

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 111**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**A61K 35/76** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2011** **E 11746432 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016** **EP 2564201**

54 Título: **Método de diagnóstico para predicción de la respuesta de un paciente a la quimioviroterapia o radioviroterapia**

30 Prioridad:

**30.04.2010 EP 10004592**

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

**24.05.2016**

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM,  
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (33.3%)  
Im Neuenheimer Feld 280  
69120 Heidelberg, DE;  
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG  
(33.3%) y  
UNIVERSITÄTSKLINIKUM HEIDELBERG (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GIESE, NATHALIA;  
WERNER, JENS;  
BÜCHLER, MARKUS;  
GIESE, THOMAS;  
DÄFFLER, LAURENT;  
CZIEPLUCH, CELINA;  
ROMMELAERE, JEAN y  
RAYKOV, ZAHARI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 571 111 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico para predicción de la respuesta de un paciente a la quimioviroterapia o radioviroterapia

5 La presente invención se refiere a un método de diagnóstico para predicción de la respuesta de un paciente a la quimioviroterapia o radioterapia, que comprende exponer células de tumor primario de un paciente a (a) un parvovirus y/o (b) un agente quimioterapéutico o radioterapia, y determinar la reducción de la expresión o concentración de ISG15 (gen estimulado por interferón).

10 El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos después de la enfermedad cardiovascular. Uno de cada 3 americanos desarrollará cáncer a lo largo de la vida de él o de ella, y uno de cada 4 americanos morirá de cáncer. Los gliomas humanos malignos dan cuenta del mayor número de tumores cerebrales humanos malignos. Hasta ahora, el tratamiento de los gliomas incluye técnicas neuroquirúrgicas (procedimientos de resección o estereotácticos), terapia de radiación y quimioterapia. Sin embargo, a pesar de estas terapias los gliomas están considerados como incurables dado que los mismos no responden a la radiación ionizante, la quimioterapia y la resección quirúrgica. Dicho de otro modo, con estas terapias puede conseguirse únicamente una prolongación muy limitada de la duración de vida de los pacientes, es decir, a pesar de estas terapias, la duración media de vida después de la diagnosis es sólo escasamente 12 a 16 meses.

20 El cáncer pancreático es un neoplasma maligno del páncreas. Sólo en los Estados Unidos, se diagnostican cada año aproximadamente 43.000 individuos con esta afección y aproximadamente 35.000 mueren de la enfermedad. La prognosis es relativamente pobre pero ha mejorado; la tasa de supervivencia de 3 años es ahora aproximadamente 30%, pero menos de 5% de los diagnosticados viven todavía 5 años después de la diagnosis. La remisión completa es todavía muy rara.

25 La bioterapéutica y especialmente virus oncolíticos han sido aplicados ya en combinación con quimioterapia para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer con inclusión de PDAC (cáncer del conducto pancreático) (Kasuya et al., Cancer Gene Ther. 2005; 12:725-36). Sin embargo, el uso de virus como agentes de sensibilización y el problema de predicción de la respuesta del paciente a la quimioviroterapia no han sido abordados con éxito hasta ahora. De hecho, estudios previos *in vitro* e *in vivo* (Angelova et al., Clin. Cancer Res. 2009; 15: 511-9) han demostrado que, v.g., las células de tumor pancreático difieren en su sensibilidad al tratamiento con parvovirus (H1-PV) y también a diversas combinaciones de H1-PV con el estándar quimioterapéutico gemcitabina. Lamentablemente, no se dispone de marcadores moleculares predictivos para la respuesta. La eficacia potencial se extrapola a partir de los experimentos de 'prueba-y-error' en modelos animales. Dado que es imposible estratificar los pacientes en grupos conforme a la sensibilidad potencial, los posibles protocolos eficaces fallan si se aplican al grupo diana equivocado - que podría beneficiarse de un régimen de aplicación diferente.

35 Borkamo et al., Int. J. of Radiation: Oncology Biology Physics, Vol. 75, No. 5, pp. 1562-1569 (2009) describe que después de la termoquimiorradioterapia pueden observarse diversos genes que se expresan de modo diferente. Sin embargo, los autores llegan a la conclusión de que en la actualidad ninguna de tales huellas de expresión se ha convertido en una herramienta clínica útil.

40 Tsai Mong-Hsun et al., Cancer Res., Vol. 67, No. 8, pp. 3845-3852 (2007) describe el perfil de expresión de células de mama, próstata, y glioma después de dosis simples frente a dosis fraccionadas de terapia de radiación. Se encontró que varios genes estaban regulados inequívocamente en sentido creciente después del tratamiento. Se llega a la conclusión de que el microentorno del tumor puede influir significativamente en el patrón de expresión génica después de exposición a la radiación.

