

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 648**

51 Int. Cl.:

A61N 5/10 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2014 PCT/EP2014/056265**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14154854**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2014 E 14714249 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2981331**

54 Título: **Método para determinar la radiosensibilidad**

30 Prioridad:

28.03.2013 EP 13305399

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

23.05.2019

73 Titular/es:

**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
MONTPELLIER (33.3%)
191 avenue du Doyen Gaston Giraud
34000 Montpellier, FR;
UNIVERSITE DE MONTPELLIER (33.3%) y
INSTITUT REGIONAL DU CANCER DE
MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**AZRIA, DAVID;
LACOMBE, JEROME;
SOLASSOL, JEROME y
MANGE, ALAIN**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 713 648 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 para determinar la radiosensibilidad.

5 La presente invención se refiere a un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto. Más particularmente, la invención se refiere a un método que comprende la inducción de un estrés exógeno en una muestra biológica de un sujeto y la comparación del nivel de por lo menos un compuesto identificado entre dicha muestra biológica y una muestra de referencia. La presente invención se refiere asimismo a la utilización de dicho por lo menos un compuesto como biomarcador predictivo de la radiosensibilidad de un sujeto. La
10 invención se refiere asimismo a un kit, que puede utilizarse en un método según la invención, para la detección del nivel de por lo menos uno de dichos compuestos identificados.

15 El éxito de la radioterapia depende principalmente de la dosis administrada total. Los individuos varían ampliamente en cuanto a la susceptibilidad del tejido al daño por radiación ionizante. Cada año, aproximadamente 4 millones de personas se tratan mediante radioterapia en todo el mundo. Las estimaciones actuales sugieren que el 5-10% de los pacientes que reciben radioterapia presentan reacción adversa debida a hipersensibilidad. Los pacientes hipersensibles a radiaciones ionizantes pueden desarrollar importantes efectos secundarios inducidos por radiación. La predicción de estos efectos secundarios sigue siendo imposible en la actualidad, implicando limitación de la dosis administrada con el riesgo de reducir el beneficio terapéutico para
20 los pacientes. Hasta el momento, los métodos de laboratorio para evaluar la radiosensibilidad eran demasiado laboriosos como para examinar grandes poblaciones.

25 Se han desarrollado unas pocas pruebas para predecir la radiotoxicidad, sin embargo, hasta ahora, ninguna de ellas puede utilizarse en la rutina clínica.

30 Una prueba clonogénica evalúa la pérdida de la capacidad de proliferación de linfocitos tras la irradiación (West *et al.*, 1995). Otras pruebas se basan en la detección de micronúcleos tras la irradiación (Floyd y Cassoni, 1994). Sin embargo, la implementación rutinaria de estas pruebas es limitada y ninguna de ellas se utilizan en entorno clínico.

35 El ensayo de apoptosis de linfocitos inducida por radiación (RILA) mide la apoptosis en linfocitos T CD4 y CD8 tras la irradiación (0.5-8 Gy) mediante citometría de flujo (Ozsahin *et al.*, 1997, Azria *et al.*, 2009). Se confirmaron resultados en una cohorte de 399 pacientes (Ozsahin *et al.*, 2005). Esta medida se basa en la disminución de la fluorescencia de ADN nuclear debido a cambios de cromatina específicos que acompañan a la apoptosis y puede identificar pacientes hipersensibles. El valor predictivo positivo del ensayo de RILA es débil, no presentando ninguna toxicidad tardía el 80% de los pacientes de la población detectada con nivel de apoptosis débil. El ensayo de RILA presenta una sensibilidad de 0.70 y una especificidad inferior a 0.50 (Ozsahin *et al.*, 2005).

40 Se ha estudiado una correlación entre algunas variaciones genéticas, tales como polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), variabilidad del número de copias (CNV) o modificaciones epigenéticas, y la radiotoxicidad (Azria *et al.*, 2008, Azria *et al.*, 2012). Se han identificado algunos genes relacionados con la reparación del ADN durante el estrés oxidativo o en la inflamación y se han asociado con la toxicidad temprana o tardía. Sin embargo, hasta ahora, no se ha mostrado ninguna relación entre genotipo y radiotoxicidad y ningún marcador genético fuerte de radiotoxicidad.

45 Algunos estudios proteómicos han abordado provisionalmente la determinación de marcadores radiosensibles. El documento WO 2013/001507 describe un método que incluye crear o adaptar un plan de tratamiento para un paciente sometido a radioterapia, en el que dicho método se basa en un conjunto de polipéptidos en suero del paciente que son indicativos de una radiotoxicidad. Se encontró que alfa 1 anti-tripsina, APOA1 y el complemento C3 estaban regulados por incremento en el suero de un modelo de ratón expuesto a radiación ionizante (Guipaud *et al.*, 2007). Cai *et al.* (2011) dan a conocer un análisis proteómico de pacientes que reciben radiación para cáncer de pulmón de células no pequeñas. También se encontró que el complemento C3, la cadena alfa de la proteína de unión a C4b y vitronectina estaban reguladas por incremento en una pequeña cohorte de pacientes con toxicidad de pulmón inducida por radiación de grado > 2 (Cai *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2011).
50 Skvortsova *et al.* (2008) dan a conocer el perfil de proteoma de líneas celulares de carcinoma de próstata y líneas celulares de cáncer de próstata resistentes a la radiación. Stenmark *et al.* (2011) dan a conocer niveles de citocinas circulantes de pacientes que reciben terapia por radiación. Finalmente, Oh *et al.* propusieron un análisis *in silico* original e identificaron α -2-macroglobulina como posiblemente asociada con un riesgo aumentado de inflamación de pulmón inducida por radiación en pacientes con cáncer de pulmón, pero no validaron este
55 resultado en una cohorte independiente (Oh *et al.*, 2011).
60

65 Ninguna de las pruebas predictivas existentes para determinar la radiosensibilidad puede utilizarse en la rutina clínica, debido a dos inconvenientes principales: i) su falta de sensibilidad y/o especificidad, no presentando ninguna de ellas un valor predictivo tanto positivo como negativo suficientemente bueno, ii) su falta de viabilidad técnica y requisitos de largos plazos, de médicos altamente cualificados, su alto coste y la recogida invasiva de muestras biológicas.

Por tanto, todavía existe una necesidad de un método sencillo, rápido y fiable que muestre un alto valor predictivo positivo y negativo de radiosensibilidad de un sujeto.

5 En el contexto de la presente invención se ha mostrado que, tras la inducción de un estrés exógeno en una muestra biológica de un sujeto o un paciente, la determinación de por lo menos uno de los compuestos expresados de manera diferencial identificados refleja la radiosensibilidad de dicho sujeto o paciente. Por tanto, esta prueba permite la predicción de toxicidad radioinducida tardía.

10 Un método y una utilización según la invención proporcionan al médico detalles de radiosensibilidad tisular, y por tanto ayudan al reconocimiento temprano y al manejo apropiado de estos pacientes hipersensibles. Además, tal método o ensayo puede aumentar la dosis de radiación total para la mayoría de los pacientes que se predice que no son hipersensibles y posiblemente obtengan una mayor tasa de cura o control en estos pacientes. En teoría, el control tumoral local puede mejorarse significativamente en varios pacientes aumentando moderadamente la dosis de radiación total. Se ha sugerido que un aumento del 20% de las tasas de control es viable.

15 La presente invención da a conocer un método que confirma resultados del ensayo de RILA y presenta una mayor predictibilidad positiva. Además, dicho método según la invención puede utilizarse como combinación con otras pruebas, aumentando por tanto el valor predictivo de la detección. La combinación del ensayo de RILA y un método según la invención puede conducir a una sensibilidad de 0.90 y una especificidad de 0.80 con una tasa de prevalencia del 10%. Este resultado puede permitir implementar dicha prueba en la práctica clínica diaria.

20 Un método según la invención representa una herramienta útil dentro de un protocolo terapéutico, una ayuda valiosa en la toma de decisiones y también puede utilizarse dentro de la prevención de toxicidad radioinducida.

25 Un método según la invención permite, a partir de una simple extracción de sangre y dentro del plazo de cinco días, determinar el perfil de proteína de la radiosensibilidad individual de tejidos. La rapidez, reproducibilidad y simplicidad logística de esta prueba son fuertes argumentos a favor de su implementación en la rutina clínica.

30 Descripción detallada

La presente invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria y a partir de los dibujos adjuntos, proporcionados únicamente a título ilustrativo y no limitativo del alcance previsto de la invención.

35 La presente invención se refiere en primer lugar a un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto, que comprende las etapas de:

40 a) inducir un estrés exógeno mediante por lo menos un método seleccionado de entre irradiación, puesta en contacto con por lo menos un agente radiomimético y una combinación de los mismos, en una primera fracción de una muestra biológica que comprende células,

b) determinar en la fracción de la etapa a) la presencia o el nivel de por lo menos un compuesto intracelular,

45 c) determinar la presencia o el nivel de dicho por lo menos un compuesto en una segunda fracción de dicha muestra biológica que no se ha sometido a dicho estrés exógeno,

50 d) comparar los resultados de la determinación de la presencia o el nivel de dicho por lo menos un compuesto en dicha primera fracción y en dicha segunda fracción, y seleccionar por lo menos un compuesto que se expresa de manera diferencial entre dicha primera y dicha segunda fracción,

e) inducir un estrés exógeno tal como se definió en la etapa a) en una muestra de prueba biológica que comprende células de dicho sujeto,

55 f) determinar en la muestra de prueba de la etapa e) la presencia o el nivel de dicho por lo menos un compuesto seleccionado en la etapa d),

60 g) comparar los resultados de la determinación de la presencia o el nivel de dicho por lo menos un compuesto los resultados de la etapa f) con la presencia o el nivel de los mismos compuestos en una muestra de referencia biológica, y

h) determinar a partir de la comparación de la etapa g) la radiosensibilidad de dicho sujeto,

65 seleccionándose la muestra biológica que comprende células en la etapa a) y la muestra de prueba biológica que comprende células de dicho sujeto en la etapa e) del grupo que consiste en: extracto de sangre completa que contiene glóbulos blancos, extracto de sangre completa que contiene linfocitos y extracto de sangre completa

que contiene linfocitos T.

El término “radiosensibilidad” se refiere a la susceptibilidad intrínseca de células, tejidos, órganos y/u organismos a los daños por radiación ionizante perjudicial, que es o bien letal o bien subletal. En un método según la presente invención, dicha exposición a radiación ionizante tiene lugar durante una radioionización terapéutica, también denominada “radioterapia” o “terapia por radiación”. Se someten pacientes a una utilización médica de radiaciones ionizantes para controlar o destruir células diana según la práctica clínica, y en particular a dosis irradiantes, ampliamente descritas y bien conocidas por los médicos y radioterapeutas.

La presente invención se refiere en primer lugar a un método para la determinación y/o para la predicción de radiosensibilidad intrínseca de un sujeto.

Los mecanismos subyacentes a los efectos de irradiación en tejidos implican daño molecular, selección como diana en particular de ADN y membrana plasmática, conducir a la formación de radicales libres y roturas de ADN bicatenarias, y una multitud de mecanismos celulares, tales como defensa celular, apoptosis, respuesta a estrés y procedimientos de reparación (Lacombe *et al.*, 2013).

En un método según la invención, un “estrés exógeno” es un estrés inducido en células, tejidos y/u órganos mediante radiaciones ionizantes o mediante un agente radiomimético. En un método según la invención, se aísla una “muestra biológica que comprende células” del cuerpo humano, y se induce dicho estrés exógeno *ex vivo* en dicha muestra biológica que comprende células.

En un aspecto de un método según la divulgación, una “muestra biológica que comprende células” comprende cualquier tipo de células, en el que dichas células se eligen preferentemente del grupo que consiste en: células sanguíneas, más preferentemente glóbulos blancos, incluso más preferentemente linfocitos, e incluso más preferentemente linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+.

En un aspecto particular de un método según la invención, en las etapas a), b), c) y e), se aísla una muestra biológica que comprende células de un sujeto, o de un grupo de sujetos, que son diferentes del sujeto para el que se desea determinar la radiosensibilidad. Según este aspecto particular de un método según la invención, dicha muestra biológica que comprende células se aísla del cuerpo de un ser humano. En un aspecto particular de un método según la invención, en las etapas a), b), c) y e), se aísla una muestra biológica que comprende células de un grupo de sujetos que padecen la misma enfermedad que el sujeto para el que se desea determinar la radiosensibilidad.

En un método según la invención, un compuesto según una cualquiera de las etapas b), c), d), f) y g) es un compuesto intracelular. En una forma de realización particular de la invención, dicho compuesto es una proteína, definiéndose dicha proteína por su secuencia de aminoácidos. En una forma de realización más particular, la invención comprende la detección de la presencia o el nivel de dicha proteína o de un fragmento específico de la misma. Por “fragmento específico de la misma” según un ejemplo de la divulgación, quiere decirse un fragmento que resulta, por ejemplo, de la escisión intracelular de un precursor, una proteína que es un fragmento de una pre-proteína y de una pre-proteína. En un aspecto de la invención, un “fragmento específico” es un fragmento o un epítopo de la proteína reconocido específicamente por un ligando de la proteína, tal como un anticuerpo. En otro aspecto de la invención, la invención comprende la detección de la presencia o el nivel de una molécula de ácido nucleico que codifica para dicha proteína, siendo dicha molécula preferentemente una molécula de ARNm o de ADNc, y definiéndose por su secuencia de nucleótidos.

La determinación de la “presencia” de un compuesto conduce a una indicación de su presencia o ausencia en una muestra. La determinación del “nivel” de un compuesto puede conducir a una estimación de su cantidad en una muestra. El nivel de un compuesto en una muestra puede expresarse con respecto a una muestra de referencia, por ejemplo como razón o porcentaje. Dicho nivel también puede expresarse como la intensidad o localización de una señal, según el método utilizado para dicha determinación. Dicho nivel también puede expresarse como una concentración de dicho compuesto en una muestra. Preferentemente, la concentración de dicho compuesto en una muestra se expresa tras la normalización de la concentración total de compuestos relevantes en dicha muestra. En un método según la invención, el nivel de un compuesto en una primera fracción de dicha muestra biológica se compara con el nivel de los mismos compuestos en una segunda fracción de dicha muestra biológica, en el que dicha comparación se expresa posiblemente como estimación de la razón de dicho compuesto en la primera y la segunda fracción, o como porcentaje del nivel de dicho compuesto en una de las fracciones. En una forma de realización preferida, los niveles cuantitativos de dicho compuesto en cada fracción se comparan de manera estadística, según métodos conocidos por un experto en la materia, para demostrar una expresión diferencial de un compuesto dentro de dichas dos fracciones.

En un método según la invención, el nivel de dicho compuesto se determina (en la etapa f)) en una muestra de prueba de dicho sujeto. En una forma de realización particular, dicha muestra de prueba es una muestra biológica de la misma naturaleza que la muestra biológica utilizada para seleccionar compuestos expresados de manera diferencial (en la etapa d)). Como ejemplo, las muestras de las etapas d) y f) pueden recogerse y

prepararse según el mismo método. En otra forma de realización particular, dicha muestra de prueba de la etapa f) y dicha muestra de la etapa d) son muestras biológicas que se preparan según métodos diferentes.

5 En una forma de realización de un método según la invención, una muestra de referencia es una muestra preparada a partir del mismo sujeto antes de la inducción de ningún estrés exógeno, y es preferentemente una fracción de dicha muestra de prueba biológica de dicho sujeto que no se ha sometido a un estrés exógeno. En otra forma de realización, una muestra de referencia es una muestra de un sujeto diferente para el que se determina la radiosensibilidad, por ejemplo, mediante detección clínica.

10 En una forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto, que comprende las etapas de:

- a) inducir un estrés exógeno en una muestra de prueba biológica que comprende células de dicho sujeto,
- 15 b) determinar en la muestra de la etapa a) la presencia o el nivel de por lo menos un compuesto, siendo dicho compuesto una proteína seleccionada de entre grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2), anexina 1 (ANX1), un fragmento específico de las mismas, un ácido nucleico que codifica para las mismas y una combinación de los mismos,
- 20 c) comparar la presencia o el nivel de dicho por lo menos un compuesto con la presencia o el nivel de los mismos compuestos en una muestra de referencia, y
- d) determinar, a partir de la comparación de la etapa c), la radiosensibilidad de dicho sujeto.

25 En una forma de realización de un método según la invención, el por lo menos un compuesto expresado de manera diferencial en dicha muestra biológica, que se somete, o no, a un estrés exógeno, se elige de proteínas implicadas en mecanismos incluyendo metabolismo, producción de energía, apoptosis, proteína de unión a calcio, reparación de daño del ADN y en la regulación del nivel de especies reactivas de oxígeno intracelulares (ROS). En otra forma de realización particular, el por lo menos un compuesto que se expresa de manera diferencial en muestras sometidas, o no, a un estrés exógeno, se elige de proteínas mitocondriales. En una forma de realización particular, las proteínas implicadas en la regulación del nivel de especies reactivas de oxígeno intracelulares (ROS) se eligen del grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, APEX, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1) y proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70).

30 Según una forma de realización particular, la invención comprende la determinación en una muestra de prueba biológica del nivel de por lo menos una de las proteínas seleccionadas de entre grupo que consiste en las proteínas que se sabe que están implicadas en la respuesta celular al estrés. En una forma de realización más particular, una proteína implicada en la respuesta celular al estrés se elige del grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1) y proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70).

