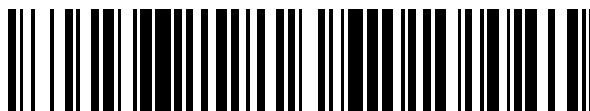


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 739**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2016 PCT/IB2016/050238**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2016 WO16116850**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2016 E 16709121 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3247805**

54 Título: **Método de evaluación de la respuesta de pacientes con ataxia telangiectasia a tratamiento con glucocorticoesteroides**

30 Prioridad:

19.01.2015 IT RM20150022

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

25.11.2019

73 Titular/es:

**ERYDEL S.P.A. (100.0%)
Via Antonio Meucci 3
20091 Bresso MI, IT**

72 Inventor/es:

**MAGNANI, MAURO;
BIAGIOTTI, SARA y
MENOTTA, MICHELE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 732 739 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de evaluación de la respuesta de pacientes con ataxia telangiectasia a tratamiento con glucocorticoesteroides

5 Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un procedimiento novedoso para evaluar la respuesta de pacientes afectados por ataxia telangiectasia (A-T) a tratamiento con glucocorticoesteroides. En particular, el procedimiento proporciona una etapa de identificación cualitativa y/o cuantitativa en la sangre de dichos pacientes de la expresión de un ARNm variante del gen ATM (ataxia telangiectasia-mutado) producido por corte y empalme no canónico inducido por glucocorticoesteroides (GC). De hecho, se demostró que la expresión del ARNm variante está presente en la sangre de pacientes que respondían positivamente al tratamiento con GC.

15 Estado de la técnica anterior

20 En los últimos años, diversos ensayos clínicos proporcionaron evidencias de que el tratamiento a corto plazo con glucocorticoesteroides (GC) puede mejorar los síntomas neurológicos en pacientes con A-T, e incluso el estado de atrofia cerebelar en algunos sujetos [1-4]. Desafortunadamente, dicha mejora es simplemente transitoria y desaparece poco después de interrumpir el tratamiento oral con GC; la interrupción es necesaria, ya que los peligros de un tratamiento a largo plazo con esteroides conllevaría superar sus beneficios [5]. Por otro lado, la administración de dosis muy bajas de GC por los eritrocitos podría reducir la toxicidad de esteroides son comprometer su eficacia [6-10]. Por lo tanto, en 2010 se configuró un estudio clínico en fase II que preveía el tratamiento a largo plazo de pacientes con A-T mediante dexametasona encapsulada dentro de eritrocitos autólogos [11]. El tratamiento propuesto consiguió una mejora significativa en los síntomas neurológicos, evitando simultáneamente la aparición de efectos secundarios conocidos típicos de GC.

25 Recientemente, experimentos *in vitro*, realizados en líneas celulares linfoblastoides estabilizadas de linfocitos de pacientes con A-T, permitieron a los autores de la invención demostrar que la acción del GC sintético dexametasona (dexa) puede ejercerse a través de la síntesis de una nueva molécula de ARN mensajero (ARNm) generada por un evento de corte y empalme no canónico en el precursor de pre-ARNm en el gen ATM (gen de ataxia telangiectasia mutado) [14].

30 Estudios *in silico* sugirieron que el transcrito resultante, mencionado por los autores de la invención como ATMdexa1, en lugar de ser ARN basura, podría traducirse por mecanismos celulares en una nueva forma "acortada" de la proteína ATM, saltando todas las mutaciones, presentes en el gen de pacientes con AT, por delante de la secuencia que codifica el dominio cinasa y de enzima funcional. Esta variante de proteína, llamada mini-ATM, se identificó de forma eficaz en líneas celulares linfoblastoides y se demostró que era potencialmente activa. Estos hallazgos dieron lugar a que los autores de la invención formularan la hipótesis de que el tratamiento con dexa puede restaurar, al menos parcialmente, la proteína ATM defectuosas en ataxia telangiectasia mediante este mecanismo molecular novedoso que, sorprendentemente, podía permitir "el salto" de la mayoría de las mutaciones hasta ahora descritas para el gen *ATM*.

35 Sumario de la invención

40 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

45 La presente invención se basa en el descubrimiento de que un nuevo transcrito de ARNm variante del gen ATM (gen de ataxia telangiectasia mutado) producido por corte y empalme no canónico inducido por tratamiento con glucocorticoesteroides (GC) es identificable en muestras de sangre obtenidas de pacientes con AT sometidos a tratamiento con GC, y que su presencia se correlaciona con respuesta positiva al tratamiento terapéutico.

50 En este documento se divulga un procedimiento novedoso para analizar cuantitativa y cualitativamente el ARNm variante del gen ATM como biomarcador de respuesta a tratamiento con glucocorticoesteroides, tales como dexametasona, en la sangre de pacientes. De hecho, los autores de la presente invención demostraron que la expresión de dicho ARNm variante está presente en la sangre de pacientes que respondían positivamente a tratamiento con GC, por encima de todo cuando el medicamento se encapsula dentro de eritrocitos, pero está ausente en controles sanos y en pacientes que no reciben el fármaco.

55 En este documento también se divulga:

60 Un método para evaluar la respuesta de pacientes afectados por ataxia telangiectasia al tratamiento con glucocorticoesteroides, que comprendiendo una etapa de identificación cualitativa y cuantitativa en la sangre de dichos pacientes de la expresión de un ARNm variante del gen ATM (gen de ataxia telangiectasia mutado), en el que dicho ARNm variante se produce por corte y empalme no canónico inducido por glucocorticoesteroides y contiene el dominio de la fosfatidil-inositol 3 cinasa, y en el que valores de expresión detectables de dicho ARNm variante indican respuesta positiva al tratamiento.

65

En este documento también se divulga un método para tratar a pacientes afectados por ataxia telangiectasia, que comprende

- una etapa de administrar una cantidad de glucocorticoesteroides, preferiblemente dexametasona, en dicho paciente;
- una etapa de identificación cualitativa y/o cuantitativa en la sangre de dichos pacientes de la expresión de un ARNm variante del gen ATM (gen de ataxia telangiectasia mutado), en el que dicho ARNm variante se produce por corte y empalme no canónico inducido por glucocorticoesteroides y contiene el dominio de la fosfatidil-inositol 3 cinasa, y en el que valores de expresión detectables de dicho ARNm variante indican respuesta positiva al tratamiento;
- una etapa de ajustar dicho tratamiento dependiendo de la respuesta.

En una realización de la invención, el glucocorticoesteroide se selecciona de: prednisolona, dexametasona, betametasona, deflazacort o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El ARNm variante del gen ATM divulgado en la invención es ARNm de ATMdexa1.

En una realización adicional, la identificación de la expresión del ARNm variante es cuantitativa y se normaliza frente a la expresión de un gen constitutivo.

En una realización adicional de la invención, la identificación del ARNm variante se realiza por cualquier técnica de amplificación usando pares de cebadores 5'-3' directo y 5'-3' inverso adecuados, opcionalmente asociados con sondas.

