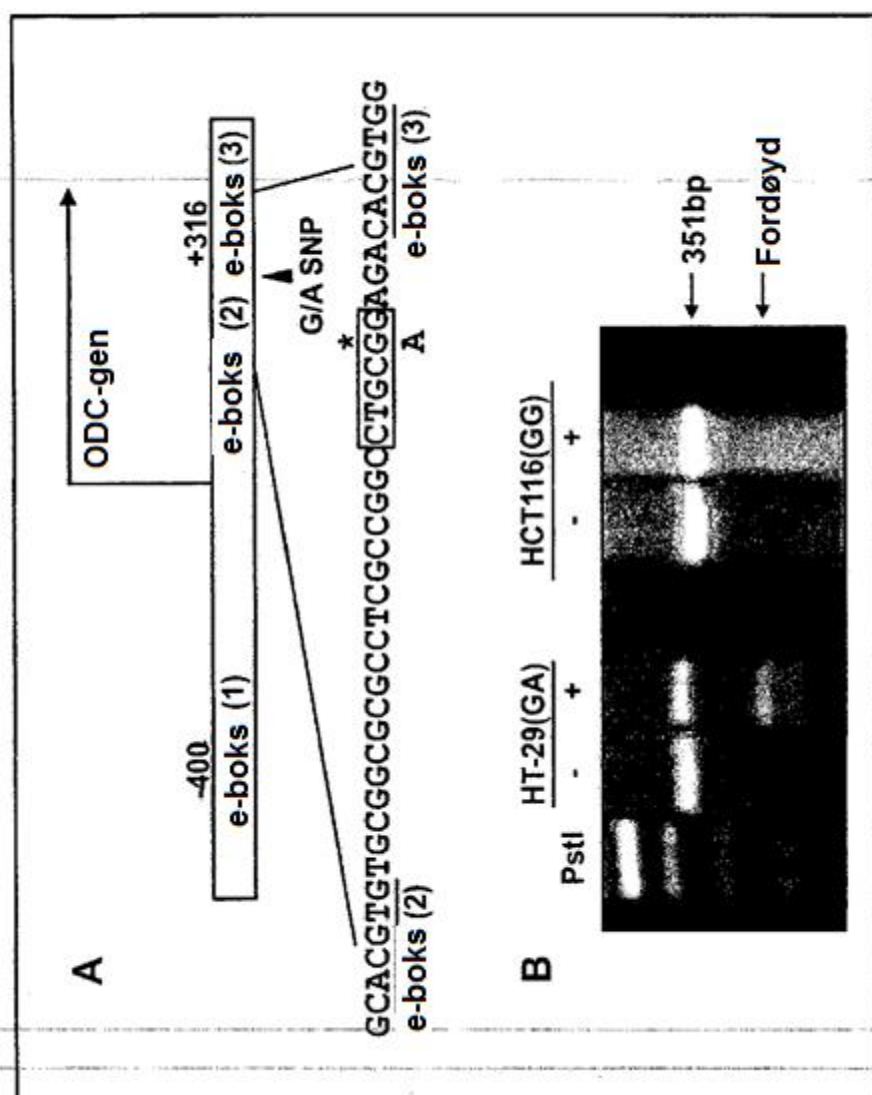


FIG. 2



FIGS. 3A & B