45 En suma, la imposibilidad de predecir fiablemente el éxito de un tratamiento de combinación determinado, v.g. para seleccionar pacientes que respondan potencialmente, es un gran obstáculo para la aplicación clínica de la quimioviroterapia o radioviroterapia.

50 Así pues, el problema técnico subyacente de la presente invención es proporcionar un método de diagnóstico para predecir la respuesta de un paciente de tumor a la quimioviroterapia o radioterapia.

55 La solución a dicho problema técnico se obtiene proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

60 Un nuevo protocolo quimioviroterapéutico y un test que permite el ajuste individual de la dosis y la temporización antes de la iniciación del tratamiento, aumentando así las tasas de éxito de la terapia aplicada ha sido desarrollado. Se encontró que la infección de H1-PV reduce los niveles de ISG15 y sensibiliza con ello las células del cáncer para la quimioterapia (v.g., con gemcitabina). Así, la medida de la expresión de ISG15 en las células del tumor primario expuestas a dosis diferentes de H1-PV y gemcitabina durante periodos de tiempo variables permite predecir la respuesta a la terapia potencial y ajustar las dosis individuales de parvovirus (v.g., H1-PV) necesarias para una viro-sensibilización eficaz (es decir la resensibilización de las células frente a la quimioterapia después de la infección de H1-PV). Los experimentos que han dado como resultado la presente invención revelaron que la infección con H1-PV

reduce los niveles de expresión de ISG15 en un subconjunto de células pancreáticas humanas. Así, la capacidad de H1-PV para regular en sentido decreciente ISG15 puede utilizarse (i) para diseñar un protocolo de tratamiento individual que utiliza por primera vez H1-PV para sensibilización de los pacientes a la gemcitabina (u otros agentes quimioterapéuticos) aplicados posteriormente y (ii) para generar una herramienta de selección que puede predecir la respuesta potencial de las células tumorales primarias extraídas de un paciente a este enfoque particular antes de la iniciación del tratamiento. Este enfoque puede expandirse a radioviroterapia, dado que se ha comunicado que la resistencia al deterioro del DNA relacionado con IFN está en relación tanto con la quimio- como con la radiorresistencia (1-3). Los beneficios para los pacientes y las agencias financiadoras de la terapia son evidentes, es decir, el enfoque de la presente invención mejora significativamente las respuestas objetivas, permite una terapia individualizada, y ahorra costes.

**Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: Sinergia del tratamiento combinado con H1-PV y gemzar

Figura 2: Regulación decreciente de ISG15 por H1-PV (QRT-PCR)  
Véase Ejemplo 2 para detalles.

Figura 3: Regulación decreciente de ISG15 por H1-PV  
Véase el Ejemplo 2 para detalles.

Figura 4: Comparación de los protocolos de aplicación de Gemzar o H1-PV como tratamiento de primera línea  
Véase el Ejemplo 2 para detalles.

Figura 5: Las muestras obtenidas durante las cirugías PDAC rutinarias (i) se utilizan para establecer cultivos primarios de corto y largo plazo, y simultáneamente, (ii) se xenotrasplantan en ratones SCID y se expanden posteriormente  
Véase el Ejemplo 3 para detalles.

Así pues, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico para predecir la respuesta de un paciente a la quimioviroterapia o radioviroterapia, que comprende

- (a) exponer células de tumor primario de una muestra de tumor obtenida de un paciente a dosis diferentes de (i) un parvovirus y (ii) un agente quimioterapéutico o radioterapia; y
- (b) determinar la reducción de la expresión o concentración de ISG15 durante periodos de tiempo variables.

Así pues, la expresión de ISG15 en células de tumor primario expuestas a diferentes dosis de, v.g., H1-PV y gemcitabina durante periodos de tiempo variables permite predecir la respuesta a la terapia potencial y ajustar las dosis individuales de parvovirus.

En una realización alternativa, la presente invención se refiere a un método de selección de una modalidad de terapia para un paciente afligido con un tumor, que comprende

- (a) exponer células de tumor primario de una muestra de tumor obtenida de un paciente a dosis diferentes de (i) un parvovirus y (ii) un agente quimioterapéutico o radioterapia; y
- (b) determinar la reducción de la expresión o concentración de ISG15 durante periodos de tiempo variables.

Basándose en los resultados del paso (b), la respuesta de un paciente a la quimioviroterapia/radioterapia puede predecirse y seleccionarse la modalidad más adecuada de terapia, es decir, no sólo puede establecerse un valor de punto de corte sino también seleccionar por test pacientes adecuados y ajustar una dosis apropiada para estos pacientes.

Los términos "quimioviroterapia" y "radioviroterapia" como se utilizan en esta memoria, se refieren a una combinación de (parvo)viroterapia con quimioterapia y radioterapia, respectivamente. El parvovirus puede administrarse antes de, simultáneamente a o después de la administración del agente quimioterapéutico o la radioterapia. Preferiblemente, el parvovirus se administra antes del agente quimioterapéutico o la radioterapia.