45 La isocitrato deshidrogenasa 2 mitocondrial (NADP+) (secuencia de aminoácidos: SEC ID nº 1, secuencia de ARNm: SEC ID nº 6, GeneID: 3418; UniProt ID: P48735) también se define como IDH2, ICD-M, IDP, ICDH específica de NADP+, oxalosuccinato descarboxilasa o se designa mediante el nombre génico IDH2. Contiene un péptido señal mitocondrial N-terminal y se localiza en la mitocondria. Desempeña un papel clave en la regulación de ciclo de TCA en múltiples tejidos catalizando la conversión reversible de isocitrato en α -cetoglutarato y de NADP+ en NADPH. Por tanto, IDH2 es un componente crítico en la ruta antioxidante mitocondrial porque NADPH es necesario para la regeneración de glutatión reducido (GSH), el principal antioxidante responsable de prevenir el daño por ROS (Lee *et al.*, 2004). IDH2 se regula mediante SIRT3 que puede desacetilar y por tanto activar IDH2, conduciendo a niveles de NADPH aumentados y a una razón aumentada de glutatión reducido con respecto a oxidado en la mitocondria (Someya *et al.*, 2010). IDH2 también puede desempeñar un papel importante en la regulación de la apoptosis inducida mediante radiación ionizante (Lee *et al.*, 2007).

55 La APEX1 (secuencia de aminoácidos: SEC ID nº 2, secuencia de ARNm: SEC ID nº 7, GeneID: 328; UniProt ID: P27695) se denomina APEX nucleasa (APEN), endonucleasa apurínica-apirimidínica 1 (AP endonucleasa 1, APE-1), REF-1, factor redox 1 o se designa mediante los nombres génicos APEX1, APE, APE1, APEX, APX, HAP1 o REF1. Es la principal endonucleasa apurínica/apirimidínica en células eucariotas que desempeña un papel central en la ruta de reparación de escisión de bases de ADN de todas las lesiones de ADN (sitios de uracilo, alquilados y oxidados, y abásicos), incluyendo roturas monocatenarias, y también presenta actividad cotranscripcional modulando la expresión de genes regulados directamente por sus factores de transcripción ubicuos (es decir, AP-1, Egr-1, NF- κ B, p53 e HIF) y específicos de tejido (es decir, PEBP-2, Pax-5 y -8, y TTF-1). Además, controla el estado redox intracelular inhibiendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante su efecto inhibitorio sobre Rac1, la subunidad reguladora de un sistema de NAD(P)H oxidasa no

fagocítico de membrana (Tell *et al.*, 2009). Estas actividades están localizadas en dos dominios funcionalmente distintos: el extremo N-terminal está dedicado principalmente a la actividad redox mientras que el extremo C-terminal ejerce la actividad enzimática sobre los sitios abásicos de ADN. Varios estudios demostraron que los polimorfismos funcionales de APEX1 pueden servir como biomarcadores predictivos inducidos por radiación. Yin *et al.* mostraron que los polimorfismos de APEX1 pueden predecir el riesgo de neumonitis por radiación en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas tratados con terapia por radiación definitiva (Yin *et al.*, 2011). Chang-Claude *et al.* demostraron que el alelo ¹⁴⁸Glu de APE1 puede ser protector contra el desarrollo de efectos secundarios agudos tras la radioterapia (Chang-Claude *et al.*, 2005).

La proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (secuencia de aminoácidos: SEC ID nº 3, secuencia de ARNm: SEC ID nº 8, GeneID: 3312; UniProt ID: P11142) se denomina proteína de choque térmico de 70 kDa 8 o se designa mediante los nombres génicos HSPA8, HSC70, HSP73 o HSPA10. Es una chaperona molecular expresada de manera constitutiva que pertenece a la familia de la proteína de choque térmico 70 (HSP70). HSC70 comparte algo de similitud estructural y funcional con HSP70 pero también presenta propiedades diferentes en comparación con la misma y con otros miembros de la familia de choque térmico. HSC70 realiza sus funciones completas mediante la actuación conjunta de cochaperonas. También interacciona con muchas otras moléculas y regula diversas funciones celulares (Liu *et al.*, 2012). También está implicada en diversas enfermedades y puede convertirse en un biomarcador para el diagnóstico y posibles dianas terapéuticas para el diseño, descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos para tratar diversas enfermedades (Liu *et al.*, 2012). Estudios demostraron que la sobreexpresión de HSC70 proporciona un efecto protector contra ROS generadas tanto endógenas como exógenas (Chong *et al.*, 1998). Fomenta la ubiquitinación y degradación de proteínas de Nox y por tanto reduce la producción de ROS (Chen *et al.*, 2012).

En otra forma de realización particular, la presente invención se refiere a la detección del nivel de por lo menos un compuesto, siendo dicho compuesto una proteína seleccionada de entre grupo que consiste en: adenilato cinasa (AK2) y anexina A1 (ANX1).

La adenilato cinasa 2 (secuencia de aminoácidos: SEC ID nº 4, secuencia de ARNm: SEC ID nº 9, GeneID: 204; UniProt ID: P54819) se denomina AK 2, ATP-AMP transfosforilasa 2 o se designa mediante los nombres génicos AK2 o ADK2. Está localizada en el espacio intermembranario mitocondrial que controla los niveles de nucleótido de adenina. AK2 es un miembro de una antigua familia de proteínas, presentes desde bacterias hasta seres humanos, que catalizan la reacción reversible ATP + AMP = 2ADP. De manera clásica se describe que la función de AK es el mantenimiento de una concentración constante y una razón fija de nucleótidos de adenina y la monitorización del estado de energía celular mediante la detección y señalización de nucleótidos que es esencial para el mantenimiento y el crecimiento celular. Recientes estudios indican que AK2 también se requiere para la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) (Burkat *et al.*, 2011). Alteraciones en la homeostasis del retículo endoplasmático (ER) provocan la acumulación de proteínas mal plegadas/desplegadas en el ER y para mantener la homeostasis del ER, células han desarrollado la UPR. La UPR es una ruta de señalización intracelular adaptativa esencial que responde a rutas metabólicas, de estrés oxidativo y de respuesta inflamatoria.

La ANX1 (secuencia de aminoácidos: SEC ID nº 5, secuencia de ARNm: SEC ID nº 10, GeneID: 301; UniProt ID: P04083) se denomina anexina I, anexina 1, calpactina II, calpactina 2, cromobindina 9, lipocortina I, proteína inhibidora de fosfolipasa A2, p35 o se designa mediante los nombres génicos ANXA1, ANX1 o LPC1. Se describió por primera vez a finales de la década de 1970. Esta proteína de unión a calcio y fosfolípidos de 37 kDa es un fuerte inhibidor de la síntesis de eicosanoides inducida por glucocorticoides y PLA2. Un reciente interés en la actividad biológica de esta intrigante molécula ha desvelado importantes atributos funcionales de anexina 1 en una variedad de rutas inflamatorias, en la maquinaria de proliferación celular, en la regulación de la señalización de muerte celular, en el aclaramiento fagocítico de células apoptóticas, y lo más importante, en el procedimiento de carcinogénesis (Lim *et al.*, 2007).

La tabla 1 resume las proteínas identificadas y sus referencias.

Tabla 1

Proteína	Nombre y descripción	Referencia y secuencia de proteína	Referencia y secuencia de ácido nucleico
IDH2	Isocitrato deshidrogenasa 2 (NADP+), mitocondrial, de <i>Homo sapiens</i>	UniProt ID: P48735, SEC ID nº 1	ARNm, NCBI: NM_002168.2 SEC ID nº 6
APEX1	APEX nucleasa de <i>Homo sapiens</i> (enzima de reparación del ADN multifuncional)	UniProt ID: P27695, SEC ID nº 2	Variante de transcripción 4, ARNm, NCBI: NM_001244249.1 SEC ID nº 7
HSC70	Proteína de choque térmico de 70 kDa 8 (gen: HSPA8) de <i>Homo sapiens</i>	UniProt ID: P 11142, SEC ID nº 3	Variante de transcripción 1, ARNm, NCBI: NM_006597.4, SEC ID nº 8
AK2	Adenilato cinasa 2, gen nuclear que	Uniprot ID: 54819, SEC	Variante de transcripción 3, ARNm,

Proteína	Nombre y descripción	Referencia y secuencia de proteína	Referencia y secuencia de ácido nucleico
	codifica para proteína mitocondrial de <i>Homo sapiens</i>	ID nº 4	NCBI: NM_001199199.1, SEC ID nº 9
ANX1	Anexina A1 de <i>Homo sapiens</i>	UniProt ID: P04083, SEC ID nº 5	ARNm, NCBI: NM_000700.1, SEC ID nº 10

En la presente solicitud, las proteínas se definen mediante una secuencia de aminoácidos particular y mediante una secuencia de ácido nucleico específica correspondiente, que es preferentemente una secuencia de ácido nucleico de ARNm o ADNc. La presente invención comprende la detección de dichas proteínas o ácidos nucleicos, incluyendo cualquier variante natural de dicha proteína que presenta una secuencia seleccionada de entre grupo que consiste en SEC ID nº 1 a SEC ID nº 5, o variantes de moléculas de ácido nucleico que presentan una secuencia seleccionada de entre grupo que consiste en: SEC ID nº 6 a SEC ID nº 10. La presente invención también comprende la detección de fragmentos específicos de moléculas de ácido nucleico que presentan una secuencia correspondiente a un fragmento de una secuencia seleccionada de entre grupo que consiste en: SEC ID nº 6 a SEC ID nº 10 en los que dicho fragmento de ácido nucleico corresponde a un fragmento codificante de dicha molécula de ácido nucleico, o en los que dicho fragmento de ácido nucleico codifica para un fragmento específico de una proteína que presenta una secuencia seleccionada de entre grupo que consiste en: SEC ID nº 1 a SEC ID nº 5.

Un método según la presente invención comprende la detección de variantes de proteínas que comprenden o que presentan una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos el 80%, preferentemente el 90%, más preferentemente el 95% e incluso más preferentemente el 98% de identidad con una secuencia seleccionada de entre grupo que consiste en SEC ID nº 1 a SEC ID nº 5. La presente invención comprende la detección de variantes de ARNm que comprenden o que presentan una secuencia de nucleótidos que presenta por lo menos el 80%, preferentemente el 90%, más preferentemente el 95% e incluso más preferentemente el 98% de identidad con una secuencia seleccionada de entre grupo que consiste en SEC ID nº 6 a SEC ID nº 10. Tal como se utiliza en la presente memoria el término "identidad" en la presente memoria significa que dos secuencias de aminoácidos, o secuencias de ácido nucleico, son idénticas (es decir basándose en cada aminoácido, o en cada ácido nucleico) a lo largo del intervalo de comparación.

El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo del intervalo de comparación, determinando el número de posiciones en las que se producen los residuos de aminoácido idénticos en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en el intervalo de comparación (es decir el tamaño de intervalo) y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. El porcentaje de identidad de secuencia de una secuencia de aminoácidos también puede calcularse utilizando el software BLAST con los parámetros por defecto o definidos por el usuario. Según se aplica a polipéptidos, el término identidad sustancial significa que dos secuencias peptídicas, cuando están alineadas de manera óptima, comparten por lo menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia, preferentemente por lo menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia, más preferentemente por lo menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia o más (por ejemplo, el 99% de identidad de secuencia). Tal como se utiliza en la presente memoria, un "derivado" o "secuencia derivada de" se refiere a una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos el 80% de identidad, más preferentemente por lo menos el 90% de identidad e incluso más preferentemente por lo menos el 95% de identidad o más, tal como el 99% de identidad.

Según una forma de realización preferida, la invención comprende la determinación en una muestra biológica de la presencia o el nivel de un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, un fragmento específico de la misma, un ácido nucleico que codifica para la misma y una combinación de los mismos.

Según otra forma de realización, la invención comprende la determinación en una muestra biológica de la presencia o el nivel de un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), un fragmento específico de la misma, un ácido nucleico que codifica para la misma y una combinación de los mismos.

Según otra forma de realización, la invención comprende la determinación en una muestra biológica de la presencia o el nivel de un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), un fragmento específico de la misma, un ácido nucleico que codifica para la misma y una combinación de los mismos.

Según otra forma de realización, la invención comprende la determinación en una muestra biológica de la presencia o el nivel de un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: adenilato cinasa (AK2), un fragmento específico de la misma, un ácido nucleico que codifica para la misma y una combinación de los mismos.

Según otra forma de realización, la invención comprende la determinación en una muestra biológica de la presencia o el nivel de un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: anexina A1 (ANX1), un fragmento específico de la misma, un ácido nucleico que codifica para la misma y una combinación de los mismos.

5

Según otra forma de realización preferida, la invención comprende la determinación en una muestra biológica de la presencia o el nivel de:

10 - al menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, un fragmento específico de la misma, un ácido nucleico que codifica para la misma y una combinación de los mismos, y

15 - al menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2), anexina A1 (ANX1), un fragmento específico de las mismas, un ácido nucleico que codifica para las mismas y una combinación de los mismos.

Según otra forma de realización preferida, la invención comprende la determinación en una muestra biológica de la presencia o el nivel de:

20

- al menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), un fragmento específico de la misma, un ácido nucleico que codifica para la misma y una combinación de los mismos, y

25

- al menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2), anexina A1 (ANX1), un fragmento específico de las mismas, un ácido nucleico que codifica para las mismas y una combinación de los mismos.

30

Según otra forma de realización preferida, la invención comprende la determinación en una muestra biológica de la presencia o el nivel de:

35 - al menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), un fragmento específico de la misma, un ácido nucleico que codifica para la misma y una combinación de los mismos, y

40 - al menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), adenilato cinasa (AK2), anexina A1 (ANX1), un fragmento específico de las mismas, un ácido nucleico que codifica para las mismas y una combinación de los mismos.

Según otra forma de realización preferida, la invención comprende la determinación en una muestra biológica de la presencia o el nivel de:

45

- al menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: adenilato cinasa (AK2), un fragmento específico de la misma, un ácido nucleico que codifica para la misma y una combinación de los mismos, y

50 - al menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1) y proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), anexina A1 (ANX1), un fragmento específico de las mismas, un ácido nucleico que codifica para las mismas y una combinación de los mismos.

Según otra forma de realización preferida, la invención comprende la determinación en una muestra biológica de la presencia o el nivel de:

55 - al menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: anexina A1 (ANX1), un fragmento específico de la misma, un ácido nucleico que codifica para la misma y una combinación de los mismos, y

60

- al menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2), un fragmento específico de las mismas, un ácido nucleico que codifica para las mismas y una combinación de los mismos.

65

Según una forma de realización particular, un método según la invención comprende la determinación en una

muestra biológica de la presencia o el nivel de por lo menos dos compuestos, siendo dichos compuestos proteínas seleccionadas de entre grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, adenilato cinasa (AK2), anexina A1 (ANX1), ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70) un fragmento específico de las mismas, un ácido nucleico que codifica para las mismas y una combinación de los mismos.

5

Según una forma de realización particular, un método según la invención comprende la determinación en una muestra biológica de la presencia o el nivel de por lo menos tres compuestos, siendo dichos compuestos proteínas seleccionadas de entre grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, adenilato cinasa (AK2), anexina A1 (ANX1), ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), un fragmento específico de las mismas, un ácido nucleico que codifica para las mismas y una combinación de los mismos

10

Según una forma de realización particular, un método según la invención comprende la determinación en una muestra biológica de la presencia o el nivel de por lo menos cuatro compuestos, siendo dichos compuestos proteínas seleccionadas de entre grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, adenilato cinasa (AK2), anexina A1 (ANX1), ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), un fragmento específico de las mismas, un ácido nucleico que codifica para las mismas y una combinación de los mismos.

15

20

Según una forma de realización particular, un método según la invención comprende la determinación en una muestra biológica de la presencia o el nivel de cinco compuestos, siendo dichos compuestos proteínas del grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, adenilato cinasa (AK2), anexina A1 (ANX1), ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70) un fragmento específico de las mismas, un ácido nucleico que codifica para las mismas y una combinación de los mismos.

25

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un método para la determinación de la radiosensibilidad de un sujeto, que comprende las etapas de:

30

a) inducir un estrés exógeno en una muestra de prueba biológica que comprende linfocitos de dicho sujeto,

b) determinar el nivel de apoptosis inducida en dicha muestra de prueba biológica,

35

c) inducir un estrés exógeno en una muestra de prueba biológica del mismo sujeto y determinar la presencia o el nivel de por lo menos un compuesto, en el que dicho compuesto se elige del grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2), anexina 1 (ANX1), un fragmento específico de las mismas, un ácido nucleico que codifica para las mismas y una combinación de los mismos,

40

d) comparar la presencia o el nivel de dicho por lo menos un compuesto con la presencia o el nivel de los mismos compuestos en una muestra de referencia, y

45

e) determinar, a partir del nivel de apoptosis inducida de la etapa b) y a partir de la comparación de la etapa d), la radiosensibilidad de dicho sujeto.

Según esta forma de realización particular, un método según la invención comprende la detección de apoptosis de linfocitos inducida mediante un estrés exógeno y la determinación de la radiosensibilidad de un sujeto según un método de la invención. En una forma de realización más particular de la invención, se induce apoptosis de linfocitos mediante radiaciones ionizantes. En una forma de realización incluso más particular, la detección de apoptosis de linfocitos inducida por radiación se realiza mediante un ensayo de RILA tal como se describe en Ozsahin *et al.* (2005). En otra forma de realización particular, se detecta apoptosis mediante un método elegido en la detección de fragmentación de ADN (ensayo cometa, ensayo TUNEL) y la detección de ruta mitocondrial (detección de caspasa 3, detección de citocromo C).