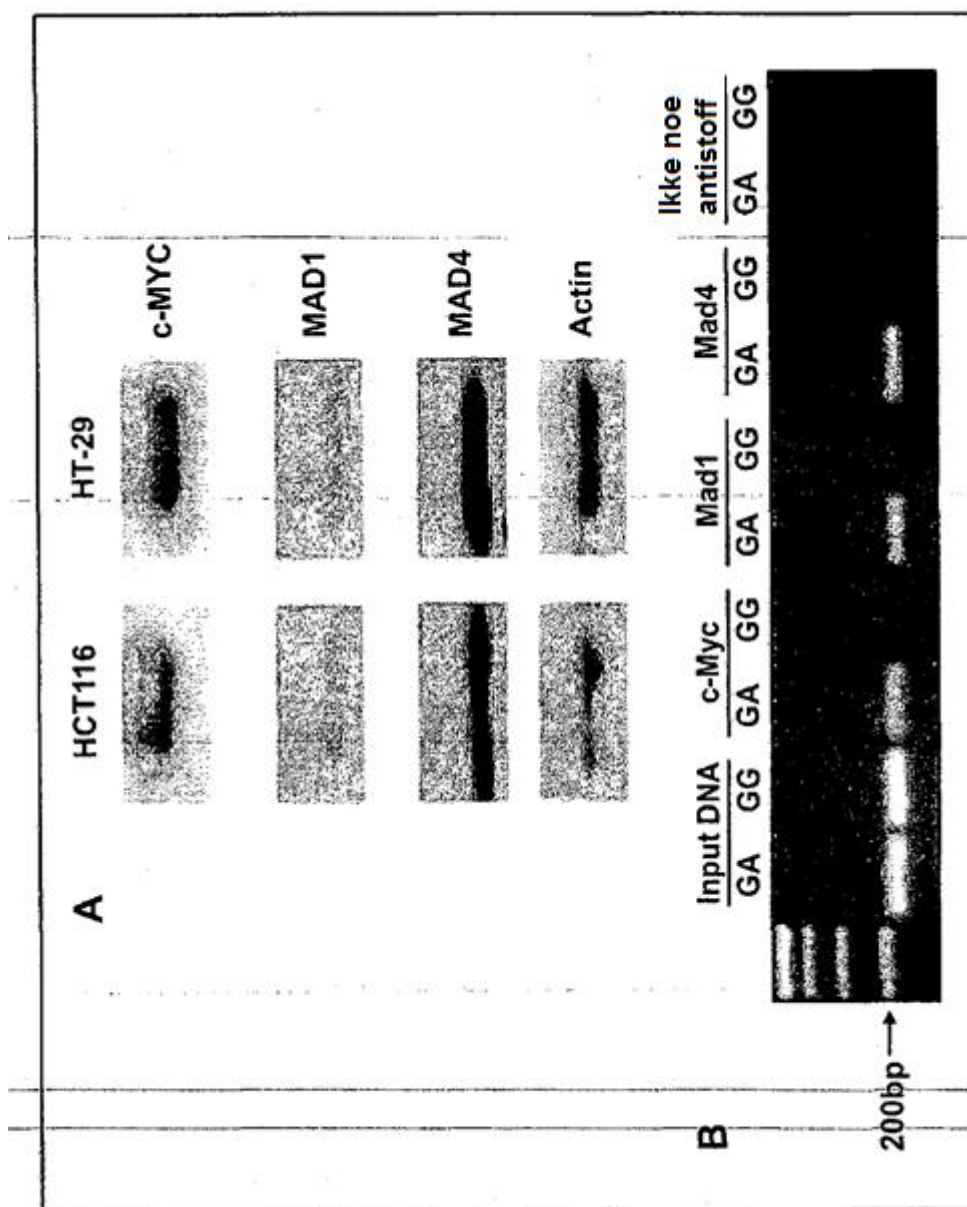


FIG 4A & B