El término "muestra de tumor", como se utiliza en esta memoria, se refiere a una muestra obtenida de un paciente. La muestra de tumor puede obtenerse del paciente por medidas rutinarias conocidas por las personas expertas en la técnica, a saber, biopsia (tomada por aspiración o punción, extirpación o cualquier otro método quirúrgico que conduzca a biopsia o material celular resecado). Para aquellas áreas que no son fácilmente alcanzables por una biopsia abierta, un cirujano puede, a través de un pequeño orificio practicado en el cráneo, utilizar instrumentación estereotáxica para obtener una biopsia "cerrada". La instrumentación estereotáxica permite al cirujano posicionar con precisión una sonda de biopsia en un espacio tridimensional para permitir acceso prácticamente a cualquier punto del cerebro. Por tanto, es posible obtener tejido para el método de diagnóstico de la presente invención.

El término "tumor" no está limitado en fase, grado, característica histomorfológica, invasividad, agresividad, o malignidad de un tejido o agregación de células afectado. En particular, se incluyen cáncer de fase 0, cáncer de fase I, cáncer de fase II, cáncer de fase III, cáncer de fase IV, cáncer de grado I, cáncer de grado II, cáncer de grado III, cáncer maligno, carcinomas primarios, y todos los restantes tipos de cánceres, malignidades, etc.

5 El término "parvovirus", como se utiliza en esta memoria, comprende derivados de tipo salvaje o derivados modificados competentes en replicación de los mismos, así como virus o vectores afines basados en tales virus o derivados. Parvovirus adecuados, derivados, etc así como células que pueden utilizarse para producir activamente dichos parvovirus y que son útiles para terapia, son fácilmente determinables dentro de la experiencia en la técnica basándose en la descripción de esta memoria, sin esfuerzo experimental excesivo. Ejemplos de parvovirus útiles en la presente invención incluyen parvovirus HI (H1-PV) o un parvovirus afín tal como LuIII, virus diminuto del ratón (MMV), parvovirus de ratón (MPV), virus diminuto de la rata (RMV), parvovirus de rata (RPV) o virus de rata (RV).

15 ISG15 es una proteína afín a ubiquitina inducida por IFN-alfa/beta que está conjugada a una amplia gama de proteínas celulares a través de la acción secuencial de tres enzimas de conjugación que son inducidas también por IFN-alfa/beta. La secuencia de aminoácidos de la proteína, así como la secuencia de nucleótidos del gen que codifica ISG15 se describen en (4) y (5). Así pues, la persona experta en la técnica puede generar sondas adecuadas para determinar la expresión y/o concentración de ISG15 conforme a métodos estándar. La persona experta en la técnica conoce también métodos rutinarios para cultivo o mantenimiento de células de tumor primarias e incubación de estas células con el parvovirus y/o el agente quimioterapéutico.

Los métodos de la invención pueden aplicarse a cualquier tumor. Sin embargo, tumores preferidos son los tumores cerebrales y cáncer de páncreas.

25 Los pacientes tratables por la combinación de agentes conforme a la invención incluyen humanos así como animales no humanos. Ejemplos de los últimos incluyen, sin limitación, animales tales como vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros, y gatos.

30 Los agentes quimioterapéuticos útiles para los propósitos de la presente invención incluyen todos los compuestos químicos que son eficaces en la inhibición del crecimiento de los tumores. La administración de agentes quimioterapéuticos puede realizarse por una diversidad de rutas que incluyen vías sistémicas por las rutas parenterales y enteral. Preferiblemente, el parvovirus y el agente quimioterapéutico se administran como compuestos separados. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen agentes alquilantes, por ejemplo, mostazas nitrogenadas, compuestos de etilenimina y alquil-sulfonatos; antimetabolitos, por ejemplo, ácido fólico, antagonistas de purina o pirimidina, inhibidores mitóticos, por ejemplo, alcaloides de la vinca y derivados de podofilotoxina; antibióticos citotóxicos; compuestos que deterioran o interfieren la expresión del DNA; y antagonistas de los receptores de factores de crecimiento.

40 Ejemplos particulares de agentes quimioterapéuticos adecuados para la terapia combinada incluyen cisplatino, decarbazina (DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etoposido, metotrexato, 5-fluorouracilo, vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleukina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, dacarbazina, floxuridina, fludarabina, hidroxiaurea, ifosfamida, leuprolida, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromán, plicamicina, estreptozocina, tamoxifeno, teniposido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucil y combinaciones de los mismos. Agentes quimioterapéuticos particularmente preferidos son gemcitabina y temozolodina.