50

55

En una forma de realización particular, la detección de apoptosis de linfocitos y la determinación de la radiosensibilidad de un sujeto según un método de la invención se realizan en diferentes muestras biológicas del mismo sujeto. En otra forma de realización particular, la detección de apoptosis de linfocitos y la determinación de la radiosensibilidad de un sujeto según un método de la invención se realizan en muestras biológicas de la misma naturaleza, por ejemplo un extracto de glóbulos blancos de la sangre. En una forma de realización incluso más particular, el método según la invención y un ensayo de RILA se realizan en diferentes fracciones de la misma muestra biológica que comprende linfocitos del sujeto.

60

En otra forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para predecir *in vitro* la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía en un sujeto, que comprende:

65

- un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto según la invención, y
- una etapa de predecir la susceptibilidad a toxicidad radioinducida tardía de dicho sujeto si dicho por lo menos un compuesto está presente en dicha muestra de prueba biológica y ausente en dicha muestra de referencia y/o si el nivel de dicho por lo menos un compuesto en dicha muestra de prueba biológica es superior al nivel de los mismos compuestos en dicha muestra de referencia.

La presente invención se refiere a un método para determinar la radiosensibilidad, o sensibilidad a radiación, de tejidos y/o células de un sujeto, en el que los tejidos y/o células sometidos a radiación ionizante comprenden tejidos y/o células seleccionados específicamente como diana por la irradiación, y también tejidos y/o células normales o "sanos" que no se seleccionan específicamente como diana por la radioterapia pero que están incluidos en el volumen irradiado de tejidos y/o células. En una forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para determinar la radiosensibilidad, o sensibilidad a radiación, de tejidos sanos del paciente, en el que "tejidos (o células) sanos" se definen como tejidos (o células) no seleccionados específicamente como diana por la radioterapia. Dichos "tejidos sanos" se refieren a tejidos o células adyacentes al, o que rodean el, tejido diana. Pueden aparecer "efectos secundarios tardíos" o "efectos secundarios a largo plazo" o "toxicidad tardía" comenzando de 3 a 6 meses tras la irradiación. Los síntomas son múltiples, incluyendo con frecuencia fibrosis, necrosis tisular, atrofia, daño vascular y, en casos muy intensos, cánceres inducidos por radiación y muestran empeoramiento a lo largo del tiempo, incluso 20-34 años tras la radioterapia (Lacombe *et al.*, 2013). En un aspecto particular, la toxicidad tardía es inflamación pulmonar inducida por radiación.

En una forma de realización particular, un método según la invención permite la detección de pacientes propensos a verse afectados por radio-hipersensibilidad tardía. La intensidad de los síntomas de toxicidad tardía se clasifica según grados. En un aspecto particular, un método según la invención permite la determinación de radiosensibilidad tardía de grado 2 y superior (grado 3 y más).

Según una forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto, comprendiendo dicho método:

- la determinación de la presencia o el nivel de por lo menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: IDH2, APEX1, HSC70, AK2 y ANX1, un fragmento específico de las mismas, un ácido nucleico que codifica para las mismas y una combinación de los mismos,
- al menos otro método predictivo de radiosensibilidad tal como se describe en la técnica anterior. Dicho otro método predictivo es posiblemente, pero no se limita a, un ensayo de RILA o un ensayo de detección de SNP.

Según una forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto, que comprende:

- la determinación de la presencia o el nivel de IDH2, un fragmento específico de la misma, un ácido nucleico que codifica para la misma y una combinación de los mismos,
- al menos otro método predictivo de radiosensibilidad, preferentemente un ensayo de RILA o un ensayo de detección de SNP (Azria *et al.*, 2008).

Según otra forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto, que comprende:

- la determinación de la presencia o el nivel de IDH2, un fragmento específico de la misma, un ácido nucleico que codifica para la misma y una combinación de los mismos,
- la determinación de la presencia o el nivel de por lo menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: APEX1, HSC70, AK2 y ANX1, un fragmento específico de las mismas, un ácido nucleico que codifica para las mismas y una combinación de los mismos,
- al menos otro método predictivo de radiosensibilidad, preferentemente un ensayo de RILA o un ensayo de detección de SNP.

Según otra forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto, que comprende:

- la determinación de la presencia o el nivel de: 1) IDH2, un fragmento específico de la misma o un ácido nucleico que codifica para la misma, 2) APEX1, un fragmento específico de la misma o un ácido nucleico que codifica para la misma, 3) HSC70, un fragmento específico de la misma o un ácido nucleico que

codifica para la misma, 4) AK2, un fragmento específico de la misma o un ácido nucleico que codifica para la misma, 5) ANX1, un fragmento específico de la misma o un ácido nucleico que codifica para la misma, y

- 5 - al menos otro método predictivo de radiosensibilidad, preferentemente un ensayo de RILA o un ensayo de detección de SNP.

10 En una forma de realización particular, un método para la determinación de la radiosensibilidad según la invención se realiza en una muestra biológica de un sujeto para el que se conocen los resultados de una prueba de apoptosis de linfocitos inducida. En una forma de realización más particular, un método para la determinación de la radiosensibilidad según la invención se realiza en una muestra biológica de un sujeto para el que los resultados de ensayo de RILA son indicativos de un nivel bajo de apoptosis inducida, y preferentemente una apoptosis inducida inferior al 16%.

15 En un aspecto de la invención, la presente invención se refiere a un método en el que dicho estrés exógeno se induce mediante por lo menos un método seleccionado de entre los siguientes: irradiación y puesta en contacto con por lo menos un agente radiomimético. En una primera forma de realización particular, dicho estrés exógeno se genera mediante irradiación. En otra forma de realización particular, dicho estrés exógeno se genera mediante puesta en contacto con por lo menos un agente radiomimético. En otra forma de realización particular, dicho estrés exógeno se genera mediante una irradiación y mediante puesta en contacto con por lo menos un agente radiomimético.

20 En una forma de realización más particular, dicho estrés exógeno se induce mediante una irradiación, en la que la dosis de irradiación está comprendida entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 16 Gy, preferentemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 14 Gy, más preferentemente superior a aproximadamente 4 Gy, preferentemente entre aproximadamente 4 y aproximadamente 12 Gy, preferentemente entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10 Gy, y más preferentemente de aproximadamente 8 Gy. El término "aproximadamente" significa una variación posible de +/-10% en la dosis administrada. En un método según la invención, se irradian muestras biológicas mediante rayos X a 8 Gy.

30 En una forma de realización particular, las muestras reciben 8 Gy con un caudal de dosis de 1 Gy/min. Los parámetros utilizados para la irradiación son indicativos y pueden adaptarse por los expertos en la materia según su práctica y el dispositivo utilizado para aceleración lineal. En una forma de realización particular, se realiza irradiación a través de una placa de cultivo celular de 6 pocillos de poliestireno de 15 mm de grosor. Se irradian muestras mediante un haz de 6 MV, con una distancia de fuente a superficie de 145 cm y un campo de irradiación de 25 x 25 cm en el colimador. Como ejemplo, para suministrar una dosis de 8 Gy, cuando se utiliza un acelerador lineal "GE Saturne 43", tiene que suministrarse una dosis de 1520 UM (unidades de monitor) por el acelerador, mientras que utilizando un acelerador lineal "Varian", tiene que suministrarse una dosis de 1600 UM por el acelerador.

40 En otra forma de realización particular, dicho estrés exógeno se induce mediante puesta en contacto de la muestra con por lo menos un agente radiomimético. Un "agente radiomimético" es una sustancia que induce efectos sobre células que son similares a los provocados por radiaciones ionizantes, puede considerarse que un agente radiomimético "imita" por lo menos una parte de los efectos de radiaciones ionizantes sobre células. Como ejemplos no limitativos, un agente radiomimético puede provocar roturas de ADN monocatenarias y/o bicatenarias o puede conducir a la presencia de radicales libres en la célula. En una forma de realización particular, se pone la muestra en contacto con un único agente radiomimético. En otra forma de realización particular, se pone la muestra en contacto con dos o más agentes radiomiméticos, utilizándose dichos agentes de manera simultánea o sucesiva. Un agente radiomimético que puede utilizarse para un método según la invención puede elegirse del grupo que consiste en: afidicolina, bleomicina, antibióticos de enodiino y peróxido de hidrógeno. Se sabe que la bleomicina provoca roturas de ADN mono o bicatenarias, mientras que se sabe que el peróxido de hidrógeno induce radicales libres. Un método según la invención no se limita a la utilización de un agente radiomimético particular y un experto en la materia elegirá fácilmente el agente adaptado para poner en práctica un método particular según la invención. Según dicha forma de realización particular, dicha puesta en contacto con un agente radiomimético se realiza siguiendo condiciones tal como se describe en Kennedy *et al.* (2006), Adema *et al.* (2003), Cloos J *et al.* (1999) o Tedeschi *et al.* (2004). En una forma de realización particular, la apoptosis de linfocitos en un método según la invención se induce mediante puesta en contacto con un agente radiomimético tal como se describe en la presente solicitud.

60 En un aspecto de la invención, un método según la invención comprende la preparación de una muestra biológica, eligiéndose dicha muestra del grupo que consiste en: sangre completa, extracto de sangre completa que contiene células, extracto de sangre completa que contiene glóbulos blancos, extracto de sangre completa que contiene linfocitos y extracto de sangre completa que contiene linfocitos T CD4+ y/o CD8+.

65 Los extractos de sangre completa que contienen células se preparan según métodos bien conocidos por los expertos en la materia de la manipulación de muestras de sangre para pruebas biológicas. Tal método puede

incluir, por ejemplo, separación de constituyentes de la sangre en gradientes de Ficoll, método de separación rápida de células sanguíneas utilizando *RosetteSep*TM de StemCell o utilizando un citómetro de flujo.

5 Un método según la presente invención comprende la preparación de muestras biológicas y la inducción de un estrés exógeno en una fracción de dicha muestra.

En una forma de realización más particular, la presente invención se refiere a un método en el que se preparan muestras biológicas según el siguiente método:

- 10 a) aislar linfocitos a partir de dicho extracto de sangre completa,
b) irradiar dichos linfocitos aislados de la etapa a), y
c) extraer proteínas a partir los linfocitos de la etapa b).

15 En una forma de realización más particular, la presente invención se refiere a un método en el que la presencia o el nivel de por lo menos un compuesto se determina mediante por lo menos un método seleccionado de entre grupo que consiste en: un método basado en inmunodetección, un método basado en inmunotransferencia de tipo Western, un método basado en cromatografía, y preferentemente cromatografía de líquidos, un método basado en espectrometría de masas, un método basado en citometría de flujo y un método para detección específica de ácido nucleico.

20 Estos métodos son bien conocidos por un experto en la materia de la detección y cuantificación de compuestos, y particularmente proteínas, en los que la presencia y nivel de expresión de proteínas puede determinarse directamente o analizarse a nivel de ácido nucleico detectando, y preferentemente cuantificando, ácidos nucleicos específicos de proteína, y particularmente ARNm.

25 En una primera etapa, se aíslan proteínas y/o ácidos nucleicos a partir de la muestra biológica. Un método según la invención puede incluir extracción, purificación y caracterización de proteínas, utilizando métodos de bioquímica bien conocidos.

30 Los métodos para la detección específica de una proteína basándose en espectrometría de masas incluyen, pero no se limitan a, monitorización de reacción seleccionada (SRM) y monitorización de múltiples reacciones (MRM). Los métodos basados en citometría de flujo incluyen, pero no se limitan a, un ensayo multiplex tal como Luminex[®]XMAP, que combina citometría de flujo con microesferas y láseres.

35 Los métodos para la detección específica de ácidos nucleicos implican métodos para analizar ADN y ARN, particularmente ARNm. Los métodos utilizados de manera clásica en biología molecular los conocen bien los expertos en la materia del análisis de ácidos nucleicos y se describen completamente en la bibliografía (Maniatis T. *et al.*, edición 1999). Las moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de ácido nucleico que presentan por lo menos el 80% de identidad con una secuencia seleccionada de entre grupo que consiste en
40 SEC ID nº 6 a SEC ID nº 10 son preferentemente secuencias que codifican para las mismas secuencias de aminoácidos, en relación con la degeneración del código genético, o secuencias complementarias que pueden hibridarse específicamente con una secuencia seleccionada de entre grupo que consiste en SEC ID nº 6 a SEC ID nº 10 en condiciones de fuerte rigurosidad. Condiciones de fuerte rigurosidad significa que las condiciones de temperatura y fuerza iónica se seleccionan para permitir la hibridación mantenida entre dos moléculas de ácido
45 nucleico complementarias o fragmentos. En una forma de realización, un método según la invención comprende la utilización de secuencias oligonucleotídicas cortas que pueden hibridarse específicamente a moléculas de ARNm de SEC ID nº 6 a SEC ID nº 10.

50 En una forma de realización particular, un método según la invención comprende la extracción de ARN a partir de la muestra biológica. Tras la extracción con reactivo Trizol, se realizan respuestas transcripcionales por todo el genoma mediante secuenciación de ejecución global. Un análisis transcriptómico mediante secuenciación de ARN (sec. ARN) permite la cuantificación de transcriptos. sec. ARN permite la detección de transcriptos de corte y empalme alternativo así como de SNP. Adicionalmente, además de los genes codificantes modulados de manera transcripcional, puede realizarse un seguimiento de genes no codificantes tales como los que producen
55 ARN no codificantes largos o microARN.

En una forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto o para predecir la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía en un sujeto, comprendiendo dicho método la detección de la presencia o el nivel de por lo menos dos de las proteínas
60 seleccionadas de entre grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2), y anexina 1 (ANX1).

65 En otra forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto o para predecir *in vitro* la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía en un sujeto, comprendiendo dicho método la detección de la presencia o el nivel de isocitrato deshidrogenasa 2

(IDH2) mitocondrial y ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1). En otra forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto o para predecir la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía en un sujeto, comprendiendo dicho método la detección de la presencia o el nivel de isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial y de proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70). En otra forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto o para predecir la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía en un sujeto, comprendiendo dicho método la detección de la presencia o el nivel de isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial y de adenilato cinasa (AK2). En otra forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto o para predecir la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía en un sujeto, comprendiendo dicho método la detección de la presencia o el nivel de isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial y de anexina 1 (ANX1).

En otra forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto o para predecir la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía en un sujeto, comprendiendo dicho método la detección de la presencia o el nivel de por lo menos tres de las proteínas seleccionadas de entre grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2), y anexina 1 (ANX1).

En otra forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto o para predecir la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía en un sujeto, comprendiendo dicho método la detección de la presencia o el nivel de las cinco proteínas del grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2), y anexina 1 (ANX1).

Según la presente invención, el método permite la detección de la radiosensibilidad de un sujeto que está afectado por una enfermedad propensa a tratarse mediante radioterapia. En una forma de realización particular, dicha enfermedad se selecciona del grupo no limitativo que consiste en: cáncer, enfermedad de Basedow (o enfermedad de Grave), hipertiroidismo, adenoma de hipófisis (o adenoma), meningioma y talalgia.

En una forma de realización particular, un método según la invención permite determinar la radiosensibilidad de un sujeto afectado por cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello.

Según un aspecto particular, la presente invención se refiere a la utilización de por lo menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2), y anexina 1 (ANX1) o una combinación de los mismos, como marcadores para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto o para predecir la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía.

Según otra forma de realización, la presente invención se refiere a la utilización de isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial y de por lo menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: APEX1, HSC70, AK2 y ANX1 o una combinación de los mismos, como marcadores para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto o para predecir la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía de un sujeto.

En una forma de realización más particular, la presente invención se refiere a la utilización de por lo menos dos compuestos seleccionados de entre que consiste en: IDH2, APEX1, HSC70, AK2 y ANX1 o una combinación de los mismos, como marcadores para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto o para predecir la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía. En una forma de realización incluso más particular, la presente invención se refiere a la utilización de por lo menos tres compuestos seleccionados de entre que consiste en: IDH2, APEX1, HSC70, AK2 y ANX1 o una combinación de los mismos, como marcadores para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto, o para predecir la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía en un sujeto. En otra forma de realización particular, la presente invención se refiere a la utilización de por lo menos cuatro compuestos seleccionados de entre que consiste en: IDH2, APEX1, HSC70, AK2 y ANX1 como marcadores para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto, o para predecir la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía en un sujeto. En una forma de realización incluso más particular, la presente invención se refiere a la utilización de a combinación de IDH2, APEX1, HSC70, AK2 y ANX1 como marcadores para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto, o para predecir la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía en un sujeto.

Según otra forma de realización, la presente invención se refiere a la utilización de a por lo menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: IDH2, APEX1, HSC70, AK2 y ANX1, o una combinación de los mismos, como marcadores para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto, o para predecir la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía en un sujeto, en un método según la invención.

Según otra forma de realización particular, la presente invención se refiere a un kit que puede utilizarse para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto o para predecir la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía en un sujeto, comprendiendo dicho kit por lo menos un reactivo para la detección específica de por lo menos un compuesto seleccionado de entre grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2), y anexina 1 (ANX1), y un reactivo para la inducción y/o la detección de apoptosis celular. Un agente para la detección de apoptosis celular puede ser cualquier agente utilizado en un método de este tipo por un experto en la materia. Ejemplos de métodos y agentes que pueden utilizarse para la detección de apoptosis celular son la detección de fragmentación de ADN (ensayo cometa, ensayo TUNEL), detección de ruta mitocondrial (detección de caspasa 3, detección de citocromo C), anexina A5.