En una realización alternativa de la invención, el glucocorticoesteroide está encapsulado dentro de eritrocitos.

Las ventajas producidas por la presente invención son inmediatamente evidentes para un experto en la materia, cuando se considera que el tratamiento con glucocorticoesteroides a menudo va acompañado por efectos adversos, incluso graves, por encima de todo cuando el tratamiento se prolonga a lo largo del tiempo y/o se realiza en una población pediátrica. Aparentemente, la herramienta pronóstica producida por la presente invención evita prolongar los tratamientos en sujetos que no responden (insensibles) o que no responden suficientemente al tratamiento y, por lo tanto, de tratamientos inútiles y dañinos. Además, midiendo los niveles de expresión de ATMdexa1 es posible establecer la frecuencia óptima de administración de glucocorticoesteroides en un paciente dado, reduciendo el riesgo de sobredosis y de efectos adversos debido al tratamiento, conservando aún los efectos terapéuticos del mismo.

El mismo método podría usarse para desarrollar nuevos fármacos, incluso diferentes de los glucocorticoesteroides, sin embargo, que pueden inducir expresión de ATMdexa1 y, por lo tanto, proporcionan beneficios al paciente tratado.

Descripción de las figuras

Figura 1: Identificación cualitativa y cuantitativa de transcrito de ATMdexa1 en muestras de sangre obtenidas de pacientes con A-T tratados con ERYDEX. Los niveles de expresión de ATMdexa1 se detectaron por el método de RT-PCR con SYBRgreen y se compararon con los niveles de expresión de pacientes con A-T no tratados y voluntarios sanos WT no tratados (panel a). En un segundo análisis, los pacientes con A-T tratados con ERYDEX se subdividieron en dos subgrupos (sensibles e insensibles) basándose en la sensibilidad al tratamiento medida con la escala ICARS (Trouillas P, et al., "International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. - The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology". J Neurol Sci. 12 de febrero de 1997;145(2):205-11.) y los niveles de expresión relacionados se compararon entre los dos subgrupos tratados y con los controles sanos y no tratados (panel b). Como insensibles, en la figura, se consideran los pacientes que habían demostrado, después del tratamiento, una disminución del valor ICARS por debajo de o igual a 10 puntos, después de seis meses de tratamiento.

Figura 2: Cuantificación de ATMdexa1 en diferentes momentos desde el tratamiento. Para un paciente sensible y un paciente insensible, se evaluaron los niveles de expresión en los días + 8 y + 21 desde la administración de ERYDEX.

Figura 3: Curva patrón ejemplar de la amplificación de ATMdexa1 por el método de RT-PCR y SYBRgreen. Se obtuvieron curvas de amplificación (panel a), disociación (panel b) y linealidad (panel c) amplificando diluciones en serie de un plásmido recombinante adecuado de ATMdexa1.

Figura 4: Curvas de amplificación (panel a) y disociación (panel b) de ATMdexa1 en muestras de pacientes con A-T tratados con ERYDEX.

Figura 5: Análisis de la relación lineal existente entre los niveles de expresión de miniATM y la variación de ICARS dependiendo de la cantidad administrada de dexametasona (Dexa) (figura a). Confirmación de datos relacionados con la sensibilidad al tratamiento con ERYDEX y los niveles de expresión de miniATM entre los sensibles e insensibles, y los valores de ICARS respectivos (figura b).

Figura 6: Evaluación de la expresión de los genes de FKBP5 y DUSP1, cuya transcripción se induce por administración de dexametasona, en pacientes sensibles e insensibles tratados con Erydex.

Descripción detallada de la invención

El gen ATM (gen de ataxia telangiectasia mutado) se describió por Savitsky K, et al., en Science. 23 de junio de 1995;268(5218):1749-53. El gen, que codifica una proteína cinasa de la familia de PI 3-cinasa, se transcribe en 27 ARNm diferentes y en 20 formas variantes conocidas de ARNm debido al corte y empalme alternativo.

Nuevos transcritos de ARNm variantes, relevantes para los fines de la presente invención, son detectables en la sangre de pacientes. afectados por ataxia telangiectasia sometidos a tratamiento con glucocorticoesteroides, y se ligaron al efecto terapéutico en AT de los mismos glucocorticoesteroides.

Dichos transcritos son el resultado de un corte y empalme no canónico alternativo, inducido por glucocorticoesteroides que, limitando notablemente su longitud con respecto a los transcritos fisiológicos, elimina los sitios de mutación del gen ATM, sin embargo, conservando al menos parcialmente su región responsable de la actividad enzimática proteína cinasa, que contiene el dominio de la fosfatidil inositol 3 cinasa.

En particular, un trabajo experimental previo, realizado usando un glucocorticoesteroide ejemplar, fosfato de sodio de dexametasona, posibilitó la identificación *in vitro*, en líneas celulares de pacientes de A-T, de un transcrito de aproximadamente 1582 pb denominado ATMdexa1 (véase, M. Menotta et al., J. Biological Chemistry Vol. 287, n.º 49 del 30 de noviembre de 2012).

Se ha demostrado que la administración de derivados dexametasona, tales como sales diferentes de fosfato de sodio, o de glucocorticoesteroides de la misma familia de la dexametasona, igualmente conocidos por ejercer una mejora de efecto terapéutico en el cuadro clínico de ataxia telangiectasia, actúan mediante el mismo mecanismo, induciendo el mismo transcrito de ARNm variante o transcritos funcionalmente equivalentes.

Los autores de la presente invención ahora han observado que la síntesis de ATMdexa1 está directamente correlacionada con el tratamiento con el fármaco, ya que ni los sujetos con A-T, ni los sujetos WT, que no recibían tratamiento con dexametasona, mostraron niveles detectables de transcrito.

Para los fines de la presente invención, por la expresión "*niveles detectables de transcrito*" o "*valores de expresión detectables*" se entienden valores que, independientemente de la metodología de detección y las condiciones de funcionamiento (por ejemplo, número de ciclos o temperatura de una PCR) son mayores que los valores promedio de los controles (es decir, pacientes con A-T no tratados con GC o individuos sanos) de al menos 3 veces la desviación típica de la muestra de referencia.

Además, la expresión de *ATMdexa1* está directa y proporcionalmente correlacionada con la eficacia clínica, siendo mayor en aquellos pacientes con una mayor disminución de los síntomas globales de la enfermedad (es decir, disminución de la puntuación de ICARS con aumento Δ ICARS implicado) y estando asociada con una mayor mejora de los síntomas neurológicos (pacientes sensibles) en comparación con pacientes para los que no se observaron mejoras significativas de los síntomas de la enfermedad (pacientes insensibles). Los insensibles se consideran los pacientes que han demostrado, después del tratamiento, una disminución del valor de ICARS por debajo de o igual a 10 puntos, después de seis meses de tratamiento.