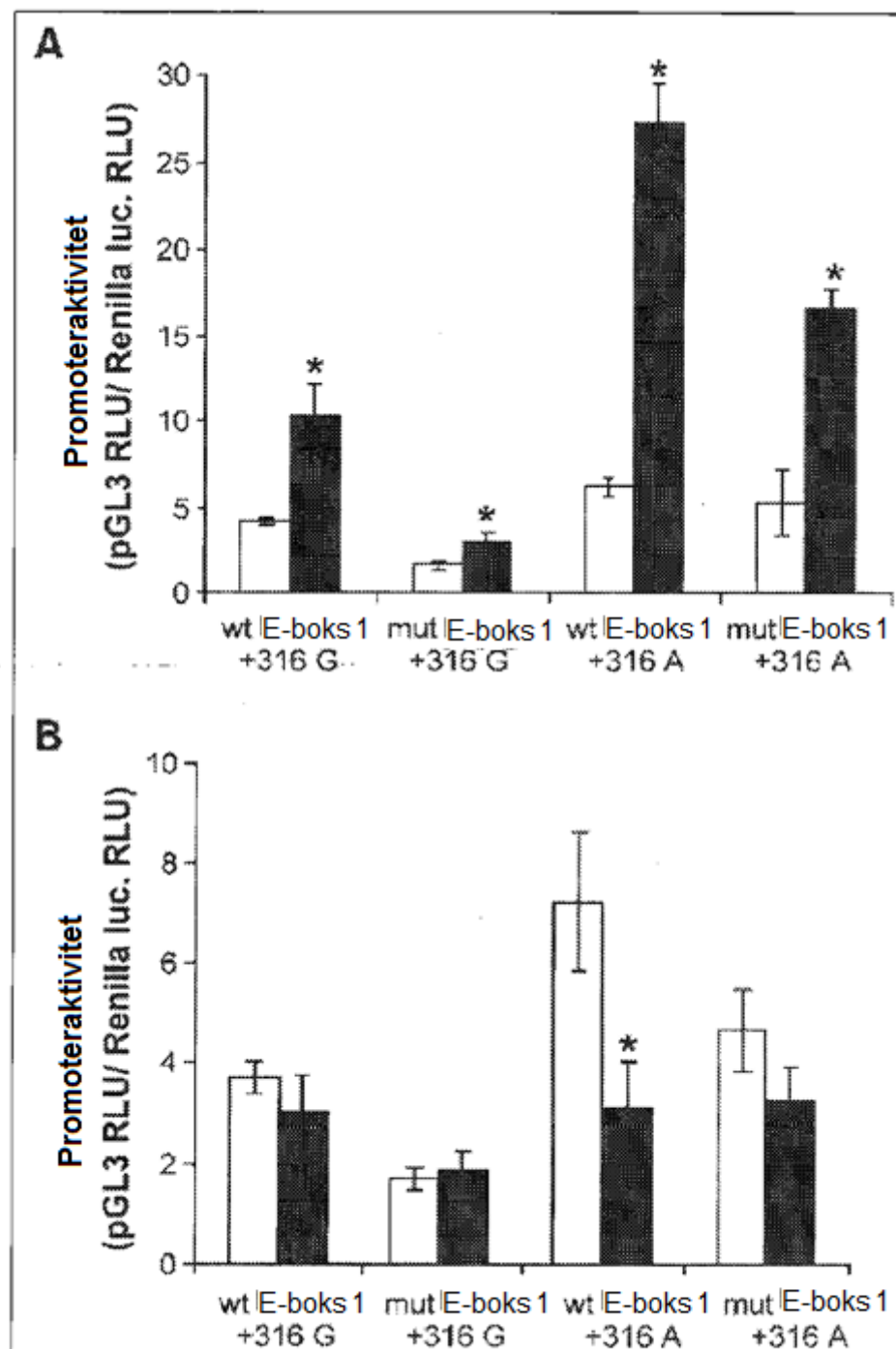


FIG 5A & B