En dicha forma de realización particular, un reactivo para la detección específica de por lo menos uno de los compuestos seleccionados de entre que consiste en: IDH2, APEX1, HSC70, AK2 y ANX1 en un kit según la invención es un anticuerpo o un ligando específico para una de dichas proteínas, incluyendo sus variantes naturales, o de un fragmento específico de las mismas. En otra forma de realización particular, un reactivo para la detección específica de por lo menos uno de los compuestos seleccionados de entre que consiste en: IDH2, APEX1, HSC70, AK2 y ANX1 en un kit según la invención es una molécula de ácido nucleico que puede unirse específicamente a una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína seleccionada de entre grupo que consiste en: IDH2, APEX1, HSC70, AK2 y ANX1, o para un fragmento de las mismas.

En una forma de realización más específica, un reactivo para la detección específica de por lo menos IDH2, APEX1, HSC70, AK2 y ANX1 en un kit según la invención es un ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada de entre grupo que consiste en SEC ID nº 6 a SEC ID nº 10, o un fragmento de la misma que codifica para un fragmento específico de IDH2, APEX1, HSC70, AK2 o ANX1.

En una forma de realización más específica, la presente invención se refiere a un kit que comprende por lo menos un reactivo para la detección específica de IDH2 y reactivos para la detección específica de por lo menos APEX1, HSC70, AK2 y ANX1, o un fragmento específico de las mismas

En una forma de realización más particular, la presente invención se refiere a un kit que comprende por lo menos reactivos para la detección específica de por lo menos dos de los compuestos seleccionados de entre que consiste en: IDH2, APEX1, HSC70, AK2 y ANX1, o un fragmento específico de las mismas

En una forma de realización más particular, la presente invención se refiere a un kit que comprende por lo menos reactivos para la detección específica, respectivamente, de por lo menos tres de los compuestos seleccionados de entre que consiste en: IDH2, APEX1, HSC70, AK2 y ANX1, o un fragmento específico de las mismas.

En una forma de realización más particular, la presente invención se refiere a un kit que comprende por lo menos reactivos para la detección específica, respectivamente, de por lo menos cuatro de los compuestos seleccionados de entre que consiste en: IDH2, APEX1, HSC70, AK2 y ANX1, o un fragmento específico de las mismas.

En una forma de realización incluso más particular, la presente invención se refiere a un kit que comprende por lo menos reactivos para la detección específica, respectivamente, de los siguientes compuestos: IDH2, APEX1, HSC70, AK2 y ANX1, o un fragmento específico de las mismas.

Los siguientes ejemplos se proporcionan en la presente memoria únicamente a título ilustrativo y no limitativo a menos que se especifique lo contrario.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: representación esquemática del protocolo para la identificación de proteínas asociadas con radiotoxicidad tardía a partir de una extracción de sangre completa de cuatro pacientes. Paciente 1: toxicidad superior a grado 2 en el mes 36 tras la radioterapia (RT). Paciente 2: toxicidad superior a grado 2 en el mes 48 tras RT. Paciente 3: sin toxicidad en el mes 48 tras RT. Paciente 4: sin toxicidad en el mes 54 tras RT.

Figura 2: Validación del nivel de expresión de AK2, ANX1, HSC70, IDH2 y APEX1 dependiendo de la radiotoxicidad tardía observada. B-actina es un control de la cantidad de proteínas. Panel izquierdo: análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de extractos de proteínas de pacientes para los que el resultado del ensayo de RILA (=TALRI en la figura) era inferior al 16% y toxicidad superior a toxicidad de grado 2. Panel central: análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de extractos de proteínas de pacientes para los que el resultado del ensayo de RILA era inferior al 16% y toxicidad inferior a toxicidad de grado 2. Panel derecho: análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de extractos de proteínas de pacientes para los que el resultado del ensayo de RILA era superior al 16% y toxicidad inferior a toxicidad de grado 2.

Figura 3: detección cuantitativa de AK2, ANX1, HSC70, IDH2 y APEX1. Representación en histograma del nivel de proteína en extractos de pacientes que padecen toxicidad inferior a grado dos (panel izquierdo claro) y de pacientes que padecen toxicidad superior a grado dos (panel derecho oscuro), para, respectivamente de izquierda a derecha, AK2, ANX1, HSC70, IDH2 y APEX1.

Figura 4: representación esquemática del protocolo de prueba para detectar la presencia de los biomarcadores.

Figuras 5A y 5B: detección de proteínas en fibrosis inducida

Figura 5A: análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de la expresión de CTGF, α -sm actina, HSC70, APEX1 en tejidos tras el contacto, o no, con TGF β 1 inductor de fibrosis.

Figura 5B: representación en histograma de la expresión de CTGF, α -sm actina, HSC70, APEX1 en tejidos tras el contacto, o no, con TGF β 1 inductor de fibrosis.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo de apoptosis de linfocitos

Se desarrolló anteriormente un ensayo rápido y reproducible denominado RILA (apoptosis de linfocitos inducida por radiación) que mide la apoptosis en linfocitos T CD4 y CD8 tras la irradiación (0.5-8 Gy) mediante citometría de flujo. Esta medición se basa en la disminución de la fluorescencia de ADN nuclear debido a cambios de cromatina específicos que acompañan a la apoptosis. Se utilizó RILA como factor de estratificación principal en un estudio aleatorizado de fase II en cáncer de mama temprano tras cirugía conservadora en comparación con radioterapia posoperatoria o bien de manera concomitante o bien de manera secuencial con letrozol en 150 pacientes, siendo el criterio de valoración primario la fibrosis de mama (Azria *et al.*, 2010). No se encontró que ningún paciente con una RILA >16% mostrara efectos tardíos inducidos por radiación, lo que indica el alto valor predictivo negativo de esta prueba. Todos los pacientes con fibrosis subcutánea de grado 2 o peor presentaban una RILA <16%, lo que confirma el valor predictivo de la prueba. Sin embargo, entre los pacientes con una RILA <16%, el 20% padecieron radiotoxicidad tardía y el 80% no, lo que indica un valor predictivo positivo débil para RILA. La sensibilidad del ensayo de RILA es de 0.70, mientras que la especificidad de esta prueba es inferior a 0.50. Se seleccionaron cuatro pacientes tratados para cáncer de mama, y con un valor de RILA bajo, a partir del estudio prospectivo mencionado anteriormente. Dos pacientes desarrollaron una toxicidad de fibrosis intensa (superior a grado 2) (pacientes n.º 1 y n.º 2), mientras que pacientes no tuvieron ninguna toxicidad por lo menos cuatro años tras el final del tratamiento por radioterapia (pacientes n.º 3 y n.º 4).

Ejemplo 2: Identificación de marcadores predictivos de citotoxicidad inducida tardía

El protocolo para identificar marcadores predictivos se esquematiza en la figura 1. A partir de las cuatro pacientes anteriormente mencionadas, se recogieron 40 ml de sangre total en tubos heparinizados. Se aislaron linfocitos T a partir de sangre completa mediante selección negativa utilizando roseta (RosetteSep®, StemCell Technology) según las instrucciones del fabricante, seguido por un gradiente de Ficoll (GE Healthcare). Después se cultivaron los linfocitos in medio RPMI con FCS al 10% durante 24 h a 37°C y CO₂ al 5%. Después se irradió la mitad de los linfocitos *in vitro* a 8 Gy. Después se cultivaron de nuevo los linfocitos irradiados y no irradiados a 37°C y CO₂ al 5% durante 48 h. Tras este tiempo de incubación, después se sometieron linfocitos de cada paciente a fraccionamiento subcelular (kit de extracción de proteoma subcelular ProteoExtract® (n.º de cat. 539790), Merckmillipore) permitiendo aislar fracciones de citosol, membrana y nuclear. Después se analizó cada una de estas fracciones utilizando un flujo de trabajo de proteómica cuantitativo utilizando un marcaje con iTRAQ 8-plex. Tras varios fraccionamientos para optimizar la resolución del análisis (fraccionamiento Offgel seguido por nanocromatografía de líquidos), se identificaron las proteínas mediante espectrometría de masas en tándem (4800 plus MALDI TOF/TOF).

En resumen, se redujeron 50 μ g de proteínas de cada paciente, de linfocitos irradiados y no irradiados, se alquilaron y se trataron con tripsina antes de marcarse con una etiqueta de iTRAQ. Para cada fracción (citosol, membrana y nuclear), se combinaron los 8 marcajes para cada paciente, incluyendo fracciones con linfocitos irradiados y no irradiados, y se fraccionaron mediante isoelectroenfoque en un tipo de medio líquido Offgel (dispositivo de fraccionamiento Agilent 3100 Offgel). De este modo se obtienen 12 fracciones secundarias. Después se separa cada una de estas fracciones secundarias mediante nanocromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa (HPLC) (Ultimate 3000 LC Systems, Dionex) acoplada a un autómata de marcación de puntos. Después se ponen las 12 fracciones secundarias de Offgel, con 600 puntos para cada una, en placas de MALDI. Se realizó HPLC por duplicado. Se utilizaron 8 placas de MALDI para cada fracción (citosol, membrana y nuclear), conduciendo a un total de 24 placas. Después se realizó la identificación mediante espectrometría de masas en un sistema MALDI TOF/TOF® 4800 Proteomics Analyzer d'AbSciex. Se adquirieron espectros de m/z 700-1400 en un modo positivo, utilizando 1500 impulsos de láser. Los iones precursores de los diez péptidos

más abundantes, con una relación señal/ruido superior o igual a 50, se seleccionan para un análisis de EM/EM utilizando 3500 impulsos de láser de m/z 300-1500. Se comparan espectros de EM/EM con la base de datos de proteínas Uniprot (uniprot_sprot300108) del European Institute for Bioinformatics, utilizando el software ProteinPilot® 2.0 y el método Paragon (Ab Sciex, Software versión 50861). Se considera que se identifican de manera positiva las proteínas correspondientes a un único péptido con un alto intervalo de confianza (>95%).

Resultados:

Se realizó una comparación de razones entre proteínas expresadas de manera diferencial a 0 Gy y 8 Gy entre las dos pacientes que habían desarrollado una toxicidad tardía y las dos pacientes sin ningún efecto tóxico. Se identificaron más de 1300 proteínas totales con alta confianza (95%, un único péptido). A 0 Gy, 135 proteínas se expresaban de manera diferencial entre pacientes con o sin toxicidad radioinducida intensa ($p < 0.05$). En linfocitos T irradiados (8 Gy), 107 proteínas se expresaban de manera diferencial entre pacientes con o sin toxicidad radioinducida intensa ($p < 0.05$). Las proteínas seleccionadas para la etapa de validación son las expresadas de manera diferencial a 8 Gy, con la mayor razón de expresión de proteínas (>1.5) y que no mostraron diferencia de razón de expresión en controles a 0 Gy.

Se han seleccionado cinco proteínas para validación consecutiva: isocitrato deshidrogenasa 2 (NADP+) (IDH2), ADN-(sitioapurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa 2 (AK2) y anexina 1 (ANX1). Estas proteínas están implicadas en varios mecanismos incluyendo metabolismo y producción de energía, apoptosis, proteína de unión a calcio y reparación de daños del ADN.

Ejemplo 3: Confirmación de la expresión diferencial de biomarcadores en un número mayor de pacientes tras la radioterapia.

Se validaron estas cinco proteínas mediante análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western en una población adicional de 18 pacientes, habiendo desarrollado 5 pacientes una fibrosis de mama de grado ≥ 2 y habiendo desarrollado 13 pacientes sólo toxicidad débil o sin toxicidad. Las 10 pacientes presentaban un valor de RILA bajo. Se extrajeron muestras de sangre y se trataron tal como se describió en el ejemplo anterior, hasta la incubación tras la irradiación. Después se sometieron linfocitos a lisis en un tampón de RIPA. Después se cuantificaron las proteínas y después se pusieron 10 μg de cada una en un gel de poliacrilamida al 12% para una inmunotransferencia de tipo Western. Tras la migración y transferencia en una membrana de PVDF durante 1 h a 300 mA a 4°C, después se saturó la membrana durante 2 horas en PBS-Tween al 0.05% - leche al 5% y se incubaron los anticuerpos contra las proteínas de interés durante la noche a 4°C con agitación en el mismo tampón de saturación. Tras 5 lavados sucesivos de 5 min en tampón de PBS-Tween al 0.05%, después se añadió el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente en un tampón de PBS-Tween al 0.05%. Tras otros 5 lavados de 5 min en tampón de PBS-Tween al 0.05%, se realizó un revelado mediante ECL.

Resultados:

Los resultados muestran que estas cinco proteínas se sobreexpresaron en linfocitos T irradiados de los pacientes que habían experimentado toxicidad intensa en comparación con pacientes sin toxicidad tardía (figura 2). El análisis de expresión cuantitativa confirmó la significación estadística de estas diferencias (tabla 2 y figura 3).

Tabla 2

	Mediana, [mín-máx]				Valor de P		
	Tox <gr. 2; RILA <16% (n=5) [1]	Tox <gr. 2; RILA >16% (n=8) [2]	Tox <gr. 2; (n=13) [1]+[2]	Tox \geq gr. 2 (n=5) [3]	[1] frente a [3]	[2] frente a [3]	[1]+[2] frente a [3]
AK2	0.22, [0.08 - 0.69]	0.23, [0.07 - 0.85]	0.23, [0.07 - 0.85]	0.76, [0.26 - 1.06]	0.016	0.030	0.007
ANX1	0.18, [0.07 - 0.32]	0.38, [0.09 - 0.83]	0.30, [0.07 - 0.83]	0.69, [0.34 - 0.93]	0.002	0.037	0.004
HSC70	0.12, [0.07 - 0.17]	0.26, [0.08 - 0.74]	0.20, [0.07 - 0.74]	0.33, [0.10 - 0.42]	0.045	0.127	0.046
IDH2	0.09, [0.07 - 0.11]	0.23, [0.08 - 0.69]	0.18, [0.07 - 0.69]	0.58, [0.34 - 0.80]	0.004	0.009	0.002
APEX1	0.34, [0.11 - 0.53]	0.71, [0.14 - 1.88]	0.56, [0.11 - 1.88]	0.87, [0.72 - 1.12]	0.001	0.489	0.059

Como conclusión, los cinco biomarcadores identificados permiten distinguir entre pacientes que se identificaron inicialmente como propensos a radiosensibilidad, con una RILA débil. Por tanto, la presente prueba no sólo confirma los resultados de RILA sino que además demuestra una mayor capacidad de distinción.

Ejemplo 4: Análisis proteómico de muestras de pacientes

Extracción de muestras: se extrajeron 21 ml de sangre completa heparinizada de cada paciente, preferentemente antes de iniciar la radioterapia.

5 *Separación de linfocitos T:* inmediatamente se purificaron linfocitos T mediante selección negativa utilizando el sistema complejo tetramérico de roseta (RosetteSep, StemCell Technologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este protocolo permite la recuperación de 7.5 a 15 millones de células por paciente.

10 *Cultivo celular primario de linfocitos T:* se cultivan linfocitos T purificados en dos placas que contienen medio RPMI 1640 (Gibco BRL Invitrogen) complementado con FCS al 10% durante 24 h.

15 *Irradiación de cultivo celular de linfocitos T:* para cada paciente, se irradia una placa de cultivo celular a 8 Gy y se incubaba durante 48 horas. La otra placa de cultivo celular se somete a irradiación simulada y se considera como control (0 Gy).

20 *Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western:* se extraen proteínas de linfocitos T mediante tampón de RIPA de dos tercios de las células (un tercio puede almacenarse para estudios complementarios). Se cuantifican los lisados celulares utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (ThermoFisherScientific, Rockford, IL) según el protocolo del fabricante. Después se cargan diez microgramos de proteínas y se separan en SDS-PAGE al 12% y después se transfieren a una membrana de PVDF. Se bloquea la unión no específica a la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con leche desnatada al 5%. Se incuban las membranas durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos de la siguiente manera: AK2 (1/100, sc-28786; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA), anexina 1 (1/100, sc-11387; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA), HSC70 (1/200, sc-7298; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA), IDH2 (1/100, sc-134923; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA) y Ref-1 (1/200, sc-5572; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA). Después se incuban las membranas con anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (H+L), G21234; Invitrogen para AK2, anexina 1, IDH2, Ref-1 y anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H+L), 115-035-146; Jackson ImmunoResearch para HSC70) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se revelan las inmunotransferencias utilizando el sistema de detección por quimioluminiscencia potenciada con la utilización de un kit de sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce). Se realizan análisis de imágenes utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

35 *Desarrollo de un ensayo ELISA para las cinco proteínas candidatas:* con el fin de proponer un ensayo fiable, rápido y fácil de utilizar, se desarrolla una estrategia de ELISA. Se producen dos anticuerpos para cada proteína mediante Abnova contra péptidos antigénicos. Ya se someten a prueba dichos anticuerpos para ELISA. Se establece una prueba ELISA de tipo sándwich en un formato de 96 pocillos, utilizando el antígeno utilizado para la producción de anticuerpos. Este último también sirve como patrón de cuantificación. Para cada proteína, un anticuerpo sirve para capturar la diana y se utiliza para recubrir los pocillos. El otro anticuerpo se une a biotina con el kit de sulfato-NHS-biotinilación EZ-Link de Pierce. Se utiliza estreptavidina-HRP junto con un tampón de sustrato apropiado para la detección. Se mide la concentración de las cinco proteínas candidatas en los extractos celulares obtenidos anteriormente con esta prueba.