Además, se demostró que la expresión de los genes, tales como FKBP5 y DUSP1, que se sabe que se expresan en tratamiento con dexametasona, no varía en los dos grupos de pacientes (sensibles e insensibles), por lo tanto, resaltando la especificidad de miniATM como biomarcador específico de la eficacia del tratamiento.

Finalmente, se demostró la mayor expresión de *ATMdexa1* en los días inmediatamente después de la infusión del medicamento y disminuye lentamente a lo largo del tiempo, junto con la desaparición del fármaco en circulación, lo que confirma una relación entre la administración de dexametasona, la respuesta clínica y la expresión de ATMdexa1.

Los tratamientos y pacientes susceptibles a controlarse con el método de la presente invención son tratamientos de AT con administración de glucocorticoesteroides que se sabe que afectan positivamente al cuadro clínico de la enfermedad. Los glucocorticoesteroides se seleccionan de la familia que comprende prednisolona, dexametasona, betametasona, deflazacort, derivados de los mismos y formas salinas de los mismos, tales como fosfato diácido o fosfato de sodio, por ejemplo, fosfato de dexametasona, fosfato de sodio de dexametasona, fosfato o fosfato de sodio de betametasona, fosfato o fosfato de sodio de prednisolona, fosfato o fosfato de sodio de deflazacort. Evidentemente, las formas salificadas con sodio pueden remplazarse por las sales correspondientes y habituales de metales del grupo IA o IIA sin alterar la esencia de la invención.

En una forma específica de tratamiento que se puede controlar mediante el método de la invención, el medicamento se administra en una forma encapsulada dentro de eritrocitos. El proceso de encapsulación se describe en el documento WO2014/181309 titulado: "*Process for the Preparation of Erythrocytes Loaded with One or More Substances of Pharmaceutical Interest and so Obtained Erythrocytes*".

El trabajo experimental descrito en la presente solicitud se realizó usando fosfato de sodio de dexametasona encapsulado dentro de eritrocitos de acuerdo con el método descrito en el documento WO2014/181309.

Diversos métodos, todos basados en la reacción en cadena de la polimerasa, se idearon y configuraron para la identificación y cuantificación de la expresión del ARNm variante, por ejemplo, de ATMdexa1, en la muestra de

sangre recogida. Todas las metodologías introducidas en este documento permiten la cuantificación relativa y/o absoluta del ARNm mensajero en la muestra de interés.

5 A modo de ejemplo, la amplificación se realiza en muestras de sangre o en células monomorfonucleares periféricas (PBMC), por técnicas seleccionadas de: PCR, RT-PCR, RT-PCR con un agente intercalante, PCR con Taq polimerasa, PCR con el método de sondas Molecular Beacon, FRET-hibridación de sonda, PCR con sonda Scorpion. Los protocolos para cada tecnología se describen en la sección experimental de la presente solicitud y son objeto de la invención.

10 Como método de cuantificación, se usó preferiblemente el de la curva patrón configurada a partir de una molécula de plásmido recombinante para la secuencia del transcrito de ARNm (por ejemplo, ATMdexa1) añadido en cantidades conocidas y crecientes en muestras de ADN usadas como patrón para evaluar la eficacia de amplificación y la linealidad del método. Pueden usarse las mismas diluciones en serie del plásmido/ARN como control positivo de PCR y como criterio de referencia para la cuantificación absoluta de la molécula diana. Como alternativa, el ensayo proporciona un par de cebadores para amplificar, simultáneamente con la diana, el ARNm de HPRT1, seleccionado como gen constitutivo en la muestra de interés. Además de HPRT1, se ensayaron otros genes de referencia (por ejemplo, GAPDH, β 2M, etc.) y podrían usarse para la cuantificación relativa de ATMdexa1 gracias a los métodos de $\Delta\Delta C_t$ o Pfaffel.

20 De acuerdo con las diversas tecnologías, se diseñaron cebadores *directos* e *inversos* adecuados y se implementaron por los autores de la presente invención. Las secuencias de nucleótidos de dichos cebadores se enumeran en el listado de secuencias y en la tabla 1 a continuación.

De acuerdo con la tecnología empleada, también se usan sondas adecuadas para la detección de amplificadas. Las secuencias de algunas de estas sondas se presentan en el listado de secuencias y en la tabla 1.

Tabla 1

Método	Cebador directo 5'-----3'	Cebador inverso 5'-----3'	Sonda 5'-----3'	Indicador/ fluoróforo/ donador	Inactivador/ fluoróforo	Cuantificación
qRT-PCR SYBRgreen con	ATCTAGATC GGCATTCA GATTCCA	GCAGACCAG CCAATTACT AAAC	ninguna	SYBRgreen	ninguno	Directa
Ensayo de 5' nucleasa	CGCCTGATT CGAGATCC TGAA	GTGCCTCAA CACTTCTGA CCAT	AAACATCTAGAT CGGCATTCAGAT TCCAA	Cy3	BHQ2	
Ensayo de 5' nucleasa	CGCCTGATT CGAGATCC TGAA	GTGCCTCAA CACTTCTGA CCAT	TCTAGATCGGCA TTCAGATTCC	Cy3	BHQ2-Plus	
Molecular Beacon	AGAATGTCT GAGAATAG CA	AACCTAGAT GCCACTCAG	GATGGTCAGAAG TGTTGAGG	6-FAM	BHQ1	Molecular Beacon
Sondas de hibridación/FRET	ATCCTGAAA CAATTAAC AT	ACTTTGIGA TGCTTATATT AT	TTTACAGAAATA TATTCAGAAAAGA AACAGA/ TGAGAATAGCAA AACCAAATGTAT C	FAM	LC red 640	

Finalmente, los ejemplos de cebadores y sondas para la amplificación de genes constitutivos conocidos, usados como control positivo en los procesos de amplificación de acuerdo con la invención, se presentan en la tabla 2.

Tabla 2

Método	Cebador directo 5'-----3'	Cebador inverso 5'-----3'	Sonda 5'-----3'	Indicador/ fluoróforo/ donador	Inactivador/ fluoróforo	Cuantificación
qRT-PCR con SYBRgreen	TATGCTGAG GATTTGGAA AGGGT	CCATCACAT TGTAGCCCT CT	ninguna	SYBRgreen	ninguno	Directa
Ensayo de 5' nucleasa	GGAAAGGG TGTTTATTC CTCATGGA	GGCCTCCCA TCTCCTTCAT C	TATGGACAGGACT GAACGTCCTTGC	JOE	BHQ1	
Ensayo de 5' nucleasa	GGATTTGG AAAGGGTG TTTATTCC	GGCCTCCCA TCTCCTTCAT C	TGGACTAATTATG GACAGGACTGA	JOE	BHQ1-Plus	
Ensayo de 5' nucleasa	TATGCTGAG GATTTGGAA AGGGT	CCATCACAT TGTAGCCCT CT	TATGGACAGGACT GAACGTCCTTGC	JOE	BHQ1	
Molecular Beacon	TCGTGATTA GTGATGAT GA	TTATGGACA GGACTGAAC	TACCTAATCATTAT GCTGAGGATT	HEX	BHQ1	
Sondas de hibridación/FRET	GGCTATAA ATTCCTTGC T	GGACATAAA AGTAATTGG T	AGATCCATTCCCTA TGACTGTAGATT/ CAGACTGAAGAGC TATTGTAATGAC	FAM	LC red 640	

Sección experimental

La siguiente sección presenta, a modo de ejemplo, un trabajo experimental realizado bajo el estudio clínico IEDAT, usando dexametasona como muestra representativa de medicamentos glucocorticoesteroides.