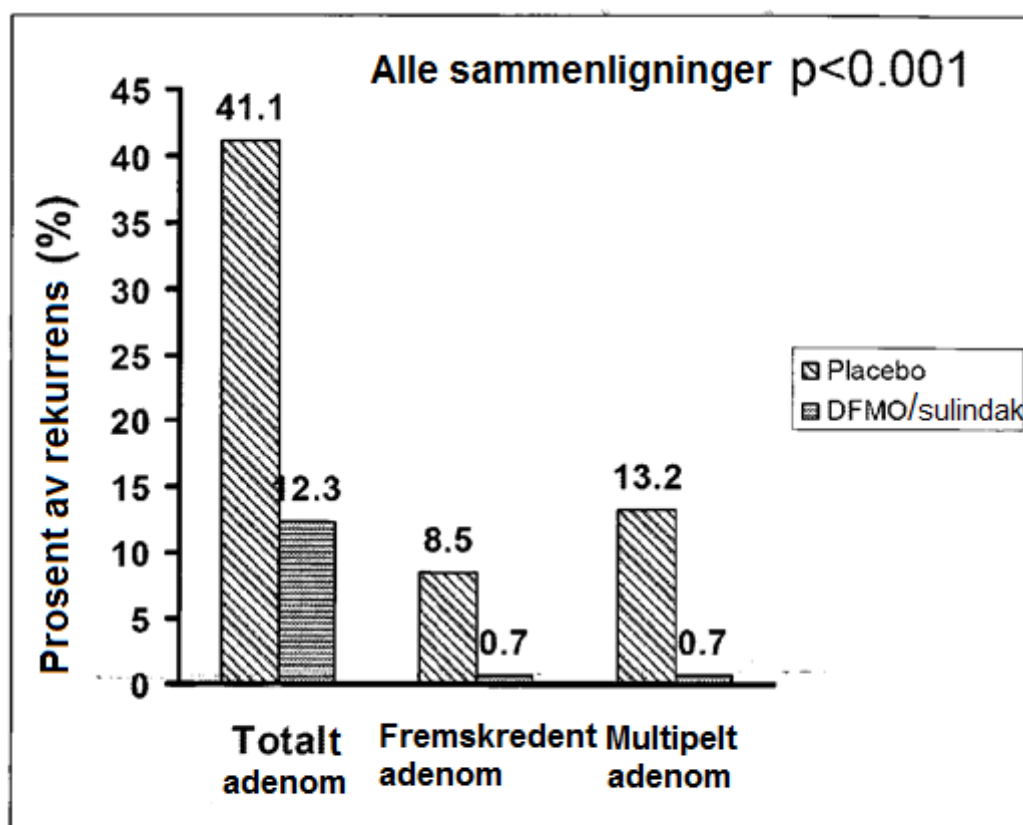


FIG. 6

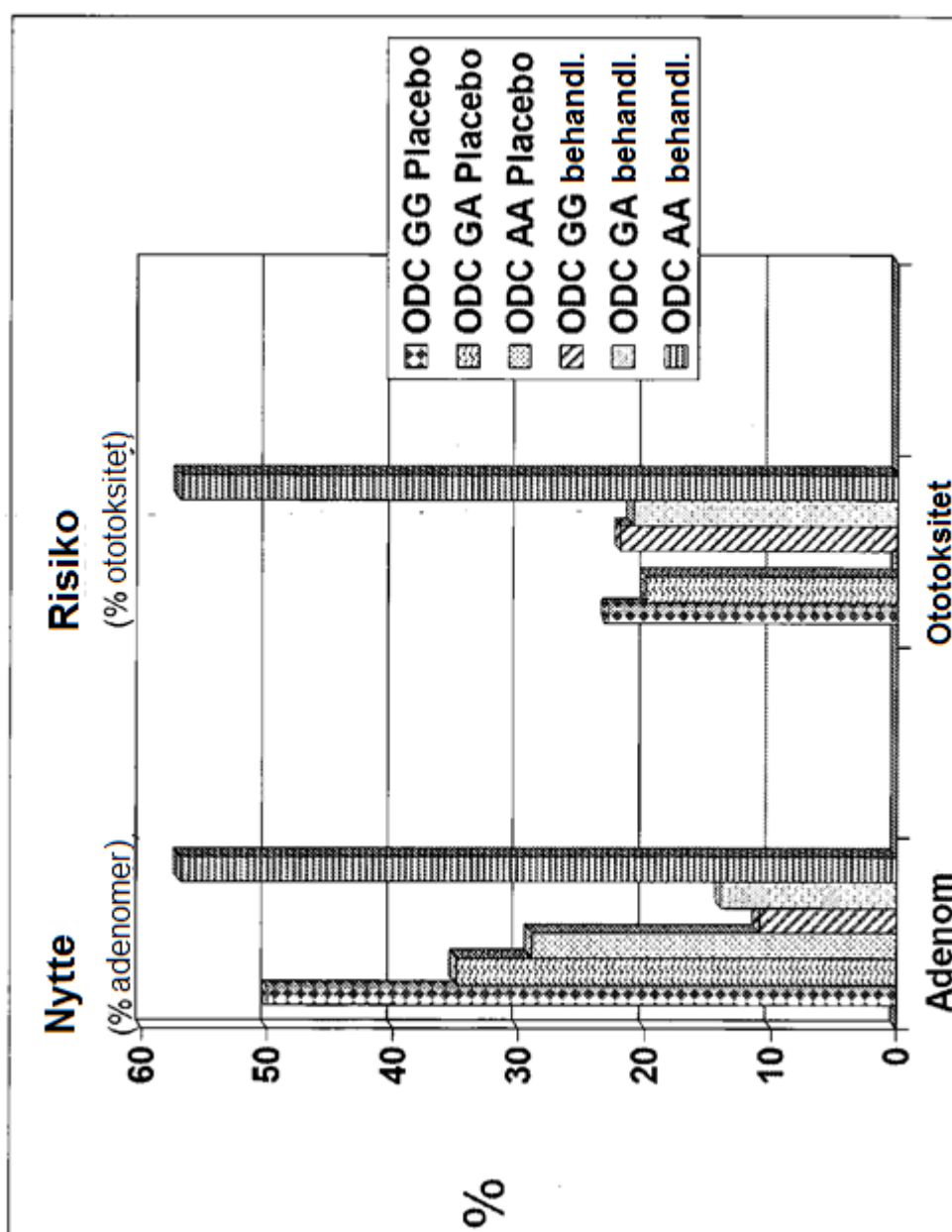