50 La expresión del gen codificante de ISG15 y la concentración de la proteína ISG15 pueden ensayarse por métodos estándar conocidos por las personas expertas en la técnica. La secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos derivada de ISG15 han sido publicadas (4). Ensayos preferidos están basados en la hibridación o por PCR utilizando sondas/pares de cebadores apropiados, tales como análisis de transferencia Northern, reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-CR), hibridación in situ, etc.

55 Los "pares de cebadores" y "sondas", dentro del significado de la presente invención, tendrán el significado ordinario de este término que es bien conocido por las personas expertas en la técnica de biología molecular. En una realización preferida de la invención se entenderá que "pares de cebadores" y "sondas" son moléculas de polinucleótidos que tienen una secuencia idéntica, complementaria, homóloga, u homóloga al complemento de regiones de una proteína diana ISG15 que debe detectarse. Los cebadores/sondas pueden estar marcados detectablemente, como ayuda en la detección de la proteína. Los marcadores preferidos son marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores radiactivos y tintes.

65 Preferiblemente, la concentración de la proteína ISG15 se determina utilizando un anticuerpo que se fija específicamente a la proteína ISG15. Un anticuerpo de este tipo puede generarse utilizando un péptido derivado de ISG15 o la proteína entera como inmunógeno.

5 El término "anticuerpo" como se utiliza en esta memoria se refiere a cualquier tipo de anticuerpo conocido en la técnica. Un anticuerpo como se utiliza en esta memoria incluye moléculas de inmunoglobulina intactas, así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab)<sub>2</sub> y Fv, que son capaces de fijarse a un epítipo de IDH1. Típicamente, al menos 6, 8, 10, o 12 aminoácidos contiguos se requieren para formar un epítipo. Sin embargo, epítipos que implican aminoácidos no-contiguos pueden requerir más, v.g., al menos 15, 25, ó 50 aminoácidos.

10 Un anticuerpo que se fija específicamente a ISG15 puede utilizarse en ensayos inmunoquímicos, tales como transferencias Western, ELISAs, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones, u otros ensayos inmunoquímicos conocidos en la técnica. Diversos inmunoensayos pueden utilizarse para identificar anticuerpos que tengan la especificidad deseada. Numerosos protocolos para fijación competitiva o ensayos inmunoradiométricos son bien conocidos en la técnica. Tales inmunoensayos implican típicamente la medida de la formación de complejo entre un inmunógeno y un anticuerpo que se fija específicamente al inmunógeno.

15 Un anticuerpo útil en el método de diagnóstico de la presente invención puede generarse conforme a métodos bien establecidos, es decir, un polipéptido ISG15 o fragmento del mismo puede utilizarse para inmunizar un mamífero, tal como un ratón, rata, conejo, cobayo, mono, o humano, a fin de producir anticuerpos policlonales. Si se desea, el (poli) péptido utilizado como inmunógeno puede conjugarse a una proteína portadora, tal como seroalbúmina bovina, tiroglobulina, y hemocianina de lapa bocallave. Dependiendo de la especie del hospedador, pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Tales adyuvantes incluyen, pero sin carácter limitante, adyuvante de Freund, geles minerales (v.g., hidróxido de aluminio), y sustancias tensioactivas (v.g. lisolecitina, polioles Pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa bocallave, y dinitrofenol). Entre los adyuvantes utilizados en humanos, BCG (bacilos Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son especialmente útiles.

25 Anticuerpos monoclonales que se fijan específicamente a ISG15 pueden prepararse utilizando cualquier técnica que conduzca a la producción de moléculas de anticuerpo por linajes continuos de células en cultivo. Estas técnicas incluyen, pero sin carácter limitante, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de las células B humanas, y la técnica del hibridoma EBV [Kohler et al., *Nature* 256 (1985), 495-7].

30 Los anticuerpos útiles en un método de la invención pueden purificarse por métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden purificarse por afinidad haciéndolos pasar por una columna a la cual está fijado un polipéptido ISG15. Los anticuerpos fijados pueden eluirse luego de la columna utilizando un tampón con una concentración elevada de sales.

35 La invención no está limitada a un procedimiento de inmunoensayo particular, y por tanto debe entenderse que se incluyen procedimientos tanto homogéneos como heterogéneos. Inmunoensayos ilustrativos que pueden conducirse conforme a la invención incluyen inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA), inmunoensayo de fluorescencia (FIA), inmunoensayo enzimático (EIA), inmunoensayo de inhibición nefelométrica (NIA), ensayo de inmunosorbente unido a enzima (ELISA), y radioinmunoensayo (RIA). Un resto indicador, o grupo marcador, puede unirse a los anticuerpos en cuestión y seleccionarse a fin de cumplir las necesidades de diversos usos del método que vienen dictados a menudo por la disponibilidad de equipo de ensayo y los procedimientos de inmunoensayo compatibles. Los métodos generales a utilizar en la realización de los diversos inmunoensayos arriba indicados son conocidos por quienes poseen una experiencia ordinaria en la técnica.