45 En la figura 4 se presenta un protocolo para análisis de proteínas, y comprende la evaluación de por lo menos una, y preferentemente todas, de las siguientes etapas: análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western, ELISA y secuenciación de ARN, en por lo menos uno, y preferentemente por lo menos una combinación de dos, tres, cuatro o cinco, de los marcadores de proteína identificados. Un tercio de las células (de 2.5 a 5 millones de células por paciente) obtenidas anteriormente, de pacientes que presentaban toxicidad tardía y donantes coincidentes sirvieron para extraer ARN con reactivo Trizol. El mejor experimento para medir respuestas transcripcionales por todo el genoma es la secuenciación de ejecución global. Puede realizarse un análisis transcriptómico mediante secuenciación de ARN (sec. ARN), siendo una prueba alternativa las micromatrices, aunque esta última técnica es menos sensible. De manera importante, sec. ARN permite la detección de transcritos de corte y empalme alternativo así como de SNP.

Ejemplo 5: Confirmación del papel predictivo de las proteínas identificadas.

55 Para confirmar el papel predictivo de las 5 proteínas (AK2, IDH2, ANX1, APEX1 y HSC70) en los efectos secundarios tardíos inducidos por radiación en cuanto a fibrosis subcutánea de grado ≥ 2 tras cirugía conservadora de mama para cáncer de mama localizado y radioterapia adyuvante con finalidad curativa como
60 directriz convencional. Todas las muestras de sangre se extraen antes de la radioterapia. Se estudia la inducción de la transcripción de AK2, IDH2, ANX1, APEX1 y HSC70 tras la irradiación ionizante. Se estudia la expresión de AK2, IDH2, ANX1, APEX1 y HSC70 tras la inducción con TgFb1 en fibroblastos y en fibras de músculo intersticial liso humano (figuras 5A y 5B).

Referencias bibliográficas

- West CM *et al.*, Int. J. Radiat. Biol., 68, 197-203 (1995)
 Floyd and Cassoni, Eur. J. Cancer, 30A, 615-20 (1994)
 5 Ozsahin M *et al.*, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 38, 429-40 (1997)
 Ozsahin M *et al.*, Clin. Cancer Res., 11, 7426-33 (2005)
 Azria D *et al.*, Clin Cancer Res, 14(19), 6284-6288 (2008)
 Azria D *et al.*, Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys., nov. (15), 75(4), 1275 (2009)
 Azria D *et al.*, Crit.Rev.Oncol.Hematol., dic., 84, sup. e35-41, (2012)
 10 Guipaud O *et al.*, Proteomics, 7, 3992-4002 (2007)
 Cai XW *et al.*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 77, 867-76 (2010)
 Cai XW *et al.*, J Thorac Oncol, 6, 1073-8 (2011)
 Skvortdova *et al.*, Proteomics, 4521-4533 (2008)
 Stenmark *et al.*, Int. J Radiation Oncol Biol Phys, 84(2), e217-222
 15 Oh JH *et al.*, JProteome Res, 10, 1406-15 (2011)
 Lacombe J *et al.*, Cancer/Radiothérapie, 62-69 (2013)
 Lee SH *et al.*, Int. J. Radiat. Biol, 80(9), 635-42 (2004)
 Someya S *et al.*, Cell, 143(5), 802-12 (2010)
 Lee JH *et al.*, J. Biol. Chem, 282(18), 13385-94 (2007)
 20 Tell G *et al.*, Antioxid Redox Signal, 11(3), 601-20 (2009)
 Yin M *et al.*, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys, 81(3), 67-73 (2011)
 Chang-Claude J *et al.*, Clin. Cancer Res, 11(13), 4802-9 (2005)
 Liu T *et al.*, Pharmacol Ther, 136(3), 354-74 (2012)
 Chong KY *et al.*, JMol Cell Cardiol 30, 599-608 (1998)
 25 Chen F *et al.*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 32(12), 2989-99 (2012)
 Burkart A *et al.*, J Biol. Chem, 286(6), 4081-89 (2011)
 Lim LHK *et al.*, FASEB Journal, 21, 968-75 (2007)
 Kennedy DR, Beerman TA. Biochemistry 45(11):3747-54 (2006)
 Adema AD *et al.*, Int. J. Radiot. Biol, 79(8), 655-66 (2003).
 30 Cloos J *et al.*, Mutagenesis, 14(1), 87-93 (1999).
 Tedeschi B *et al.*, Mutation Research, 546, 55-64 (2004)
 Maniatis T. *et al.*, Molecular cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y, edición 1999

Referencias bibliográficas

- West CM *et al.*, Int. J. Radiat. Biol., 68, 197-203 (1995)
 Floyd and Cassoni, Eur. J. Cancer, 30A, 615-20 (1994)
 40 Ozsahin M *et al.*, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 38, 429-40 (1997)
 Ozsahin M *et al.*, Clin. Cancer Res., 11, 7426-33 (2005)
 Azria D *et al.*, Clin Cancer Res, 14(19), 6284-6288 (2008)
 Azria D *et al.*, Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys., nov. (15), 75(4), 1275 (2009)
 Azria D *et al.*, Crit.Rev.Oncol.Hematol., dic., 84, sup. e35-41, (2012)
 Guipaud O *et al.*, Proteomics, 7, 3992-4002 (2007)
 45 Cai XW *et al.*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 77, 867-76 (2010)
 Cai XW *et al.*, J Thorac Oncol, 6, 1073-8 (2011)
 Skvortdova *et al.*, Proteomics, 4521-4533 (2008)
 Stenmark *et al.*, Int. J Radiation Oncol Biol Phys, 84(2), e217-222
 Oh JH *et al.*, J Proteome Res, 10, 1406-15 (2011)
 50 Lacombe J *et al.*, Cancer/Radiothérapie, 62-69 (2013)
 Lee SH *et al.*, Int. J. Radiat. Biol, 80(9), 635-42 (2004)
 Someya S *et al.*, Cell, 143(5), 802-12 (2010)
 Lee JH *et al.*, J. Biol. Chem, 282(18), 13385-94 (2007)
 Tell G *et al.*, Antioxid Redox Signal, 11(3), 601-20 (2009)
 55 Yin M *et al.*, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys, 81(3), 67-73 (2011)
 Chang-Claude J *et al.*, Clin. Cancer Res, 11(13), 4802-9 (2005)
 Liu T *et al.*, Pharmacol Ther, 136(3), 354-74 (2012)
 Chong KY *et al.*, JMol Cell Cardiol 30, 599-608 (1998)
 Chen F *et al.*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 32(12), 2989-99 (2012)
 60 Burkart A *et al.*, J Biol. Chem, 286(6), 4081-89 (2011)
 Lim LHK *et al.*, FASEB Journal, 21, 968-75 (2007)
 Kennedy DR, Beerman TA. Biochemistry 45(11):3747-54 (2006)
 Adema AD *et al.*, Int. J. Radiot. Biol, 79(8), 655-66 (2003).
 Cloos J *et al.*, Mutagenesis, 14(1), 87-93 (1999).
 65 Tedeschi B *et al.*, Mutation Research, 546, 55-64 (2004)
 Maniatis T. *et al.*, Molecular cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,

N.Y, edición 1999

Listado de secuencias

5 <110> Ctre Hosp Universitaire de Montpellier Universite Montpellier I Institut Regional du Cancer de Montpellier
 <120> Método para determinar la radiosensibilidad
 <130> 365326D32103
 10 <150> EP13305399.1
 <151> 2013-03-28
 <160> 10
 15 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 452
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Ala Gly Tyr Leu Arg Val Val Arg Ser Leu Cys Arg Ala Ser Gly
 1 5 10 15
 Ser Arg Pro Ala Trp Ala Pro Ala Ala Leu Thr Ala Pro Thr Ser Gln
 20 25 30
 Glu Gln Pro Arg Arg His Tyr Ala Asp Lys Arg Ile Lys Val Ala Lys
 35 40 45
 Pro Val Val Glu Met Asp Gly Asp Glu Met Thr Arg Ile Ile Trp Gln
 50 55 60
 Phe Ile Lys Glu Lys Leu Ile Leu Pro His Val Asp Ile Gln Leu Lys
 65 70 75 80
 Tyr Phe Asp Leu Gly Leu Pro Asn Arg Asp Gln Thr Asp Asp Gln Val
 85 90 95
 Thr Ile Asp Ser Ala Leu Ala Thr Gln Lys Tyr Ser Val Ala Val Lys
 100 105 110
 Cys Ala Thr Ile Thr Pro Asp Glu Ala Arg Val Glu Glu Phe Lys Leu
 115 120 125
 Lys Lys Met Trp Lys Ser Pro Asn Gly Thr Ile Arg Asn Ile Leu Gly
 130 135 140
 Gly Thr Val Phe Arg Glu Pro Ile Ile Cys Lys Asn Ile Pro Arg Leu
 145 150 155 160

25

ES 2 713 648 T3

Val Pro Gly Trp Thr Lys Pro Ile Thr Ile Gly Arg His Ala His Gly
 165 170 175

Asp Gln Tyr Lys Ala Thr Asp Phe Val Ala Asp Arg Ala Gly Thr Phe
 180 185 190

Lys Met Val Phe Thr Pro Lys Asp Gly Ser Gly Val Lys Glu Trp Glu
 195 200 205

Val Tyr Asn Phe Pro Ala Gly Gly Val Gly Met Gly Met Tyr Asn Thr
 210 215 220

Asp Glu Ser Ile Ser Gly Phe Ala His Ser Cys Phe Gln Tyr Ala Ile
 225 230 235 240

Gln Lys Lys Trp Pro Leu Tyr Met Ser Thr Lys Asn Thr Ile Leu Lys
 245 250 255

Ala Tyr Asp Gly Arg Phe Lys Asp Ile Phe Gln Glu Ile Phe Asp Lys
 260 265 270

His Tyr Lys Thr Asp Phe Asp Lys Asn Lys Ile Trp Tyr Glu His Arg
 275 280 285

Leu Ile Asp Asp Met Val Ala Gln Val Leu Lys Ser Ser Gly Gly Phe
 290 295 300

Val Trp Ala Cys Lys Asn Tyr Asp Gly Asp Val Gln Ser Asp Ile Leu
 305 310 315 320

Ala Gln Gly Phe Gly Ser Leu Gly Leu Met Thr Ser Val Leu Val Cys
 325 330 335

Pro Asp Gly Lys Thr Ile Glu Ala Glu Ala Ala His Gly Thr Val Thr
 340 345 350

Arg His Tyr Arg Glu His Gln Lys Gly Arg Pro Thr Ser Thr Asn Pro
 355 360 365

Ile Ala Ser Ile Phe Ala Trp Thr Arg Gly Leu Glu His Arg Gly Lys
 370 375 380

Leu Asp Gly Asn Gln Asp Leu Ile Arg Phe Ala Gln Met Leu Glu Lys
 385 390 395 400

Val Cys Val Glu Thr Val Glu Ser Gly Ala Met Thr Lys Asp Leu Ala
 405 410 415

Gly Cys Ile His Gly Leu Ser Asn Val Lys Leu Asn Glu His Phe Leu
 420 425 430

Asn Thr Thr Asp Phe Leu Asp Thr Ile Lys Ser Asn Leu Asp Arg Ala
 435 440 445

Leu Gly Arg Gln
 450

ES 2 713 648 T3

<210> 2
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 Met Pro Lys Arg Gly Lys Lys Gly Ala Val Ala Glu Asp Gly Asp Glu
 1 5 10 15
 Leu Arg Thr Glu Pro Glu Ala Lys Lys Ser Lys Thr Ala Ala Lys Lys
 20 25 30
 Asn Asp Lys Glu Ala Ala Gly Glu Gly Pro Ala Leu Tyr Glu Asp Pro
 35 40 45
 Pro Asp Gln Lys Thr Ser Pro Ser Gly Lys Pro Ala Thr Leu Lys Ile
 50 55 60
 Cys Ser Trp Asn Val Asp Gly Leu Arg Ala Trp Ile Lys Lys Lys Gly
 65 70 75 80
 Leu Asp Trp Val Lys Glu Glu Ala Pro Asp Ile Leu Cys Leu Gln Glu
 85 90 95
 Thr Lys Cys Ser Glu Asn Lys Leu Pro Ala Glu Leu Gln Glu Leu Pro
 100 105 110
 Gly Leu Ser His Gln Tyr Trp Ser Ala Pro Ser Asp Lys Glu Gly Tyr
 115 120 125
 Ser Gly Val Gly Leu Leu Ser Arg Gln Cys Pro Leu Lys Val Ser Tyr
 130 135 140
 Gly Ile Gly Asp Glu Glu His Asp Gln Glu Gly Arg Val Ile Val Ala
 145 150 155 160
 Glu Phe Asp Ser Phe Val Leu Val Thr Ala Tyr Val Pro Asn Ala Gly
 165 170 175

ES 2 713 648 T3

Arg Gly Leu Val Arg Leu Glu Tyr Arg Gln Arg Trp Asp Glu Ala Phe
 180 185 190

Arg Lys Phe Leu Lys Gly Leu Ala Ser Arg Lys Pro Leu Val Leu Cys
 195 200 205

Gly Asp Leu Asn Val Ala His Glu Glu Ile Asp Leu Arg Asn Pro Lys
 210 215 220

Gly Asn Lys Lys Asn Ala Gly Phe Thr Pro Gln Glu Arg Gln Gly Phe
 225 230 235 240

Gly Glu Leu Leu Gln Ala Val Pro Leu Ala Asp Ser Phe Arg His Leu
 245 250 255

Tyr Pro Asn Thr Pro Tyr Ala Tyr Thr Phe Trp Thr Tyr Met Met Asn
 260 265 270

Ala Arg Ser Lys Asn Val Gly Trp Arg Leu Asp Tyr Phe Leu Leu Ser
 275 280 285

His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Cys Asp Ser Lys Ile Arg Ser Lys Ala
 290 295 300

Leu Gly Ser Asp His Cys Pro Ile Thr Leu Tyr Leu Ala Leu
 305 310 315

<210> 3

<211> 646

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ser Lys Gly Pro Ala Val Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser
 1 5 10 15

Cys Val Gly Val Phe Gln His Gly Lys Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp
 20 25 30

Gln Gly Asn Arg Thr Thr Pro Ser Tyr Val Ala Phe Thr Asp Thr Glu
 35 40 45

Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala Lys Asn Gln Val Ala Met Asn Pro Thr
 50 55 60

Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys Arg Leu Ile Gly Arg Arg Phe Asp Asp
 65 70 75 80

10

ES 2 713 648 T3

Ala Val Val Gln Ser Asp Met Lys His Trp Pro Phe Met Val Val Asn
85 90 95

Asp Ala Gly Arg Pro Lys Val Gln Val Glu Tyr Lys Gly Glu Thr Lys
100 105 110

Ser Phe Tyr Pro Glu Glu Val Ser Ser Met Val Leu Thr Lys Met Lys
115 120 125

Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Lys Thr Val Thr Asn Ala Val Val
130 135 140

Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ser Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp
145 150 155 160

Ala Gly Thr Ile Ala Gly Leu Asn Val Leu Arg Ile Ile Asn Glu Pro
165 170 175

Thr Ala Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Asp Lys Lys Val Gly Ala Glu
180 185 190

Arg Asn Val Leu Ile Phe Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser
195 200 205

Ile Leu Thr Ile Glu Asp Gly Ile Phe Glu Val Lys Ser Thr Ala Gly
210 215 220

Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Asn Arg Met Val Asn His
225 230 235 240

Phe Ile Ala Glu Phe Lys Arg Lys His Lys Lys Asp Ile Ser Glu Asn
245 250 255

Lys Arg Ala Val Arg Arg Leu Arg Thr Ala Cys Glu Arg Ala Lys Arg
260 265 270

Thr Leu Ser Ser Ser Thr Gln Ala Ser Ile Glu Ile Asp Ser Leu Tyr
275 280 285

Glu Gly Ile Asp Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Arg Ala Arg Phe Glu Glu
290 295 300

Leu Asn Ala Asp Leu Phe Arg Gly Thr Leu Asp Pro Val Glu Lys Ala
305 310 315 320

Leu Arg Asp Ala Lys Leu Asp Lys Ser Gln Ile His Asp Ile Val Leu

ES 2 713 648 T3

325	330	335
Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Ile Gln Lys Leu Leu Gln Asp 340 345 350		
Phe Phe Asn Gly Lys Glu Leu Asn Lys Ser Ile Asn Pro Asp Glu Ala 355 360 365		
Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala Ala Ile Leu Ser Gly Asp Lys 370 375 380		
Ser Glu Asn Val Gln Asp Leu Leu Leu Leu Asp Val Thr Pro Leu Ser 385 390 395 400		
Leu Gly Ile Glu Thr Ala Gly Gly Val Met Thr Val Leu Ile Lys Arg 405 410 415		
Asn Thr Thr Ile Pro Thr Lys Gln Thr Gln Thr Phe Thr Thr Tyr Ser 420 425 430		
Asp Asn Gln Pro Gly Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg Ala 435 440 445		
Met Thr Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Lys Phe Glu Leu Thr Gly Ile 450 455 460		
Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile 465 470 475 480		
Asp Ala Asn Gly Ile Leu Asn Val Ser Ala Val Asp Lys Ser Thr Gly 485 490 495		
Lys Glu Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu Ser Lys 500 505 510		
Glu Asp Ile Glu Arg Met Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Ala Glu 515 520 525		
Asp Glu Lys Gln Arg Asp Lys Val Ser Ser Lys Asn Ser Leu Glu Ser 530 535 540		
Tyr Ala Phe Asn Met Lys Ala Thr Val Glu Asp Glu Lys Leu Gln Gly 545 550 555 560		
Lys Ile Asn Asp Glu Asp Lys Gln Lys Ile Leu Asp Lys Cys Asn Glu 565 570 575		