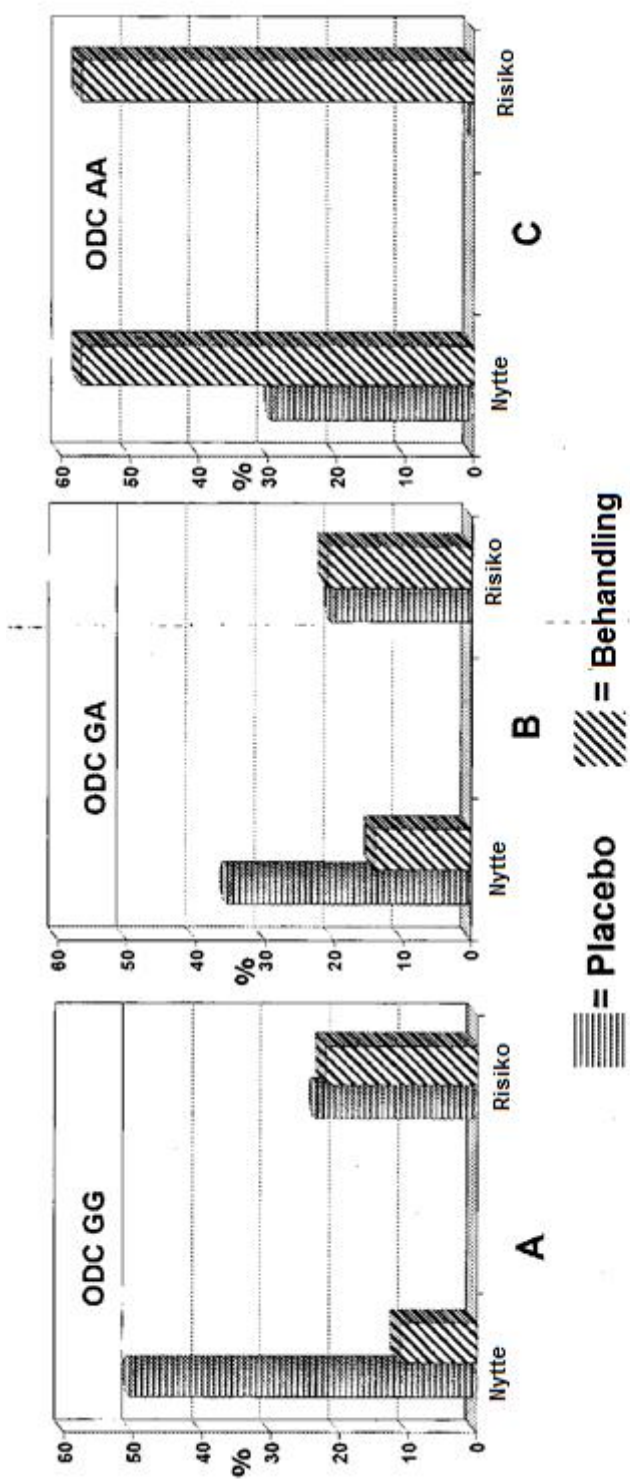