45 En el método de la presente invención que se refiere a la selección de una modalidad de terapia para un paciente afligido con un tumor, el término "modalidad de terapia" se refiere, entre otras cosas, a una administración oportuna, secuencial o simultánea, de un parvovirus y un agente quimioterapéutico para terapia del cáncer. La administración de éstos puede realizarse en una modalidad adyuvante y/o neoadyuvante. La variación de la dosis del agente individual, el marco de tiempo de la aplicación y la frecuencia de administración dentro de una ventana de terapia definida dependen de la reducción de la expresión/nivel/actividad de ISG15 después que las células tumorales primarias de muestras de tumor obtenidas de un paciente se han expuesto a dosis diferentes de un parvovirus y/o un agente quimioterapéutico. Sin embargo, los resultados de ensayo obtenidos podrían indicar incluso que el paciente podría beneficiarse más de un régimen de tratamiento diferente. Así pues, el término "modalidad de terapia" no está restringido a la administración de un parvovirus y un agente quimioterapéutico.

55 La descripción proporciona también un kit útil para realización de un método de la invención, que comprende un anticuerpo que se fija específicamente a una proteína ISG15, o una sonda o par de cebadores como se ha descrito arriba, es decir, la hibridación específica al mRNA de ISG15.

60 Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

### Ejemplo 1

#### La infección con H1-PV reduce los niveles de expresión de ISG15

65

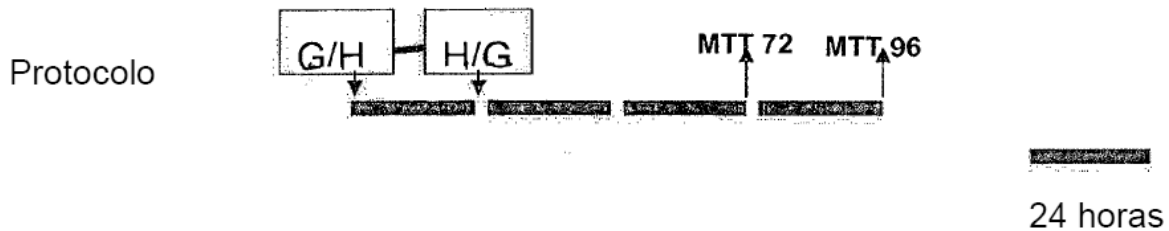
Experimentos recientes revelaron que la infección con H1-PV reduce los niveles de expresión del ISG15 en un subconjunto de células pancreáticas humanas. Linajes de células AsPC1, MiaPaCa2, Panc1 y T3M4 se sembraron en placas de 24 pocillos y se infectaron con H1-PV a MOIs de 1 y 10. Al cabo de 3, 10 y 24 horas después de la infección (hpi) las células se cosecharon en 300 µl de tampón de lisis MagNA Pure LC mRNA (Roche) y después de la purificación del mRNA se sometieron a QRT-PCR utilizando cebadores para ISG15 humana, β-actina y H-1PV. Los números de copias de ISG15 se reducían espectacularmente en las células infectadas T3M4 y en menor proporción en las células Panc1 (Fig. 2 y 3).

**Ejemplo 2**

**Comparación de los protocolos de aplicación de Gemzar o H-1PV como tratamiento de primera línea**

Se realizó un experimento inicial para comparar los protocolos de aplicación de Gemzar o H-1PV como tratamiento de primera línea con una diferencia de 24 horas. Los linajes de células pancreáticas arriba mencionados se extendieron en una placa de 96 pocillos y se trataron con MOIs de 1 ó 10 y una dosis CE50 de Gemzar utilizando el esquema siguiente.

Se realizó un ensayo de citotoxicidad MTT a las 72 y 96 horas para evaluar los niveles de inhibición del crecimiento celular.



Los resultados de este experimento inicial se muestran en Fig. 4. La hipótesis concerniente a la eficacia mejorada del protocolo H/G (H-1PV-24 h-Gemzar; H-G MOI 1 o H-G MOI 10) comparado con el G/H (Gemzar-24 h-H-1PV; G-H MOI 1 o G-H MOI 10) pudieron confirmarse en el caso de las células T3M4 en las que el virus induce una reducción de ISG15 (véanse Fig. 2 y 3).