ES 2 713 648 T3

Ile Ile Asn Trp Leu Asp Lys Asn Gln Thr Ala Glu Lys Glu Glu Phe
580 585 590

Glu His Gln Gln Lys Glu Leu Glu Lys Val Cys Asn Pro Ile Ile Thr
595 600 605

Lys Leu Tyr Gln Ser Ala Gly Gly Met Pro Gly Gly Met Pro Gly Gly
610 615 620

Phe Pro Gly Gly Gly Ala Pro Pro Ser Gly Gly Ala Ser Ser Gly Pro
625 630 635 640

Thr Ile Glu Glu Val Asp
645

<210> 4

<211> 239

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Pro Ser Val Pro Ala Ala Glu Pro Glu Tyr Pro Lys Gly Ile
1 5 10 15

Arg Ala Val Leu Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly Thr Gln Ala
20 25 30

Pro Arg Leu Ala Glu Asn Phe Cys Val Cys His Leu Ala Thr Gly Asp
35 40 45

Met Leu Arg Ala Met Val Ala Ser Gly Ser Glu Leu Gly Lys Lys Leu
50 55 60

Lys Ala Thr Met Asp Ala Gly Lys Leu Val Ser Asp Glu Met Val Val
65 70 75 80

Glu Leu Ile Glu Lys Asn Leu Glu Thr Pro Leu Cys Lys Asn Gly Phe
85 90 95

Leu Leu Asp Gly Phe Pro Arg Thr Val Arg Gln Ala Glu Met Leu Asp
100 105 110

Asp Leu Met Glu Lys Arg Lys Glu Lys Leu Asp Ser Val Ile Glu Phe
115 120 125

Ser Ile Pro Asp Ser Leu Leu Ile Arg Arg Ile Thr Gly Arg Leu Ile
130 135 140

10

ES 2 713 648 T3

His Pro Lys Ser Gly Arg Ser Tyr His Glu Glu Phe Asn Pro Pro Lys
145 150 155 160

Glu Pro Met Lys Asp Asp Ile Thr Gly Glu Pro Leu Ile Arg Arg Ser
165 170 175

Asp Asp Asn Glu Lys Ala Leu Lys Ile Arg Leu Gln Ala Tyr His Thr
180 185 190

Gln Thr Thr Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Arg Lys Arg Gly Ile His Ser
195 200 205

Ala Ile Asp Ala Ser Gln Thr Pro Asp Val Val Phe Ala Ser Ile Leu
210 215 220

Ala Ala Phe Ser Lys Ala Thr Cys Lys Asp Leu Val Met Phe Ile
225 230 235

<210> 5

<211> 346

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn
1 5 10 15

Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro
20 25 30

Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val
35 40 45

Ala Ala Leu His Lys Ala Ile Met Val Lys Gly Val Asp Glu Ala Thr
50 55 60

Ile Ile Asp Ile Leu Thr Lys Arg Asn Asn Ala Gln Arg Gln Gln Ile
65 70 75 80

Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Glu Thr Gly Lys Pro Leu Asp Glu Thr Leu
85 90 95

Lys Lys Ala Leu Thr Gly His Leu Glu Glu Val Val Leu Ala Leu Leu
100 105 110

Lys Thr Pro Ala Gln Phe Asp Ala Asp Glu Leu Arg Ala Ala Met Lys
115 120 125

10

ES 2 713 648 T3

Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Thr Leu Ile Glu Ile Leu Ala Ser Arg
 130 135 140

Thr Asn Lys Glu Ile Arg Asp Ile Asn Arg Val Tyr Arg Glu Glu Leu
 145 150 155 160

Lys Arg Asp Leu Ala Lys Asp Ile Thr Ser Asp Thr Ser Gly Asp Phe
 165 170 175

Arg Asn Ala Leu Leu Ser Leu Ala Lys Gly Asp Arg Ser Glu Asp Phe
 180 185 190

Gly Val Asn Glu Asp Leu Ala Asp Ser Asp Ala Arg Ala Leu Tyr Glu
 195 200 205

Ala Gly Glu Arg Arg Lys Gly Thr Asp Val Asn Val Phe Asn Thr Ile
 210 215 220

Leu Thr Thr Arg Ser Tyr Pro Gln Leu Arg Arg Val Phe Gln Lys Tyr
 225 230 235 240

Thr Lys Tyr Ser Lys His Asp Met Asn Lys Val Leu Asp Leu Glu Leu
 245 250 255

Lys Gly Asp Ile Glu Lys Cys Leu Thr Ala Ile Val Lys Cys Ala Thr
 260 265 270

Ser Lys Pro Ala Phe Phe Ala Glu Lys Leu His Gln Ala Met Lys Gly
 275 280 285

Val Gly Thr Arg His Lys Ala Leu Ile Arg Ile Met Val Ser Arg Ser
 290 295 300

Glu Ile Asp Met Asn Asp Ile Lys Ala Phe Tyr Gln Lys Met Tyr Gly
 305 310 315 320

Ile Ser Leu Cys Gln Ala Ile Leu Asp Glu Thr Lys Gly Asp Tyr Glu
 325 330 335

Lys Ile Leu Val Ala Leu Cys Gly Gly Asn
 340 345

<210> 6
 <211> 1740
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 ccagcgtag cccgcgcca ggcagccggg aggagcggcg cgcgctcgga cctctccgc

60

10

ES 2 713 648 T3

cctgctcggt cgctctccag cttgggatgg cgggctacct gcgggtcgtg cgctcgctct 120
gcagagcctc aggctcgcgg ccggcctggg cggcggcggc cctgacagcc cccacctcgc 180
aagagcagcc gcggcgccac tatgccgaca aaaggatcaa ggtggcgaag cccgtggtgg 240
agatggatgg tgatgagatg acccgtatta tctggcagtt catcaaggag aagctcatcc 300
tgccccacgt ggacatccag ctaaagtatt ttgacctcgg gctcccaaac cgtgaccaga 360
ctgatgacca ggtcaccatt gactctgcac tggccacca gaagtacagt gtggctgtca 420
agtgtgccac catcaccctt gatgaggccc gtgtggaaga gttcaagctg aagaagatgt 480
ggaaaagtcc caatggaact atccggaaca tcctgggggg gactgtcttc cgggagccca 540
tcatctgcaa aaacatccca cgcctagtcc ctggctggac caagcccatc accattggca 600
ggcacgcccc tggcgaccag tacaaggcca cagactttgt ggacagccgg gccggcactt 660
tcaaaatggt cttcacccca aaagatggca gtggtgtcaa ggagtgggaa gtgtacaact 720
tccccgcagg cggcgtgggc atgggcatgt acaacaccga cgagtccatc tcaggttttg 780
cgcacagctg cttccagtat gccatccaga agaaatggcc gctgtacatg agcaccaaga 840
acaccatact gaaagcctac gatgggcggt tcaaggacat cttccaggag atctttgaca 900
agcactataa gaccgacttc gacaagaata agatctggta tgagcaccgg ctcatgatg 960
acatggtggc tcaggtcctc aagtcttcgg gtggctttgt gtgggcctgc aagaactatg 1020
acggagatgt gcagtcagac atcctggccc agggctttgg ctcccttggc ctgatgacgt 1080
ccgtcctggt ctgccctgat gggaagacga ttgaggtgta ggccgctcat gggaccgtca 1140
cccgccacta tcgggagcac cagaagggcc ggcccaccag caccaacccc atcgccagca 1200
tctttgcctg gacacgtggc ctgggagcacc gggggaagct ggatgggaac caagacctca 1260
tcaggtttgc ccagatgctg gagaaggtgt gcgtggagac ggtggagagt ggagccatga 1320
ccaaggacct ggcgggctgc attcacggcc tcagcaatgt gaagctgaac gagcacttcc 1380
tgaacaccac ggacttcctc gacaccatca agagcaacct ggacagagcc ctgggcaggc 1440
agtaggggga ggcgccaccc atggctgcag tggaggggcc agggctgagc cggcgggtcc 1500
tcctgagcgc ggcagagggg gagcctcaca gccctctct ggaggccttt ctaggggatg 1560
ttttttata agccagatgt ttttaaagc atatgtgtgt tccccctcat ggtgacgtga 1620
ggcaggagca gtgcgtttta cctcagccag tcagtatggt ttgcatactg taatttatat 1680
tgcccttggg acacatgggt ccatatttag ctactaaaaa gctcttcaca aaaaaaaaaa 1740

<210> 7
<211> 1558
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5

<400> 7

ES 2 713 648 T3

cagacagacc aatcacgcgc attcttcggc cacgacaagc gcgcctctga tcacgtgacc 60
 aggtccgcta cccacgtggg ggctcagcgt gcacccttct ttgtgctcgg gttaggagga 120
 gctaggctgc catcgggccg gtgcagatac ggggttgctc ttttgctcat aagaggggct 180
 tcgctggcag tctgaacggc aagcttgagt caggaccctt aattaagatc ctcaattggc 240
 tggagggcag atctcgcgag caacgcggtg aaaatattgc ttcgggtggg gacgcggtac 300
 agctgcccaa gggcgttcgt aacgggaatg ccgaagcgtg ggaaaaggg agcgggtggc 360
 gaagacgggg atgagctcag gacagagcca gaggccaaga agagtaagac ggccgcaaag 420
 aaaaatgaca aagaggcagc aggagagggc ccagccctgt atgaggacc cccagatcag 480
 aaaacctcac ccagtggcaa acctgccaca ctcaagatct gctcttgaa tgtggatggg 540
 cttcagacct ggattaagaa gaaaggatta gattgggtaa aggaagaagc cccagatata 600
 ctgtgccttc aagagaccaa atgttcagag acaaaactac cagctgaact tcaggagctg 660
 cctggactct ctcatcaata ctggtcagct ccttcggaca aggaagggtg cagtggcgtg 720
 ggcctgcttt cccgccagtg cccactcaa gtttcttacg gcataggcga tgaggagcat 780
 gatcaggaag gccgggtgat tgtggctgaa tttgactcgt ttgtgctggt aacagcatat 840
 gtacctaatg cagccgagg tctggtacga ctggagtacc ggcagcgtg ggatgaagcc 900
 tttcgcaagt tcctgaaggg cctggcttcc cgaaagcccc ttgtgctgtg tggagacctc 960
 aatgtggcac atgaagaaat tgaccttcgc aaccccaagg ggaacaaaaa gaatgctggc 1020
 ttcacgccac aagagcgcca aggcttcggg gaattactgc aggetgtgcc actggctgac 1080
 agctttaggc acctctacct caacacacct tatgcctaca ccttttgac ttatatgatg 1140
 aatgctcgat ccaagaatgt tggttggcgc cttgattact ttttgttgc ccactctctg 1200
 ttacctgcat tgtgtgacag caagatccgt tccaaggccc tcggcagtga tcactgtcct 1260
 atcacctat acctagcact gtgacaccac ccctaaatca ctttgagcct gggaaataag 1320
 ccccctcaac taccattcct tctttaaaca ctcttcagag aaatctgcat tctatttctc 1380
 atgtataaaa ctaggaatcc tccaaccagg ctctgtgat agagttcttt taagccaag 1440
 attttttatt tgagggtttt ttgtttttta aaaaaaatt gaacaaagac tactaatgac 1500
 tttgtttgaa ttatccacat gaaaataaag agccatagtt tcagccttaa aaaaaaaa 1558

<210> 8
 <211> 2331
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 8
 ccttctggaa ggttctaaga tagggataa gaggcagggt ggcgggcgga aaccggtctc 60
 attgaaactcg cctgcagctc ttgggttttt tgtggcttcc ttcgttattg gagccaggcc 120

10

ES 2 713 648 T3

tacacccag caaccatgtc caaggacct gcagttgta ttgatcttg caccacctac	180
tcttgtgtgg gtgttttcca gcacggaaa gtcgagataa ttgccaatga tcagggaaac	240
cgaaccactc caagctatgt cgcctttacg gacactgaac ggttgatcgg tgatgccgca	300
aagaatcaag ttgcaatgaa cccacccaac acagtttttg atgccaaaacg tctgattgga	360
cgcagatttg atgatgctgt tgtccagtct gatatgaaac attggccctt tatggtggtg	420
aatgatgctg gcaggcccaa ggtccaagta gaatacaagg gagagaccaa aagcttctat	480
ccagaggagg tgtcttctat ggttctgaca aagatgaagg aaattgcaga agcctacctt	540
gggaagactg ttaccaatgc tgtggtcaca gtgccagctt actttaatga ctctcagcgt	600
caggctacca aagatgctgg aactattgct ggtctcaatg tacttagaat tattaatgag	660
ccaactgctg ctgctattgc ttacggctta gacaaaaagg ttggagcaga aagaacgtg	720
ctcatctttg acctgggagg tggcactttt gatgtgtcaa tcctcactat tgaggatgga	780
atctttgagg tcaagtctac agctggagac acccacttgg gtggagaaga ttttgacaac	840
cgaatggtca accattttat tgctgagttt aagcgcgaagc ataagaagga catcagtgag	900
aacaagagag ctgtaagacg cctccgtact gcttgtgaac gtgctaagcg tacctctct	960
tccagcacc aggccagtat tgagatcgat tctctctatg aaggaatcga cttctatacc	1020
tccattacc gtgcccatt tgaagaactg aatgctgacc tgttccgtgg caccctggac	1080
ccagtagaga aagcccttcg agatgccaaa ctagacaagt cacagattca tgatattgtc	1140
ctggttggtg gttctactcg tatccccaag attcagaagc ttctccaaga cttcttcaat	1200
ggaaaagaac tgaataagag catcaaccct gatgaagctg ttgcttatgg tgcagctgtc	1260
caggcagcca tcttgtctgg agacaagtct gagaatgttc aagatttgct gctcttggat	1320
gtcactcctc tttcccttgg tattgaaact gctggtggag tcatgactgt cctcatcaag	1380
cgtaatacca ccattcctac caagcagaca cagacctca ctacctatc tgacaaccag	1440
cctggtgtgc ttattcaggt ttatgaaggc gagcgtgcc a tgacaaagga taacaacctg	1500
cttgcaagt ttgaactcac aggcatacct cctgcacccc gaggtgttcc tcagattgaa	1560
gtcacttttg acattgatgc caatggtata ctcaatgtct ctgctgtgga caagagtacg	1620
ggaaaagaga acaagattac tatcactaat gacaagggcc gtttgagcaa ggaagacatt	1680
gaacgtatgg tccaggaagc tgagaagtac aaagctgaag atgagaagca gagggacaag	1740
gtgtcatcca agaattcact tgagtcctat gccttcaaca tgaaagcaac tgttgaagat	1800
gagaaacttc aaggcaagat taacgatgag gacaaacaga agattctgga caagtgtaat	1860
gaaattatca actggcttga taagaatcag actgctgaga aggaagaatt tgaacatcaa	1920
cagaaagagc tggagaaagt ttgcaacccc atcatcacca agctgtacca gagtgcagga	1980

ES 2 713 648 T3

ggcatgccag gaggaatgcc tgggggattt cctggtggtg gagctcctcc ctctggtggt 2040
gcttcctcag ggcccacat tgaagaggtt gattaagcca accaagtgta gatgtagcat 2100
tgttccacac atttaaaaca tttgaaggac ctaaattcgt agcaaattct gtggcagttt 2160
taaaaagtta agctgctata gtaagttact gggcattctc aatacttgaa tatggaacat 2220
atgcacaggg gaaggaata acattgcact ttataaacac tgtattgtaa gtggaaaatg 2280
caatgtctta aataaaacta tttaaaattg gcaccataaa aaaaaaaaaa a 2331

<210> 9
<211> 3647
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5

<400> 9
gtgctggcg tgcgtgctt gacctggaa gactggacc tgtgaggcgt gcgaactggt 60
ggcagtgaga gacttcggcg gacatggctc ccagcgtgcc agcggcagaa cccgagtatc 120
ctaaaggcat ccgggccgtg ctgctggggc ctcccggggc cggtaaaggg acccaggcac 180
ccagattggc tgaaaacttc tgtgtctgcc attagctac tggggacatg ctgagggccca 240
tggtggtctt tggctcagag ctaggaaaaa agctgaaggc aactatggat gctgggaaac 300
tggtgagtga tgaatggta gtggagctca ttgagaagaa tttggagacc cccttggtgca 360
aaaatggttt tcttctggat ggcttccctc ggactgtgag gcaggcagaa atgctcagat 420
acctcatgga gaagaggaaa gagaagcttg attctgtgat tgaattcagc atcccagact 480
ctctgctgat tcacccaag agtggccgtt cctaccacga ggagttcaac cctccaaaag 540
agcccatgaa agatgacatc accggggaac ccttgatccg tcgatcagat gataatgaaa 600
aggccttgaa aatccgcctg caagcctacc aactcaaac caccctcactc atagagtact 660
acaggaacg ggggatccac tccgccatcg atgcatocca gacccccgat gtcgtgttcg 720
caagcatcct agcagccttc tccaaagcca catcctagta tcagaaggcc aggcgagact 780
gcaacactgc tcatcaccce gggcgtgat ccctgctctt aggtgctggg cagaggggaa 840
gggtggtcag ggtgaggatg gtgaggagg gctggtgagg ggctcagagg aatacttgga 900
acaacagcag tgttattgta gtgtggcagt ttcttttata cataggtgag agttttttaa 960
gtgtaaggga aaaattaatt ttttaaaaa caccatgctt ggagggtggg ggtagaata 1020
gacacaatat tatttctaag gaatcgggtt ttcatttact ctggactggt gaaaatattt 1080
tttaaagcca gtgctctaag acctcagctt ttatctcaga accccatggg ttccagacca 1140
agagtacagg aaatcaaatt gttgtcctgt ctgtctatag cttggaacag ggagctttga 1200
ttactgactc cggttccaca cactgtaaga tcaaaaaacc atctccacat ttgaaagaga 1260
tgtaaggtgt attcataggg atggtggtc aacaaatcaa gcaaactgga atcaagggga 1320