Experimentación *in vivo*

Después de la aprobación del comité de ética a cargo, y con la aprobación por los pacientes o sus tutores legales en menores, se obtuvieron muestras de sangre de 10 de 22 pacientes incluidos en el estudio clínico IEDAT. La recogida de sangre se realizó al final del tratamiento, precisamente en el día 21 desde la sexta y última infusión de dexametasona intraeritrocitaria (ERYDEX®) proporcionada por el estudio clínico. La muestra de sangre también se recogió en tubos especialmente proporcionados (vacutainers) que contenían una solución estabilizante adaptada para conservar el ARN para la posterior extracción. En resumen, el ARN extraído se transcribió de nuevo en el ADNc correspondiente y se sometió a análisis con el objetivo de medir la expresión de ATMdexa1. Para este fin, se configuró un ensayo de PCR en tiempo real para el análisis cualitativo y cuantitativo, que puede identificar específicamente la nueva molécula de ARNm descrita por primera vez en células linfoblastoides. Gracias a dicho ensayo, se identificó ATMdexa1 en las 10 muestras disponibles. Se realizaron las mismas investigaciones en muestras de sangre de pacientes con A-T no tratados con fármaco dexametasona y sujetos sanos voluntarios (WT), usados como control. En dichas muestras, nunca se detectó ATMdexa1 (figura 1a). Los resultados presentados sugieren que la inducción de la isoforma ATMdexa1 parece depender estrictamente del tratamiento con el fármaco.

La eficacia de ERYDEX sobre los síntomas neurológicos de pacientes con A-T, evaluados según el estudio por la escala ICARS, reveló que una mayor mejora estaba asociada a una mayor encapsulación y, por lo tanto, a una mayor administración de fármaco [11]. Por esta razón, los pacientes se agruparon en sensibles (o "que responden") e insensibles (o "que no responden"). Para correlacionar la eficacia de dexta con la inducción de ATMdexa1, se realizó un subanálisis subdividiendo las muestras de los pacientes en dos grupos. Como se muestra en la figura 1b, los pacientes sensibles con A-T (muestras) muestran mayor expresión de ATMdexa1 en comparación con las de pacientes insensibles, lo que sugiere que, de hecho, la expresión de ATMdexa1 parece estar directamente correlacionada con, o al menos contribuye a, la eficacia de dexta. Finalmente, se analizaron muestras de sangre, a partir de un único paciente de ambos grupos, recogidas en diferentes momentos desde la infusión de ERYDEX, específicamente en los días + 8 y + 21 desde la administración. En este caso también, los pacientes sensibles demostraron niveles de expresión mayores que los insensibles en ambos tiempos. Sin embargo, se observó sorprendentemente (comparando los niveles entre pacientes en ambos casos) que el transcrito de ATMdexa1 se expresa a niveles mayores en el día + 8 que en el día + 21 (figura 2). Esto es coherente con la disminución gradual del efecto de dexta a lo largo del tiempo desde el tratamiento, un hecho que resalta la necesidad de recurrir a administraciones repetidas para mantener la eficacia del fármaco activa.

En un experimento posterior, en que se incluyeron pacientes de forma similar a los descrito anteriormente, se observó una relación directamente proporcional entre la expresión de miniATM y la variación de ICARS dependiendo de la cantidad de fármaco (dexametasona) administrada (figura 5 a). En particular, la correlación entre la expresión de miniATM y la cantidad de fármaco (dexametasona) administrada es de tipo lineal. Además, se confirmó que un aumento de la expresión de miniATM se correlaciona con una mayor mejora de los síntomas neurológicos, es decir, disminución de las puntuaciones ICARS y aumento Δ ICARS implicado. (figura 5 b).

Finalmente, una evaluación de la expresión de los genes FKBP5 y DUSP1 en las mismas muestras usadas para la determinación de miniATM resaltó que, aunque el tratamiento con glucocorticoesteroides siempre aumenta la expresión de dichos genes, el nivel de expresión no cambia significativamente en los dos grupos de pacientes (sensibles e insensibles). Esta observación resalta la especificidad de la expresión de miniATM como biomarcador específico de eficacia del tratamiento.

Para resumir, el nuevo transcrito de ATMdexa1 identificado recientemente en líneas celulares linfoblastoides *ATM*^{-/-} [14], se identificó por primera vez *in vivo*, en particular, en PBMC de pacientes con A-T tratados con ERYDEX. La síntesis de ATMdexa1 está directamente correlacionada con el tratamiento con el fármaco, ya que ni sujetos con A-T, ni sujetos WT que no habían recibido dexametasona demostraron niveles detectables de transcrito. Además, la expresión de *ATMdexa1* está directamente correlacionada con la eficacia clínica, siendo mayor en aquellos pacientes con mayor disminución de la puntuación ICARS y estando asociada con una mayor mejora de síntomas neurológicos. Finalmente, se demostró que la expresión de ATMdexa1 era mayor en los días inmediatamente posteriores a la infusión de ERYDEX y disminuye lentamente a lo largo del tiempo, en paralelo con la desaparición del fármaco en circulación, lo que confirma una asociación entre la administración de dexametasona, la respuesta clínica y la expresión de ATMdexa1.

Protocolo experimental para la identificación de ARNm de ATMdexa1 y cuantificación en PBMC de pacientes con A-T tratados con dexametasona

1) Recogida de muestras:

Se recogieron 3 ml de sangre de pacientes con A-T y voluntarios sanos directamente en tubos de ARN sanguíneo Vacutainer Tempus (Applied Biosystems), que contenían una solución de lisis y un reactivo estabilizante que asegura la conservación del ARN hasta su posterior extracción. Inmediatamente después de la extracción, las muestras se congelaron y pudieron mantenerse a -20 °C durante varios meses. El traslado desde los centros hospitalarios hasta el laboratorio de los autores de la presente invención se realizó a la misma temperatura para evitar la descongelación y el deterioro de la muestra.

2) Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario:

Las muestras sanguíneas se procesaron para la extracción de ARN total mediante el kit de aislamiento de ARN Tempus spin (Applied Biosystems) presentado en las instrucciones del fabricante.