**Ejemplo 3**

**Selección de pacientes que responden potencialmente al protocolo basado en el uso de H-1PV como un sensibilizador de gemcitabina dependiente de ISG15**

Las muestras obtenidas durante cirugías rutinarias de PDAC (n= 6) se utilizarán i) para establecer cultivos primarios a corto y largo plazo, y se someterán simultáneamente ii) a xenotrasplante en ratones SCID (F0) y se expandirán en el futuro (F1/F2) (véase Fig. 5). El efecto inhibitor de H-1PV sobre la expresión de ISG15 se titulará *in vitro* utilizando tanto QRT-PCRs como transferencias Western. Se empleará Anticuerpo Policlonal de Conejo para ISG15 humana (Axxora: Boston) como el anticuerpo primario a una dilución de 1:500 e *in vivo*. Se establecerá una dosis eficaz mínima del virus. El grado de muerte de las células tumorales servirá como indicador funcional.

Se utilizará material de PDAC obtenido quirúrgicamente como herramienta de cribado basada en QRT o IHC para permitir la selección oportuna de pacientes potencialmente sensibles al protocolo basado en el uso de H-1PV como sensibilizador de gemcitabina dependiente de ISG15.

**Lista de referencias**

1. Una huella genética relacionada con interferón para resistencia al deterioro del DNA es un marcador predictivo para quimioterapia y radiación del cáncer de mama. Weichselbaum RR, Ishwaran H, Yoon T, Nuyten DS, Baker SW, Khodarev-N, Su AW, Shaikh AY, Roach P, Kreike B, Roizman B, Bergh J, Pawitan Y, van de Vijver MJ, Minn AJ. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(47):18490-5.
2. El transductor de señales y activador de la transcripción 1 regula tanto las funciones citotóxicas como las de prosupervivencia en células tumorales. Khodarev Nun, Minn AJ, Efimova EV, Darga The, Labay E, Beckett M, Mauceri HJ, Roizman B, Weichselbaum RR. Cancer Res. 2007;67(19):9214-20.
3. STAT1 está sobreexpresado en tumores seleccionados por radiorresistencia y confiere protección de la radiación en células sensibles transducidas. Khodarev NN, Beckett M, Labay E, Darga T, Roizman B, Weichselbaum RR. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(6):1714-9. Epub, 30 Enero 2004.

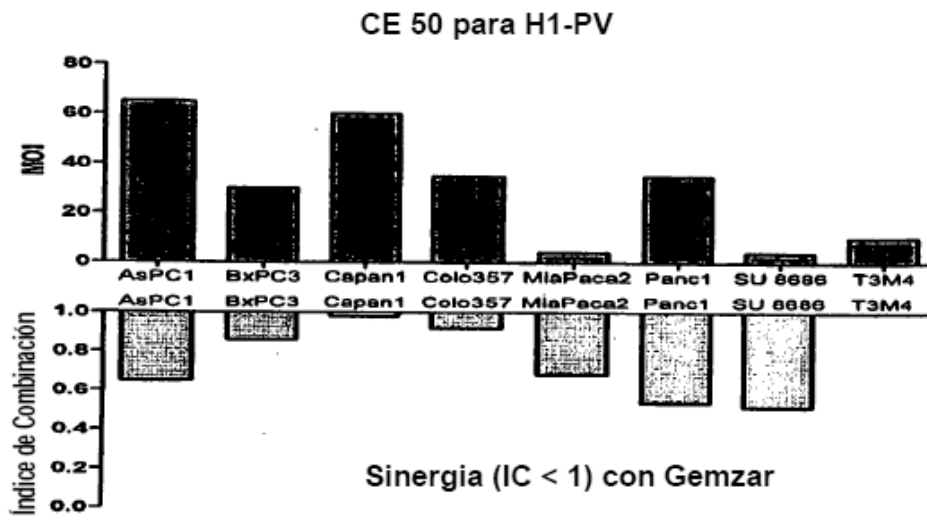
4. Caracterización molecular de la proteína de 15-kDa inducida por interferón. Clonación molecular y secuencia de nucleótidos y aminoácidos. Blomstrom DC, Fahey D, Kutny R, Korant BD, Knight E Jr. J Biol Chem. 1986;261(19):8811-6.
5. Producción de ISG-15, una proteína inducible por interferón, en células de córnea humana. Taylor JL, D'Cunha J, Tom P, O'Brien WJ, Borden EC. J Interferon Cytokine Res. 1996;16(11):937-40.