FIG. 7



FIGS. 8A-C

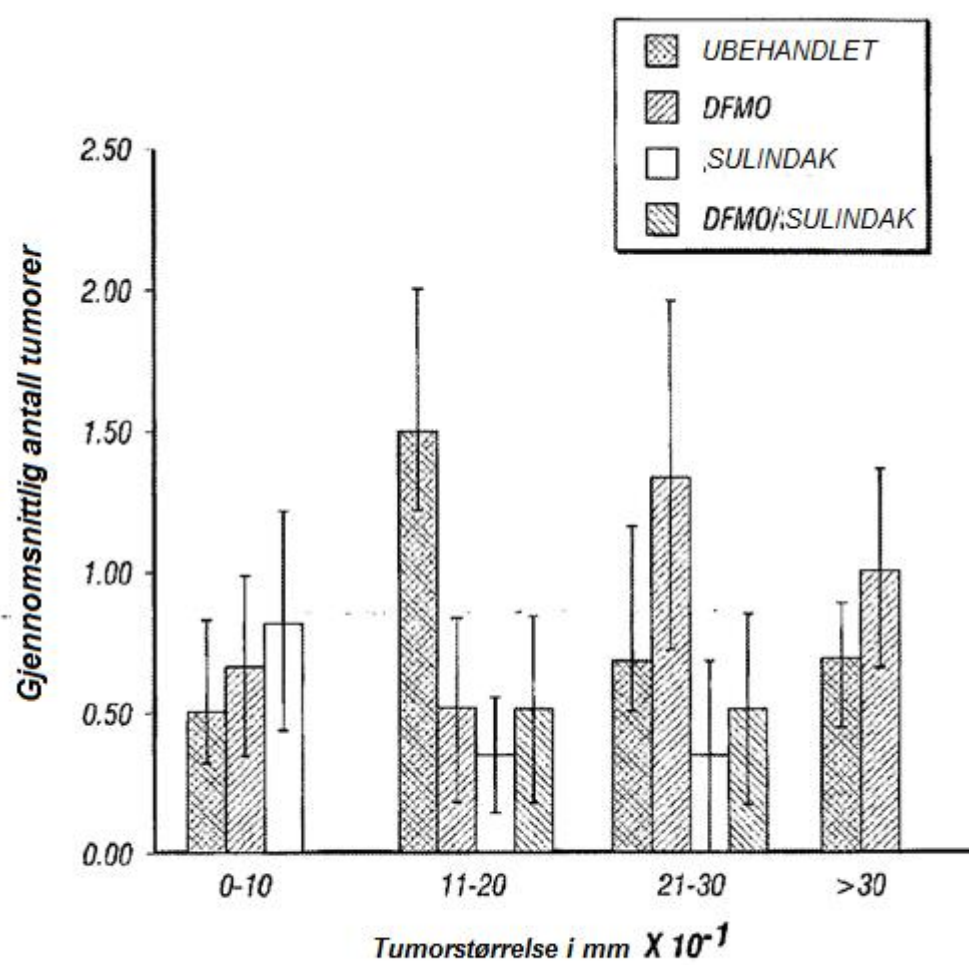


FIG. 9