Se hizo un proceso de limpieza que seguía a una purificación previa por el kit de extracción de ARN QIAGEN para una eliminación completa del ADN contaminante. El rendimiento promedio fue de aproximadamente 8,5 microgramos de ARN total puro para cada muestra, que consiste al principio de 3 ml de sangre completa. Después, se emplearon 500 ng de ARN de cada muestra para la reacción de retrotranscripción en el ADN complementario correspondiente (ADNc), catalizada por la enzima transcriptasa inversa SMARTScribe (Clontech) en presencia de oligodT o hexámeros aleatorios o ambos, para cebar la reacción. La síntesis de ADNc se realizó como se presenta en el protocolo ilustrado por el fabricante.

Se añadió molécula de ARN no conservada exógena, obtenida de una especie diferente a *Homo sapiens* (por ejemplo, ARNm bacteriano o vegetal), antes de los procedimientos de extracción de ARN y síntesis de ADNc, como control interno, para que se pueda verificar la eficacia de extracción, síntesis y posterior amplificación. Más preferiblemente, la molécula usada como patrón puede añadirse directamente a la solución estabilizante contenida en el vacutainer.

3) Ensayo de PCR para la cuantificación de ATMdexa1 en las muestras:

Se han ideado varios métodos, todos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se han configurado para la identificación y cuantificación de ATMdexa1 en la muestra de sangre recogida; algunos de ellos se describen en detalle a partir de ahora en este documento y, por lo tanto, se reivindican como invención. Todas las metodologías introducidas aquí permiten la cuantificación relativa y/o absoluta del ARN mensajero de ATMdexa1 en la muestra de interés.

a) El primer método reivindicado prevé el uso de un agente intercalante, como, por ejemplo, SYBRgreen o cualquier otro fluoróforo que tenga acción intercalante, en la doble cadena (dc) del ADN. Dicha tecnología se basa en la amplificación específica de una familia de ADNc por PCR en tiempo real cuantitativa en presencia del agente intercalante que se intercala en la doble hebra del ARN creciente para controlar la síntesis del amplicón. Específicamente, para sus experimentos, el autor de la invención usó SYBR Premix Ex Taq (Tli RNasaH Plus) de Takara, que contiene la enzima Taq polimerasa y SYBRgreen en un sistema de tampón adecuado. Se añadió una cantidad adicional de MgCl₂ a la mezcla de reacción para alcanzar la concentración final óptima de 3,5 mM, así como un par de cebadores específicos a una concentración final de 300 nM. El par de oligonucleótidos se diseñó *in silico* para que reconocieran selectivamente el ADN complementario al transcrito ATMdexa1 (ADNc de ATMdexa1) en perjuicio del ARNm nativo (tablas 1 y 2). En el ejemplo propuesto en este documento, la fluoresceína sin procesar, medida en tiempo real en las muestras en amplificación, era estrictamente dependiente de la cantidad de ARN de ATMdexa1 presente en la muestra de origen, y empleará varios ciclos de amplificación inversamente proporcional a la cantidad de ARN inicial, para alcanzar el nivel umbral de fluorescencia. El perfil térmico optimizado para obtener una amplificación específica y lineal de ATMdexa1 se ajustó en 40 ciclos de desnaturalización (durante 10 s a 94 °C), hibridación (durante 20 s a 65 °C) y prolongación a 72 °C durante 36 segundos. Como método para la cuantificación, se usó el de una curva patrón generada a partir de una molécula de plásmido recombinante para la secuencia de ATMdexa1 añadida en cantidades conocidas y crecientes en muestras de ADN usadas como patrón para evaluar la eficacia de amplificación y la linealidad del método. Pueden usarse las mismas diluciones en serie del plásmido de ATMdexa1 como control positivo de PCR y como criterio de referencia para la cuantificación absoluta de la molécula diana. Como alternativa, el ensayo prevé un par de cebadores para amplificar en la muestra de interés, simultáneamente con la diana, el ARNm de HPRT1 seleccionado como gen constitutivo. Además de HPRT1, se ensayaron otros genes de referencia (por ejemplo, GAPDH, β 2M, etc.) y podrían usarse para la cuantificación relativa de ATMdexa1 gracias a los métodos de $\Delta\Delta C_t$ o Pfaffel.

Los resultados experimentales, dados en la descripción de la invención, se obtuvieron mediante el ensayo descrito en esta sección. La validación del método preveía la configuración de una curva patrón como se describe anteriormente. Las curvas relacionadas de amplificación (figura 3, panel A), disociación (figura 3, panel B) y linealidad (figura 3, panel C) se presentan en la figura 3, que demuestra una amplificación específica, lineal y unívoca de ATMdexa1. La línea de linealidad extrapolada tiene una pendiente de -3,30 (correspondiente a una eficacia de amplificación de un 100 %) y un R² de 0,99.

Las muestras de interés, de pacientes con A-T sometidos a tratamiento con dexa, se amplificaron en las mismas condiciones y se compararon con las de pacientes con A-T sin tratar y voluntarios sanos. Se obtuvo amplificación

específica en todas las muestras de investigación, como se muestra en la figura 4, mientras que no se detectó amplificación en las muestras de control. Los ciclos de umbral (Ct) derivados de muestras positivas se usaron para el cálculo de las cantidades relativas de ARNm de ATMdexa1 sustrayendo el Ct de umbral relacionado del HPRT1 constitutivo.

b) El segundo método ejemplificado se basa en el ensayo de 5' nucleasa, que explota la actividad 5' exonucleasa de la enzima Taq polimerasa. Además del par de cebadores específicos, se usa asimismo una sonda de ADN específica, que hibrida en el amplicón recién sintetizado y se hidroliza por la polimerasa durante la prolongación de la cadena. La sonda alberga, unida a los extremos 3' y 5', respectivamente un inactivador (inactivador BHQ o BHQPlus) y un fluoróforo indicador, donde el primero inhibe la emisión del último. La hidrólisis de la sonda por la polimerasa causa desprendimiento y separación del inactivador, con la consecuente emisión de fluorescencia. La reacción se realizó en las muestras de los autores de la invención usando el kit HOT-RESCUE REAL TIME PCR FP (Diateva). Para la diana ATMdexa1, se diseñó una sonda específica con Cy3 como fluoróforo indicador, mientras que para el HPRT1 constitutivo, se diseñó una sonda específica con JOE como fluoróforo, para obtener señales específicas para el gen diana y el gen de referencia y poder realizar ambas reacciones en PCR múltiple. La concentración de los dos pares de cebadores (tabla 1 y 2) se optimizó a 500 nM, mientras que la concentración de la sonda fue de 100 nM. El perfil térmico se estableció en 50 ciclos de desnaturalización de 15 s a 94 °C, seguidos de una etapa de hibridación/prolongación a 60 °C durante 60 segundos. En este caso también, la cuantificación de ATMdexa1 puede realizarse de manera relativa (con respecto al gen de referencia) o de manera absoluta, como se describe en el ejemplo previo.