**REIVINDICACIONES**

- 1.Un método de diagnóstico para predecir la respuesta de un paciente a la quimioviroterapia o radioviroterapia, que comprende
- 5           (a) exponer células de tumor primario de una muestra de tumor obtenida de un paciente a dosis diferentes de (i) un parvovirus y (ii) un agente quimioterapéutico o radioterapia; y
- (b) determinar la reducción de la expresión o concentración de ISG15 durante periodos de tiempo variables.
- 2.Un método de selección de una modalidad de terapia para un paciente afligido con un tumor, que comprende
- 10           (a) exponer células de tumor primario de una muestra de tumor obtenida de un paciente a dosis diferentes de (i) un parvovirus y (ii) un agente quimioterapéutico o radioterapia; y
- (b) determinar la reducción de la expresión o concentración de ISG15 durante periodos de tiempo variables.
- 3.El método de la reivindicación 1 ó 2, en el cual dicho tumor es un tumor cerebral o tumor pancreático.
- 4.El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual la expresión de ISG15 se determina sobre el nivel de mRNA.
- 15   5.El método de la reivindicación 4, en el cual el nivel de mRNA se determina por un método basado en hibridación o por PCR.
- 6.El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual la concentración de ISG15 se determina utilizando un anticuerpo que se fija específicamente a ISG15.



Figura 1



**Fig. 2**

Regulación decreciente de ISG-15 por H-1PV; QRT-PCR

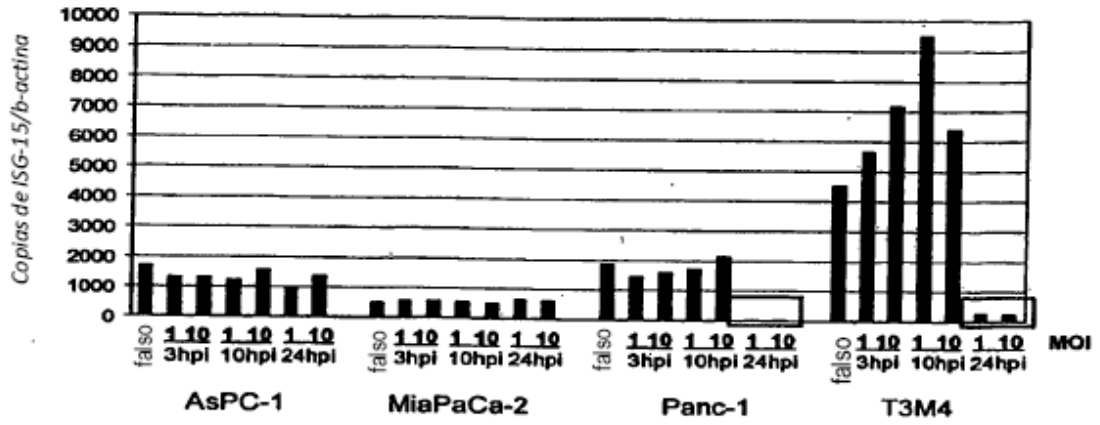
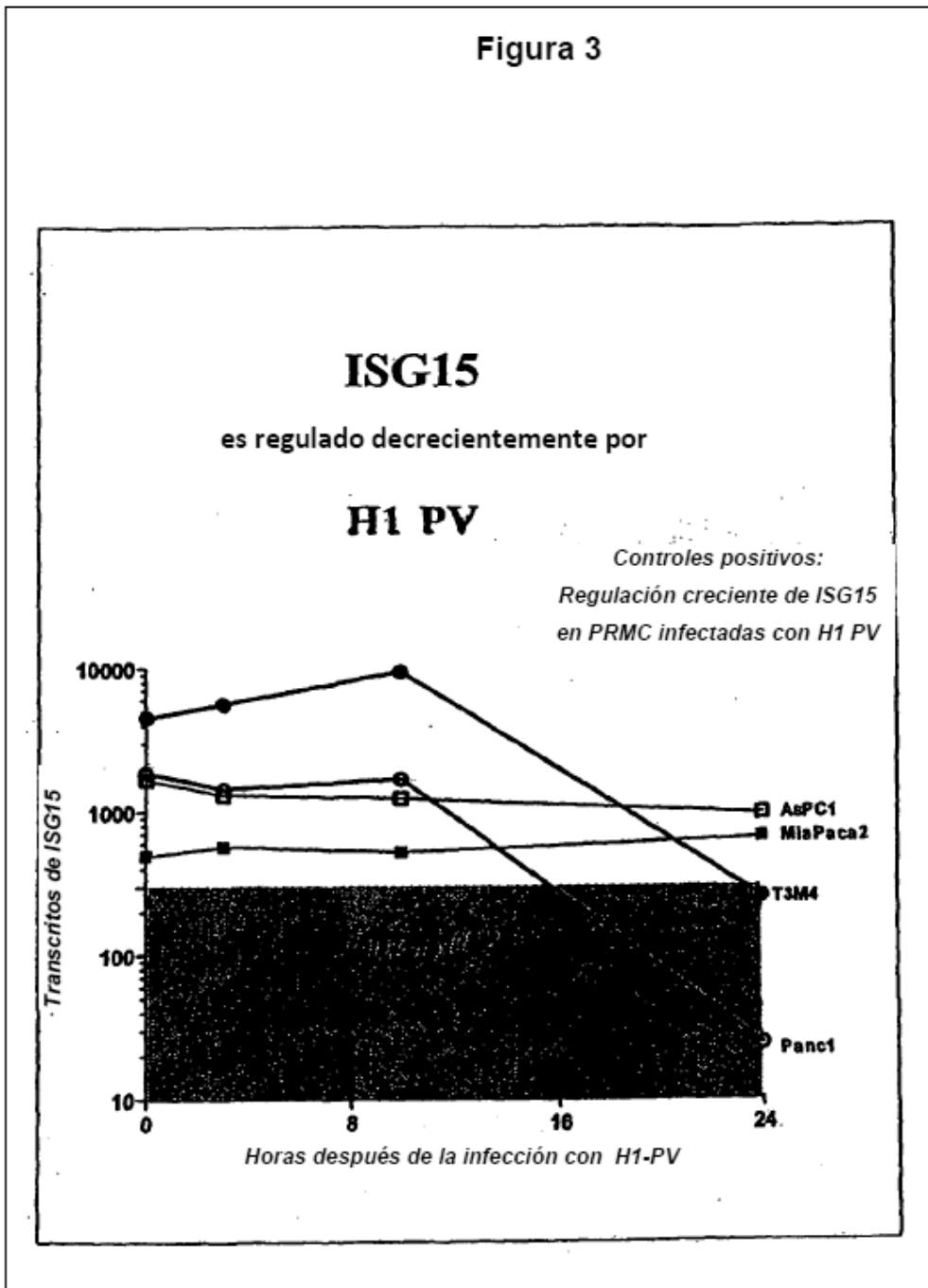