10

ES 2 713 648 T3

gggggaaggg aatgaaatgg aaagggaggc tgattccctt cccctgactt accactaatt 1380
 tactaggcta cctactttca tgagtaacct ctcacagcta cccagcacat gccacaatcc 1440
 tatgtcttgg ccttctttta tctgcactgt gtgaagggac tcttttaaat aaatgagcaa 1500
 gtgtcctaag ctatgtcatc caaagattgt cctttccatt ctcaaactct gtgactggga 1560
 tcactcaaca gcactgtgat gtattatfff caatgagggtg cctttcttaa ctgaccaaact 1620
 gctgccttgt ttggccccta aatcaataaa atatgttaa atttgtatcc cctgttgtgg 1680
 cttttttttt agataatcta agctagaaaa atgacattga attctggacc tggctggaag 1740
 gaaaagaagc cctttcttgt cgctggcagc tgtgtggtag ggaggtccaa gtatgtgcat 1800
 atgagataag cctgcaacct cttgaccttc agctcctatg caggcttctc ttgagcccag 1860
 agacaaggca gcttggctca gtggagatag cactgtgctt ggagttcagg ggacctagga 1920
 caaatcccag ccagttagtt attcactgtg ctccctgtttc ctgagctgaa aaaggaagtt 1980
 gggtatgcca ccttcttggc cttaatggca ttaaatgaaa tttataggaa gaaggttttt 2040
 gctcagtacc tggcatgcaa cagacattgg ataatgtta gttggatcca gatatacaca 2100
 gaaagatata tgcttcctgc caggctggat aactgttgaa tggacacttg tccatagtct 2160
 agaaagccag tgcttctaact ccttaagcca gatccttgac taccttttca gttgcttctt 2220
 taacactcct tgttcttct ctgtgtgtcc tagtttaaat tcatttcctc tccagcaaaa 2280
 gtgagcttaa ataatttctc caaactaaag ctctcatggt tttggaaggg ctgcctttgc 2340
 aagtgaggtt tctgagaaat gactgttgtt cccaaaacaa gagggagctg ggctggaagc 2400
 accactatct ttctttaggc atcttgttac agagagaggg agggcttca ctgacatatt 2460
 aaatcctggt ccctgaacca gccctccct cttctgctcc acttcctcac ctgtgcagag 2520
 tcattttcag gtgttagcct tactgatttg cactgatctg tttgttccct gagcttttta 2580
 aataccctgt gaaaattttc tttcctccct tggatcatcat gcactaatt gtggggaat 2640
 gtttgtaaaa ccaacctgca aagcagcatg gtgtagtga gaagaataaa cagagaagac 2700
 tgggtgagct attgtttgtt tgcttctttg ggctgggtt tcctcatcta atctgcaaac 2760
 caagaatgca gactagtcct accactccc gaagactgac gttgtgccag gtattatgca 2820
 aaggcttcat gtaaccctcg acttcacgta accctcacac agcaccctgt ggagtcagaa 2880
 ctgtccttca cttttatagg tgaggaaacc agactcagag aggtgaagtg gcattcctga 2940
 ggtcatgcat aagaggcagt caggactgaa acacagtctc taacacttat ccgtcccctt 3000
 gatcttgttg ctgaagtgat ttaattactt gcgtagctct gcacacagga agggctgctc 3060
 tgaataagag ctcttttcca tggacactca gcgctgccc aactgatttt gaagaagtca 3120
 ctgccggctc tgagggccta gggatgtgt cttagatct cctgtgtgca caaagtgtca 3180
 ctgacagaac acagcaggat ggagagcagc ctccctcagaa gcctcacaag tctttcctca 3240

ES 2 713 648 T3

gatgaagaca gagcaacgag tcagaagaca gatttcaaca gcgacttcac catgcgacct 3300
 tggacaagtt atctcacctc atcagtagaa taggaatgat ccctaccctc caaaggtgct 3360
 gatgacacta gtgaccaaga tactcatgtg ggttggactg cccaggacac agcagatgct 3420
 tagtaaacac agatggaatt cagagggaaa atgtaggcat tgaagaaagt tgtcttactg 3480
 accatccgga accaggctaa ggatccccta gaaatcatag acctctgaaa ttatatgcag 3540
 aattctttat gtgttttcat aattaataat agtctaacat attaaattct tagctgtgtg 3600
 agaggttctg catgcattat ctcatattatt ctctctgata accctgt 3647

<210> 10
 <211> 1399
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 10
 agtgtgaaat cttcagagaa gaatttctct ttagttcttt gcaagaaggt agagataaag 60
 acactttttc aaaaatggca atggatcag aattcctcaa gcaggcctgg tttattgaaa 120
 atgaagagca ggaatatggt caaactgtga agtcatcaa aggtggtccc ggatcagcgg 180
 tgagccccta tcctacctc aatccatcct cggatgtcgc tgccttgcat aaggccataa 240
 tggttaaagg tgtggatgaa gcaaccatca ttgacattct aactaagcga aacaatgcac 300
 agcgtcaaca gatcaaagca gcatatctcc aggaacagg aaagcccctg gatgaaacac 360
 ttaagaaagc ctttacaggt caccttgagg aggttgtttt agctctgcta aaaactccag 420
 cgcaatttga tgctgatgaa cttcgtgctg ccatgaaggg ccttggaact gatgaagata 480
 ctctaattga gatthttggca tcaagaacta acaaagaaat cagagacatt aacagggctc 540
 acagagagga actgaagaga gatctggcca aagacataac ctcagacaca tctggagatt 600
 ttcggaacgc tttgctttct cttgctaagg gtgaccgatc tgaggacttt ggtgtgaatg 660
 aagacttggc tgattcagat gccaggcctc tgtatgaagc aggagaaagg agaaagggga 720
 cagacgtaaa cgtgttcaat accatcctta ccaccagaag ctatccacaa cttcgcagag 780
 tgtttcagaa atacaccaag tacagtaagc atgacatgaa caaagttctg gacctggagt 840
 tgaaagtgta cattgagaaa tgcctcacag ctatcgtgaa gtgcgccaca agcaaaccag 900
 ctttctttgc agagaagctt catcaagcca tgaagggtgt tggactcgc cataaggcat 960
 tgatcaggat tatggtttcc cgttctgaaa ttgacatgaa tgatatcaaa gcattctatc 1020
 agaagatgta tggatctctc ctttgccaag ccatcctgga tgaaaccaaa ggagattatg 1080
 agaaaatcct ggtggctcct tgtggaggaa actaaacatt cccttgatgg tctcaagcta 1140
 tgatcagaag actttaatta tatatthtca tcctataagc ttaaatagga aagthttctc 1200
 aacaggatta cagtgtagct acctacatgc tgaaaaatat agcctthtaa tcattthtat 1260
 attataactc tgtataatag agataagtcc atththttaa aatgthttcc ccaaaccata 1320
 aaaccctata caagttgttc tagtaacaat acatgagaaa gatgtctatg tagctgaaaa 1380
 taaaatgacg tcacaagac 1399

10

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto, que comprende las etapas de:

- 5 a) inducir un estrés exógeno mediante por lo menos un método seleccionado de entre irradiación, contacto con por lo menos un agente radiomimético y una combinación de los mismos, en una primera fracción de una muestra biológica que comprende células,
- 10 b) determinar en la fracción de la etapa a) la presencia o el nivel de por lo menos un compuesto intracelular,
- c) determinar la presencia o el nivel de dicho por lo menos un compuesto en una segunda fracción de dicha muestra biológica que no se ha sometido a dicho estrés exógeno,
- 15 d) comparar los resultados de la determinación de la presencia o el nivel de dicho por lo menos un compuesto en dicha primera y en dicha segunda fracción y seleccionar por lo menos un compuesto que se expresa de manera diferencial entre dicha primera y dicha segunda fracción,
- 20 e) inducir un estrés exógeno como se define en la etapa a) en una muestra de prueba biológica que comprende células de dicho sujeto,
- f) determinar en la muestra de prueba de la etapa e) la presencia o el nivel de dicho por lo menos un compuesto seleccionado en la etapa d),
- 25 g) comparar los resultados de la determinación de la presencia o el nivel de dicho por lo menos un compuesto en dicha etapa f) con la presencia o el nivel del mismo compuesto en una muestra de referencia biológica, y
- h) determinar a partir de la comparación de la etapa g) la radiosensibilidad de dicho sujeto,
- 30 seleccionándose la muestra biológica que comprende células en la etapa a) y la muestra de prueba biológica que comprende células de dicho sujeto en la etapa e) de entre el grupo que consiste en: extracto de sangre completa que contiene glóbulos blancos, extracto de sangre completa que contiene linfocitos y extracto de sangre completa que contiene linfocitos T.

35 2. Método para la determinación *in vitro* de la radiosensibilidad de un sujeto, que comprende las etapas de:

- 40 a) inducir un estrés exógeno mediante por lo menos un método seleccionado de entre irradiación, contacto con por lo menos un agente radiomimético y una combinación de los mismos, en una muestra de prueba biológica que comprende células de dicho sujeto,
- b) determinar en la muestra de la etapa a) la presencia o el nivel de por lo menos un compuesto, siendo dicho compuesto una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2), anexina 1 (ANX1), un fragmento específico de las mismas seleccionado de entre un fragmento resultante de escisión intracelular de una pre-pro-proteína o de una pre-proteína, o un epítipo de la proteína reconocido específicamente por un anticuerpo contra la proteína, un ácido nucleico que codifica las mismas y una combinación de los mismos,
- 45 c) comparar la presencia o el nivel de dicho por lo menos un compuesto con la presencia o el nivel del mismo compuesto en una muestra de referencia, y
- 50 d) determinar, a partir de la comparación de la etapa c), la radiosensibilidad de dicho sujeto, seleccionándose la muestra de prueba biológica que comprende células de dicho sujeto de entre el grupo que consiste en: extracto de sangre completa que contiene glóbulos blancos, extracto de sangre completa que contiene linfocitos y extracto de sangre completa que contiene linfocitos T.
- 55

3. Método según la reivindicación 2, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 60 a) inducir un estrés exógeno en una muestra de prueba biológica que comprende linfocitos de dicho sujeto,
- b) determinar el nivel de apoptosis inducida en dicha muestra de prueba biológica,
- 65 c) inducir un estrés exógeno en una muestra de prueba biológica del mismo sujeto y determinar en dicha muestra de prueba biológica la presencia o el nivel de por lo menos un compuesto, en el que dicho compuesto se selecciona de entre el grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de

71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2), anexina 1 (ANX1), un fragmento específico de las mismas seleccionado de entre un fragmento resultante de escisión intracelular de una pre-pro-proteína o de una pre-proteína, o un epítipo de la proteína reconocido específicamente por un anticuerpo contra la proteína, un ácido nucleico que codifica las mismas, y una combinación de los mismos,

5 d) comparar la presencia o el nivel de dicho por lo menos un compuesto con la presencia o el nivel del mismo compuesto en una muestra de referencia, y

10 e) determinar, a partir de la determinación del nivel de apoptosis inducida de la etapa b) y a partir de la comparación de la etapa d), la radiosensibilidad de dicho sujeto.

15 4. Método para predecir *in vitro* la susceptibilidad de toxicidad radioinducida tardía en un sujeto, que comprende un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y una etapa de predecir la susceptibilidad a toxicidad radioinducida tardía de dicho sujeto si dicho por lo menos un compuesto está presente en dicha muestra de prueba biológica y ausente en dicha muestra de referencia y/o si el nivel de dicho por lo menos un compuesto en dicha muestra de prueba biológica es superior al nivel del mismo compuesto en dicha muestra de referencia.

20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho estrés exógeno se induce mediante por lo menos irradiación.

6. Método según la reivindicación 5, en el que la dosis de irradiación está comprendida entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 16 Gy, preferentemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 14 Gy, más preferentemente es superior a aproximadamente 4 Gy, y más preferentemente es de aproximadamente 8 Gy.

25 7. Método según la reivindicación 1 a 4, en el que dicho por lo menos un agente radiomimético se selecciona de entre el grupo que consiste en: afidicolina, bleomicina, antibióticos de enodiino y peróxido de hidrógeno.

30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha muestra biológica es un extracto de sangre completa que contiene linfocitos.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 8, en el que dicha muestra biológica se prepara mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- 35 a) aislar linfocitos a partir de un extracto de sangre completa,
 b) irradiar dichos linfocitos aislados de la etapa a), y
 c) extraer proteínas a partir de los linfocitos de la etapa b).

40 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la presencia o el nivel de dicho por lo menos un compuesto se determina mediante por lo menos un método seleccionado de entre el grupo que consiste en: un método basado en la inmunodetección, un método basado en la inmunotransferencia de tipo Western, un método basado en la espectrometría de masas, un método basado en la cromatografía, un método basado en la citometría de flujo y un método para la detección específica de la presencia o el nivel de un ácido nucleico.

45 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo dicho método la detección de la presencia o el nivel de:

- 50 - una proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), un fragmento específico de la misma seleccionado de entre un fragmento resultante de la escisión intracelular de una pre-pro-proteína o de una pre-proteína, o un epítipo de la proteína reconocido específicamente por un anticuerpo contra la proteína, o un ácido nucleico que codifica la misma, y
 55 - por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), adenilato cinasa (AK2), anexina 1 (ANX1), un fragmento específico de las mismas seleccionado de entre un fragmento resultante de la escisión intracelular de una pre-pro-proteína o de una pre-proteína, o un epítipo de la proteína reconocido específicamente por un anticuerpo contra la proteína, un ácido nucleico que codifica las mismas y una combinación de los mismos.

60 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho sujeto está afectado por una enfermedad susceptible a ser tratada mediante radioterapia, seleccionándose dicha enfermedad de entre el grupo que consiste en: cáncer, enfermedad de Basedow, adenoma hipofisario, meningioma y talalgia.

65 13. Utilización de por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2) y anexina 1 (ANX1), un fragmento específico de las mismas seleccionado de entre un fragmento resultante de la escisión intracelular de una pre-pro-proteína o de una pre-proteína, o un epítipo de la proteína

reconocido específicamente por un anticuerpo contra la proteína, una molécula de ácido nucleico que codifica las mismas y una combinación de los mismos, como un marcador en un método para la determinación de la radiosensibilidad de un sujeto.

- 5 14. Kit adecuado para un método para la determinación de la radiosensibilidad de un sujeto, que comprende por lo menos un reactivo para la detección específica de por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitioapurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2), anexina 1 (ANX1),
10 un fragmento específico de las mismas seleccionado de entre un fragmento resultante de la escisión intracelular de una pre-pro-proteína o de una pre-proteína, o un epítipo de la proteína reconocido específicamente por un anticuerpo contra la proteína, una molécula de ácido nucleico que codifica las mismas y una combinación de los mismos, y un reactivo para la detección de la apoptosis celular.
- 15 15. Kit adecuado para un método para la determinación de la radiosensibilidad de un sujeto, que comprende por lo menos unos reactivos para la detección de por lo menos dos compuestos seleccionados de entre el grupo que consiste en: isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) mitocondrial, ADN-(sitioapurínico o apirimidínico) liasa (APEX1), proteína cognada de choque térmico de 71 kDa (HSC70), adenilato cinasa (AK2), anexina 1 (ANX1), un fragmento específico de las mismas seleccionado de entre un fragmento resultante de la escisión intracelular de una pre-pro-proteína o de una pre-proteína, o un epítipo de la proteína reconocido específicamente por un anticuerpo contra la proteína, un ácido nucleico que codifica las mismas y una combinación de los mismos, y un
20 reactivo para la detección de apoptosis celular.