c) ATMdexa1 puede cuantificarse mediante una serie de otros ensayos, todos basados en la tecnología de PCR. Por ejemplo, las sondas a usar en el método Molecular Beacon se diseñaron por los autores de la invención. En esta solicitud, la amplificación se realiza en presencia de sondas Molecular Beacon que están marcadas en el extremo 5' con un tinte indicador fluorescente (FAM para ATMdexa1 y HEX para HPRT1) y en el extremo 3' con un inactivador (BHQ1, tablas 1 y 2). Durante la etapa de hibridación, los cebadores y las sondas hibridan con la secuencia respectiva del ADN complementario. La hibridación de las sondas, en particular, causa su "apertura" y la consiguiente separación del fluoróforo y el inactivador; por lo tanto, el inactivador ya no puede absorber la energía emitida por el fluoróforo indicador.

d) Otro ejemplo de método propuesto se basa en una sonda de hibridación/FRET, que consiste en el uso de dos sondas marcadas: la primera en el extremo 3' con un fluoróforo donador (FAM), mientras que la segunda en el extremo 5' con un fluoróforo aceptador (LC red 640).

e) Finalmente, el ensayo de PCR puede configurarse a partir de sondas de tecnología Scorpion.

Las secuencias de todos los pares de cebadores y de todas las sondas propuestas en los ejemplos mencionados anteriormente, para la amplificación y la cuantificación sucesiva de ATMdex1 en las muestras biológicas, se presentan en las tablas 1 y 2.

Referencias

1. Broccoletti T, Del GE, Amorosi S, Russo I, Di BM et al., Steroid-induced improvement of neurological signs in ataxia-telangiectasia patients. *Eur J Neurol* 2008, 15:223-228.
2. Buoni S, Zannoli R, Sorrentino L y Fois A. Betamethasone and improvement of neurological symptoms in ataxia-telangiectasia. *Arch Neurol* 2006, 63:1479-1482.
3. Russo I, Cosentino C, Del GE, Broccoletti T, Amorosi S et al., In ataxia-telangiectasia betamethasone response is inversely correlated to cerebellar atrophy and directly to antioxidative capacity. *Eur J Neurol* 2009, 16:755-759.
4. Broccoletti T, Del GE, Cirillo E, Vigliano I, Giardino G et al., Efficacy of very-low-dose betamethasone on neurological symptoms in ataxia-telangiectasia. *Eur J Neurol* 2011, 18:564-570.
5. Gatti RA y Perlman S. A proposed bailout for A-T patients? *Eur J Neurol* 2009, 16:653-655.
6. Biagiotti S, Paoletti MF, Fraternali A, Rossi L y Magnani M. Drug delivery by red blood cells. *IUBMB Life* 2011, 63:621-631.
7. Bossa F, Latiano A, Rossi L, Magnani M, Palmieri O et al., Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with mild-to-moderate ulcerative colitis, refractory to mesalamine: a randomized, controlled study. *Am J Gastroenterol* 2008, 103:2509-2516.
8. Castro M, Rossi L, Papadatou B, Bracci F, Knafelz D et al., Long-term treatment with autologous red blood cells loaded with dexamethasone 21-phosphate in pediatric patients affected by steroid-dependent Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007, 44:423-426.
9. Pierige F, Serafini S, Rossi L y Magnani M. Cell-based drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60:286-295.
10. Rossi L, Serafini S, Cenerini L, Picardi F, Bigi L et al., Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Biotechnol Appl Biochem* 2001, 33:85-89.
11. Chessa L, Leuzzi V, Plebani A, Soresina A, Micheli R et al., Intra-erythrocyte infusion of dexamethasone reduces neurological symptoms in ataxia telangiectasia patients: results of a phase 2 trial. *Orphanet J Rare Dis* 2014, 9:5.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:1
 5 ATCTAGATCGGCATTGAGATTCCA
 SEQ ID NO:2
 GCAGACCAGCCAATTACTAAAC
 SEQ ID NO:3
 CGCCTGATTGAGATCCTGAA
 SEQ ID NO:4
 10 GTGCCTCAACACTTCTGACCAT
 SEQ ID NO:5
 AAACATCTAGATCGGCATTGAGATTCCA
 SEQ ID NO: 6
 CGCCTGATTGAGATCCTGAA
 15 SEQ ID NO: 7
 GTGCCTCAACACTTCTGACCAT
 SEQ ID NO: 8
 TCTAGATCGGCATTGAGATTCC
 SEQ ID NO: 9
 20 AGAATGTCTGAGAATAGCA
 SEQ ID NO: 10
 AACTTAGATGCCACTCAG
 SEQ ID NO: 11
 GATGGTCAGAAGTGTTGAGG
 25 SEQ ID NO: 12
 ATCCTGAAACAATTAACAT
 SEQ ID NO: 13
 ACTTTGTGATGCTTATATTAT
 SEQ ID NO: 14
 30 TTTACAGAAATATATTCAGAAAGAAACAGA
 SEQ ID NO: 15
 TGAGAATAGCAAACCAATGTATC
 SEQ ID NO: 16
 TATGCTGAGGATTTGGAAAGGGT
 35 SEQ ID NO: 17
 CCATCACATTGTAGCCCTCT
 SEQ ID NO: 18
 GGAAAGGGTGTTTATTCCTCATGGA
 SEQ ID NO: 19
 40 GGCCTCCCATCTCCTTCATC
 SEQ ID NO: 20
 TATGGACAGGACTGAACGTCTTGC
 SEQ ID NO: 21
 GGATTTGGAAAGGGTGTTTATTCC
 45 SEQ ID NO: 22
 GGCCTCCCATCTCCTTCATC
 SEQ ID NO: 23
 TGGACTAATTATGGACAGGACTGA
 SEQ ID NO: 24
 50 TATGCTGAGGATTTGGAAAGGGT
 SEQ ID NO: 25
 CCATCACATTGTAGCCCTCT
 SEQ ID NO: 26
 TCGTGATTAGTGATGATGA
 55 SEQ ID NO: 27
 TTATGGACAGGACTGAAC
 SEQ ID NO: 28
 TACCTAATCATTATGCTGAGGATT
 SEQ ID NO: 29
 60 GGCTATAAATTCTTTGCT
 SEQ ID NO: 30
 GGACATAAAAGTAATTGGT
 SEQ ID NO: 31
 AGATCCATTCTATGACTGTAGATT
 65 SEQ ID NO: 32
 CAGACTGAAGAGCTATTGTAATGAC

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> EryDeL S.p.A.

5 <120> Método de evaluación de la respuesta de pacientes con ataxia telangiectasia a tratamiento con glucocorticoesteroides.