Figura 3



**Fig. 4**  
**MTT 96**

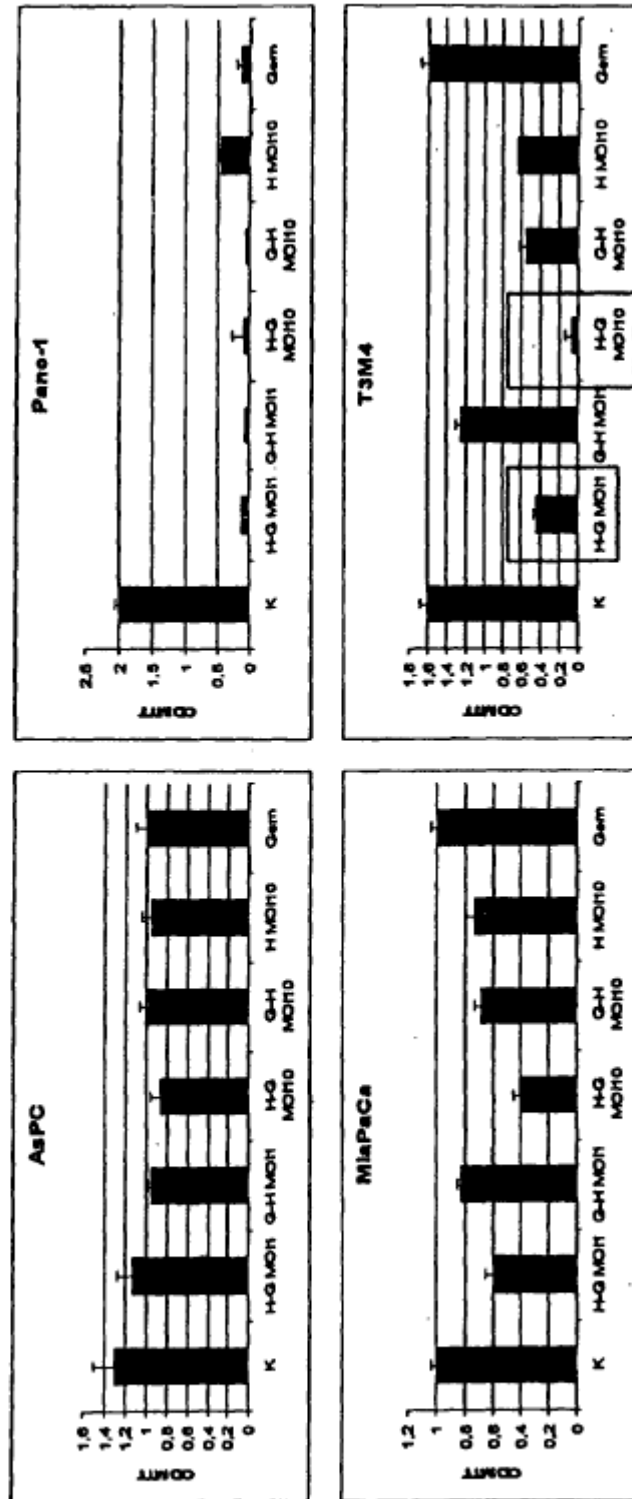


Figura 5