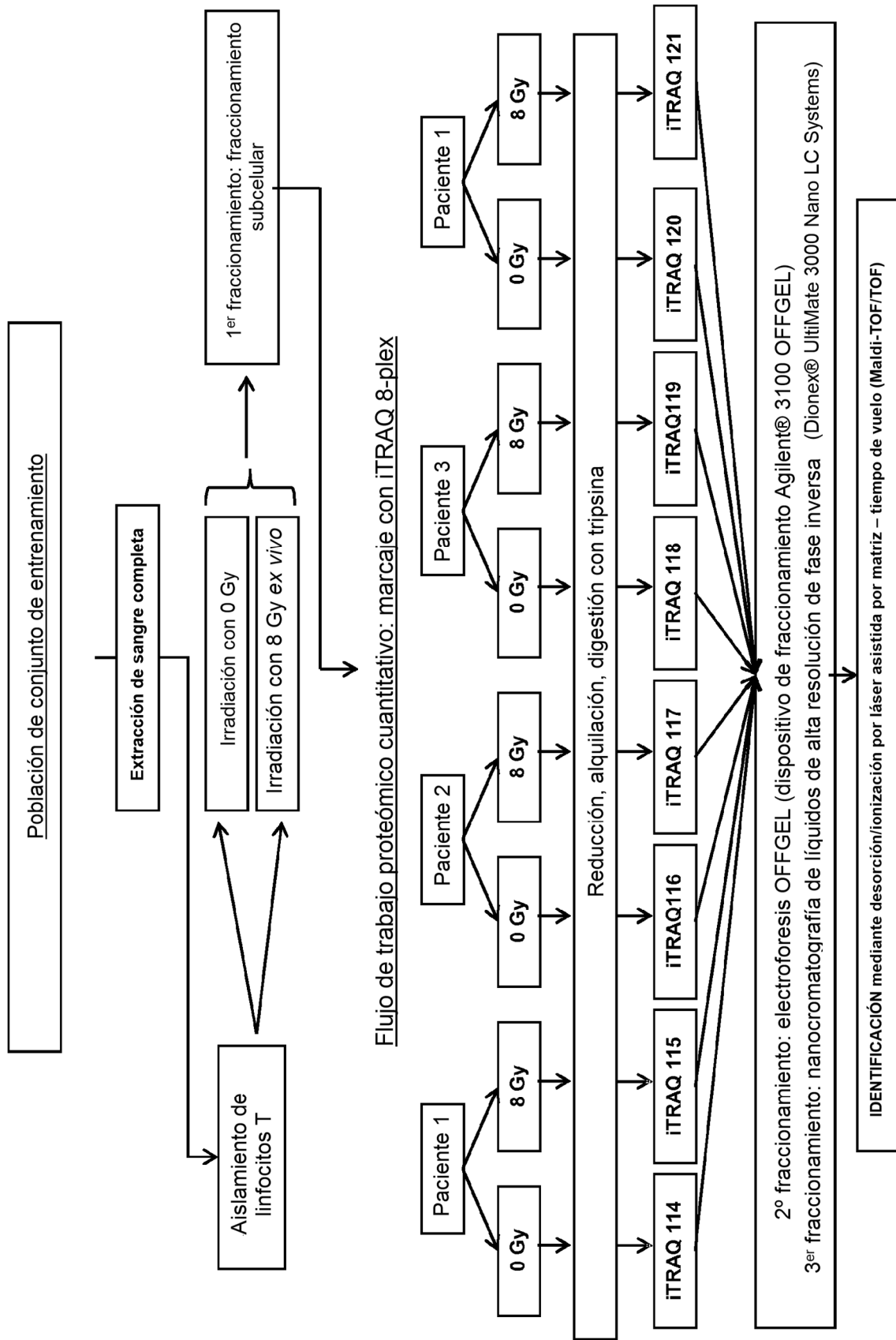


FIGURA 1

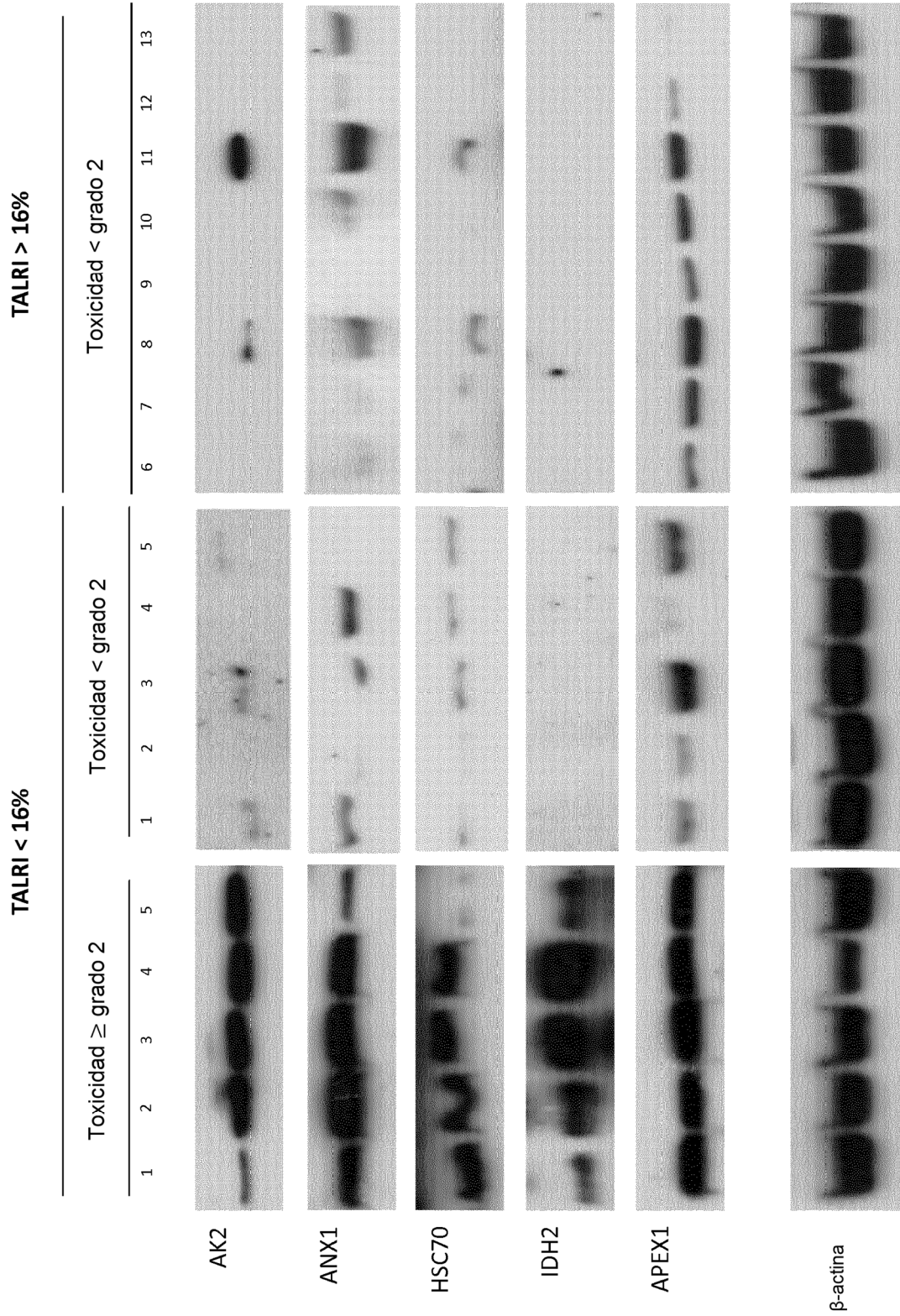


FIGURA 2

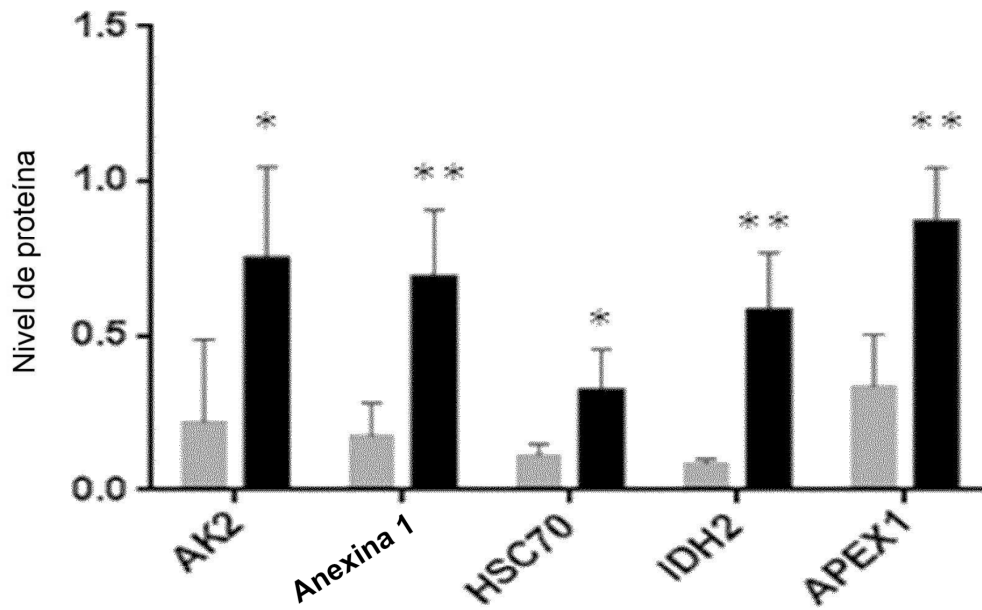


FIGURA 3

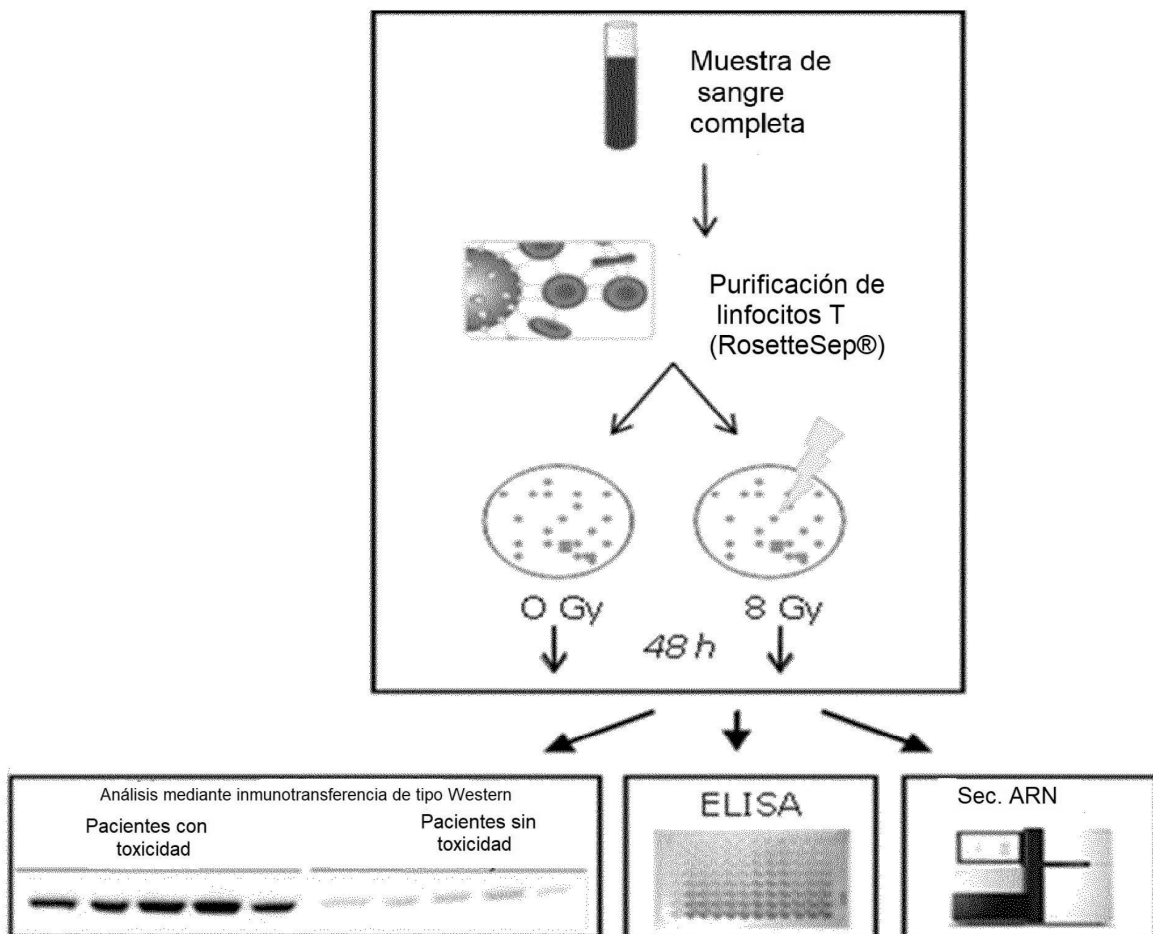


FIGURA 4

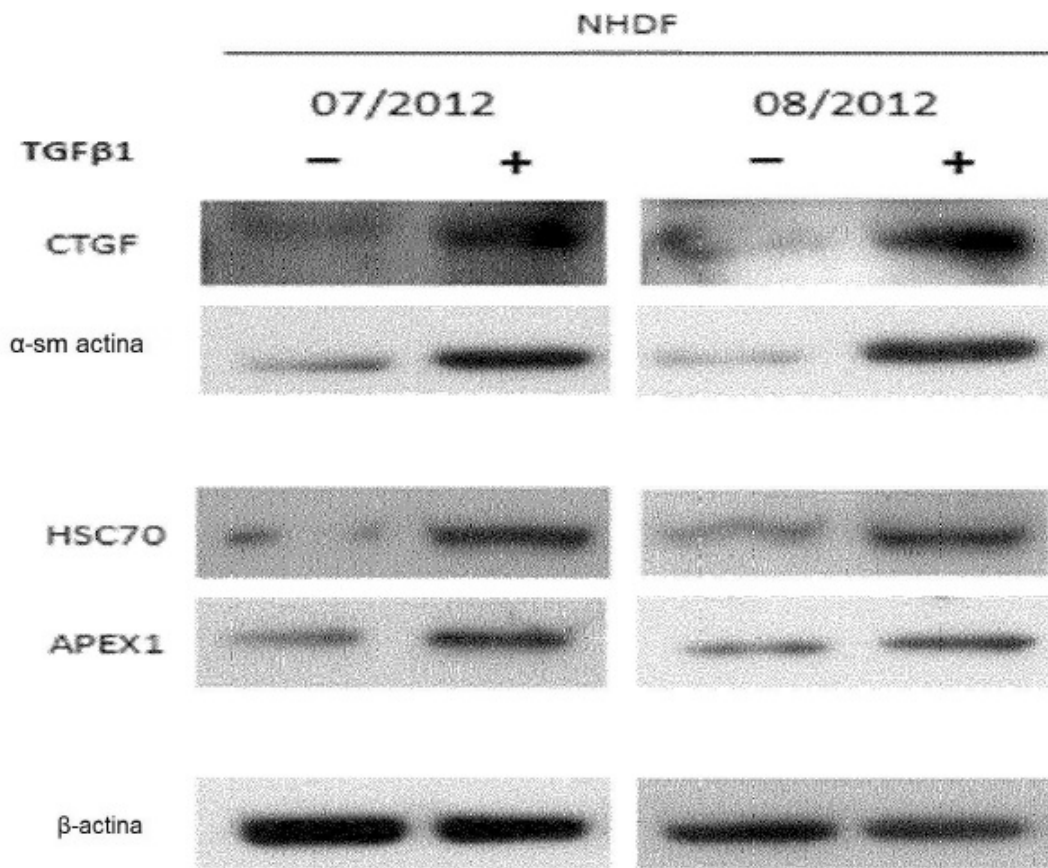


FIGURA 5A

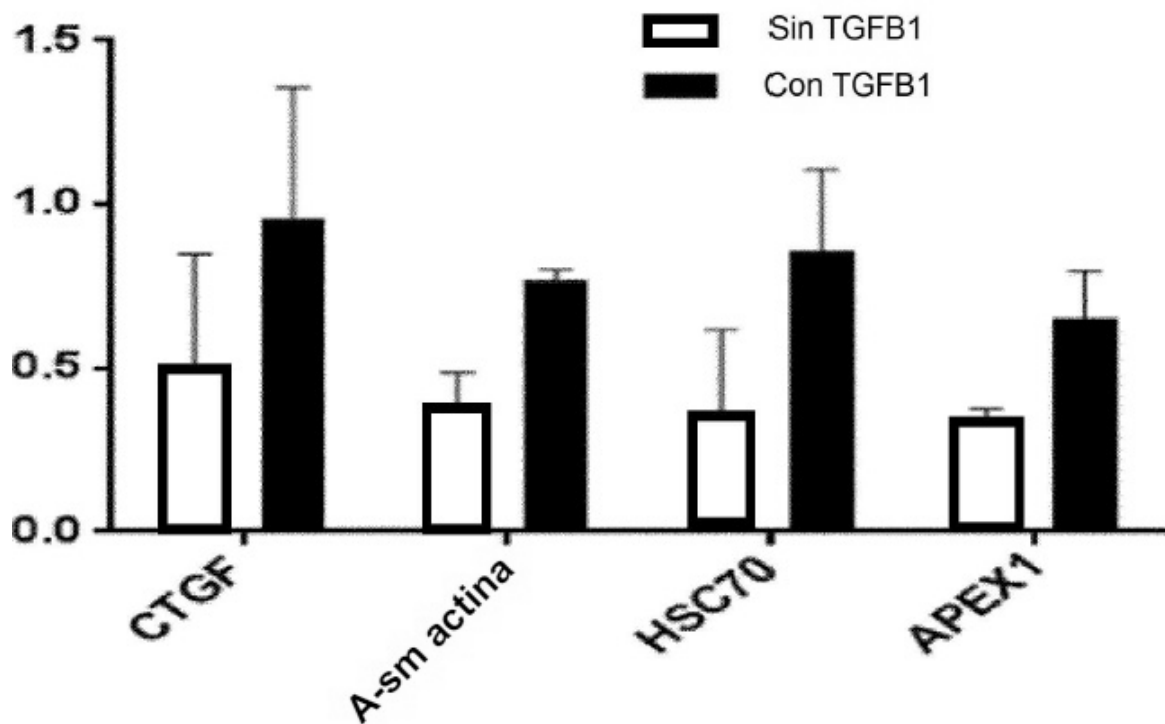


FIGURA 5B