<130> BW855R

10 <160> 32

<170> BiSSAP 1.2

15 <210> 1
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<222> 1..24
<223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador directo" /organismo="Secuencia artificial"

25 <400> 1
atctagatcg gcattcagat tcca 24

<210> 2
<211> 22
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<222> 1..22
35 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador inverso" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 2
gcagaccagc caattactaa ac 22

40 <210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<222> 1..21
<223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador directo" /organismo="Secuencia artificial"

50 <400> 3
cgcctgattc gagatcctga a 21

<210> 4
<211> 22
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
60 <222> 1..22
<223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador inverso" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 4
gtgcctcaac acttctgacc at 22

65 <210> 5

<211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..29
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="sonda" /organismo="Secuencia artificial"

10

<400> 5
 aaacatctag atcgcatc agattcaa 29

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador directo" /organismo="Secuencia artificial"

20

<400> 6
 cgctgattc gagatcctga a 21

25

<210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador inverso" /organismo="Secuencia artificial"

35

<400> 7
 gtcctcaac acttctgacc at 22

40

<210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="sonda" /organismo="Secuencia artificial"

45

<400> 8
 tctagatcgg cattcagatt cc 22

50

<210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador directo" /organismo="Secuencia artificial"

60

<400> 9
 agaatgtctg agaatagca 19

65

<210> 10
 <211> 18

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador inverso" /organismo="Secuencia artificial"

10
 <400> 10
 aacttagatg ccactcag 18

15
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="sonda" /organismo="Secuencia artificial"

25
 <400> 11
 gatggtcaga agtggtgagg 20

30
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador inverso" /organismo="Secuencia artificial"

40
 <400> 12
 atcctgaaac aattaaacat 20

45
 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador inverso" /organismo="Secuencia artificial"

55
 <400> 13
 actttgtgat gcttatatta t 21

60
 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="sonda" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 14
 ttacagaaa tatattcaga aagaaacaga 30

<210> 15
 <211> 25
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 5 <222> 1..25
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="sonda" /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 15
 10 tgagaatagc aaaaccaa at gtatc 25
 <210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador directo" /organismo="Secuencia artificial"
 20 <400> 16
 tatgctgagg attggaag ggt 23
 <210> 17
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador inverso" /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 17
 35 ccatcacatt gtagccctct 20
 <210> 18
 <211> 25
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 45 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador directo" /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 18
 ggaaagggtg ttattcctc atgga 25
 50 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador inverso" /organismo="Secuencia artificial"
 60 <400> 19
 ggcctccat ctcctcatc 20
 <210> 20
 <211> 24
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="sonda" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 20
 tatggacagg actgaacgtc ttgc 24

10
 <210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador directo" /organismo="Secuencia artificial"

20
 <400> 21
 ggatttgaa aggggttta ttcc 24

25
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador inverso" /organismo="Secuencia artificial"

35
 <400> 22
 ggcctccat ctcctcatc 20

40
 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="sonda" /organismo="Secuencia artificial"

50
 <400> 23
 tggactaatt atggacagga ctga 24

55
 <210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador directo" /organismo="Secuencia artificial"

65
 <400> 24
 tatgctgagg atttgaaag ggt 23

<210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador inverso" /organismo="Secuencia artificial"

5 <400> 25
 ccatcacatt gtagccctct 20

<210> 26
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador directo" /organismo="Secuencia artificial"

15

<400> 26
 tcgtgattag tgatgatga 19

20

<210> 27
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador inverso" /organismo="Secuencia artificial"

30

<400> 27
 ttatggacag gactgaac 18

35

<210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="sonda" /organismo="Secuencia artificial"

45

<400> 28
 tacctaatca ttatgctgag gatt 24

50

<210> 29
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador directo" /organismo="Secuencia artificial"

60

<400> 29
 ggctataaat tctttgct 18

65

<210> 30
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

<222> 1..19
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="cebador inverso" /organismo="Secuencia artificial"

5 <400> 30
 ggacataaaa gtaattggt 19

10 <210> 31
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="sonda" /organismo="Secuencia artificial"

20 <400> 31
 agatccattc ctatgactgt agatt 25

25 <210> 32
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="sonda" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 32
 cagactgaag agctattgta atgac 25

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para evaluar la respuesta de pacientes afectados por ataxia telangiectasia al tratamiento con un glucocorticoesteroide de la misma familia de dexametasona, que comprende una etapa de identificación cualitativa y/o cuantitativa, en la sangre de dichos pacientes, de la expresión de una variante de corte y empalme de ARNm no canónica del gen de ATM (gen de ataxia telangiectasia mutado), en el que la variante contiene el dominio de la fosfatidil inositol 3 cinasa, en el que dicho ARN variante se amplifica usando al menos uno de los siguientes pares de cebadores 5'-3' directo 5'-3' inverso:
- 5
- 10 SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2;
SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4,
SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 7,
SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 13
- 15 y en el que los valores de expresión detectables de dicho ARNm variante indican respuesta positiva al tratamiento.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el glucocorticoesteroides se selecciona de: prednisolona, dexametasona, betametasona, deflazacort o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos o mezclas de los mismos.
- 20
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el glucocorticoesteroides es fosfato de prednisolona, fosfato de dexametasona, fosfato de betametasona, fosfato de betametasona, fosfato de deflazacort y sales de sodio de los mismos.
- 25
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ARNm variante del gen de ATM es ARNm de ATMdexa1.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la identificación cuantitativa de la expresión del ARNm variante se normaliza frente a la expresión de un gen constitutivo.
- 30
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la identificación del ARNm variante se realiza por cualquier técnica de amplificación.
- 35
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la identificación del ARNm variante se realiza mediante una técnica seleccionada de: PCR, RT-PCR, RT-PCR con un agente intercalante, PCR con Taq polimerasa, PCR con el método de sondas Molecular Beacon, FRET-hibridación de sonda, PCR con sonda Scorpion.
- 40
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la amplificación se realiza usando una sonda seleccionada de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el glucocorticoesteroide es un glucocorticoesteroide encapsulado dentro de eritrocitos.
- 45
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el glucocorticoesteroide es fosfato de dexametasona mono o disodio.
11. Un glucocorticoesteroide de la misma familia de dexametasona para su uso en un método para tratar a pacientes afectados por ataxia telangiectasia, que comprende: (a) una etapa de administración de una cantidad de glucocorticoesteroide al paciente, (b) una etapa de identificación cualitativa y/o cuantitativa en la sangre del ARNm variante de ATMdexa1 del gen de ATM (gen de ataxia telangiectasia mutado), en el que los valores de expresión detectables de dicho ARNm variante indican una respuesta positiva al tratamiento, (c) una etapa de ajuste de dicho tratamiento dependiendo de la respuesta obtenida en la etapa (b).
- 50
12. El glucocorticoesteroide para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el glucocorticoesteroides se selecciona de: prednisolona, dexametasona, betametasona, deflazacort o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos, preferiblemente fosfato, o mezclas de los mismos.
- 55
13. El glucocorticoesteroide para su uso en un método de acuerdo con las reivindicaciones 11-12, en el que el glucocorticoesteroide es un glucocorticoesteroide encapsulado dentro de eritrocitos.
- 60