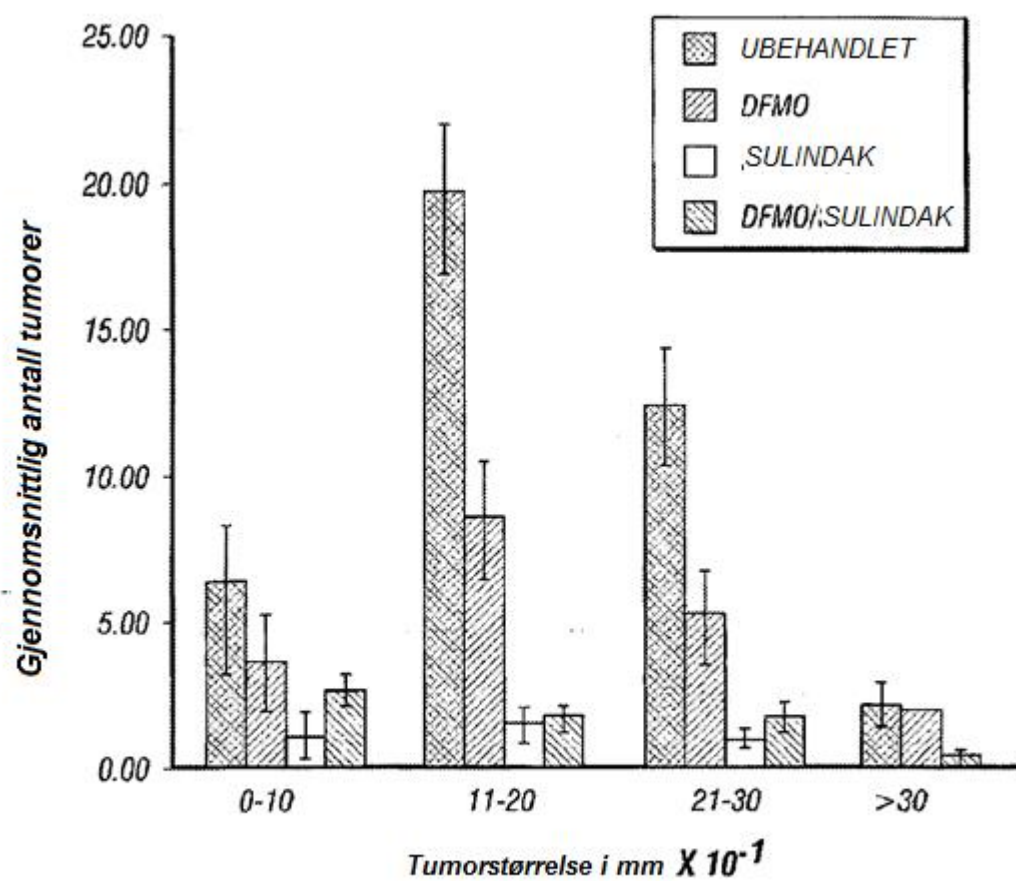


FIG. 10

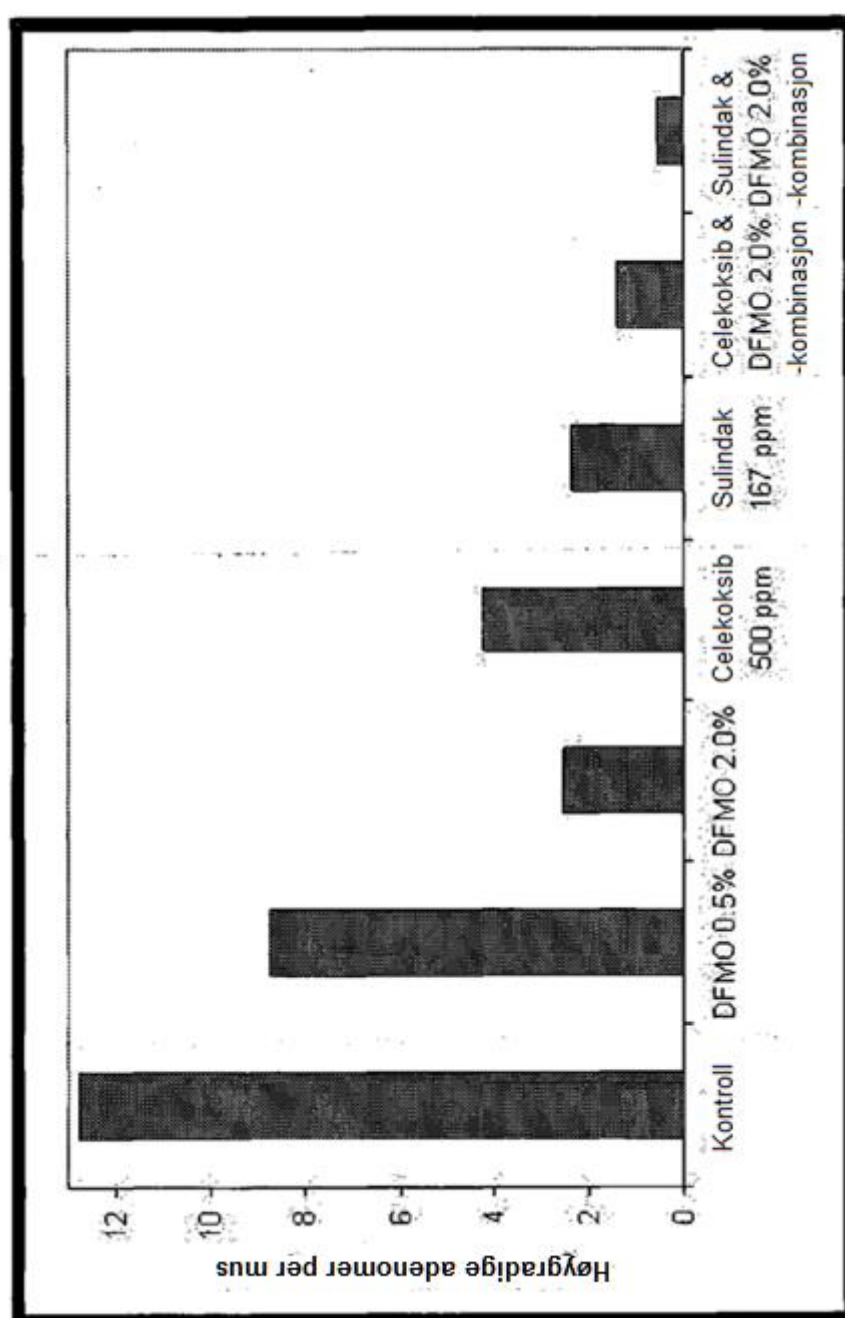


FIG. 11