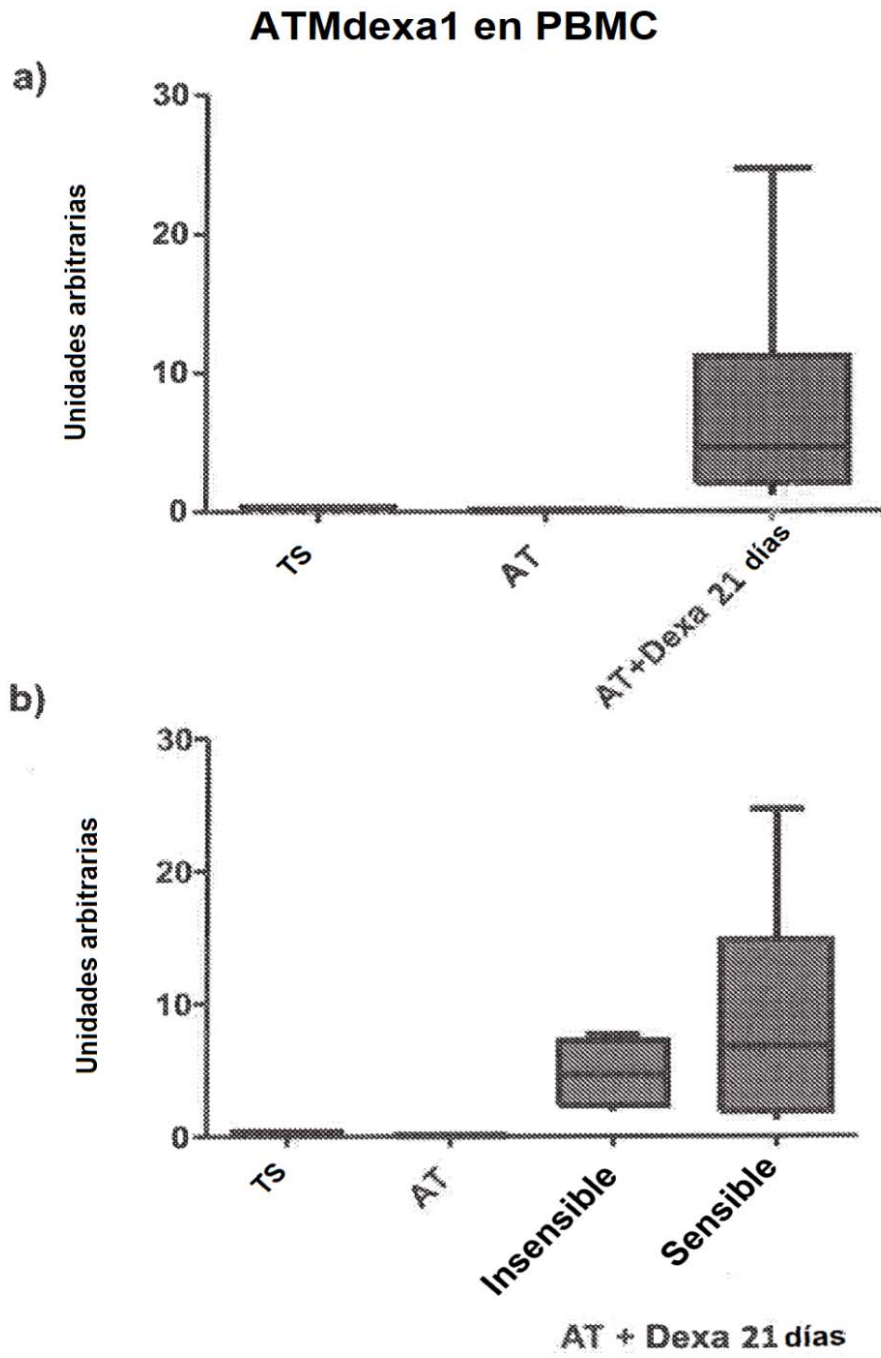


FIGURA 1

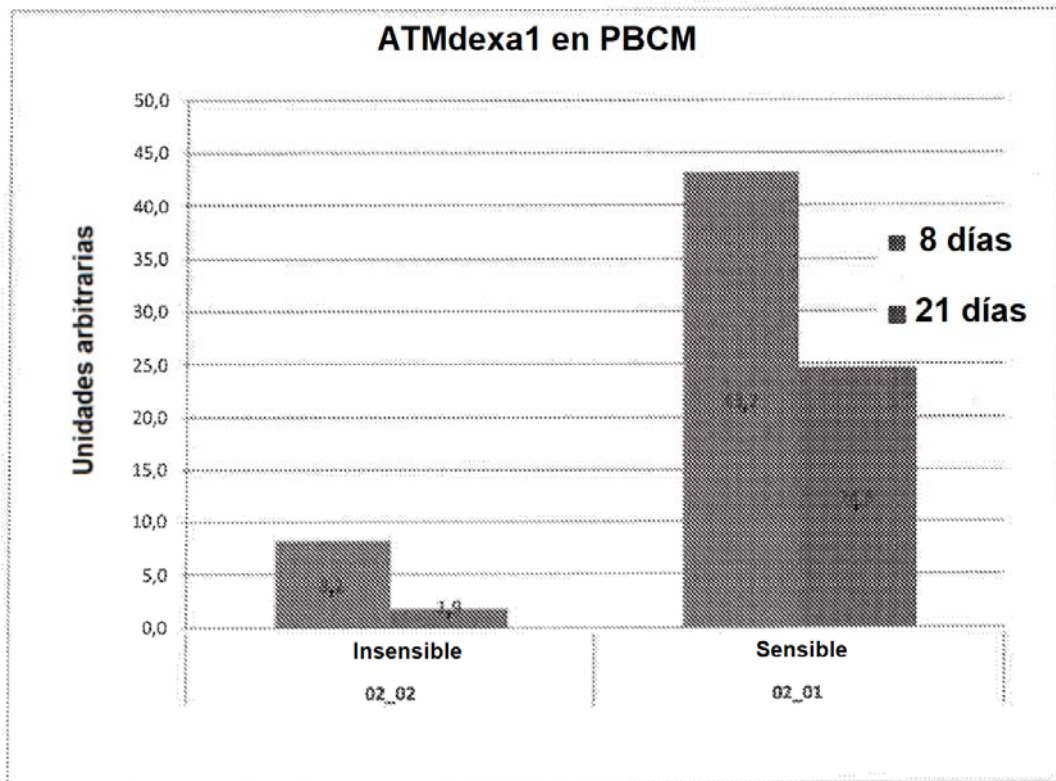


FIGURA 2

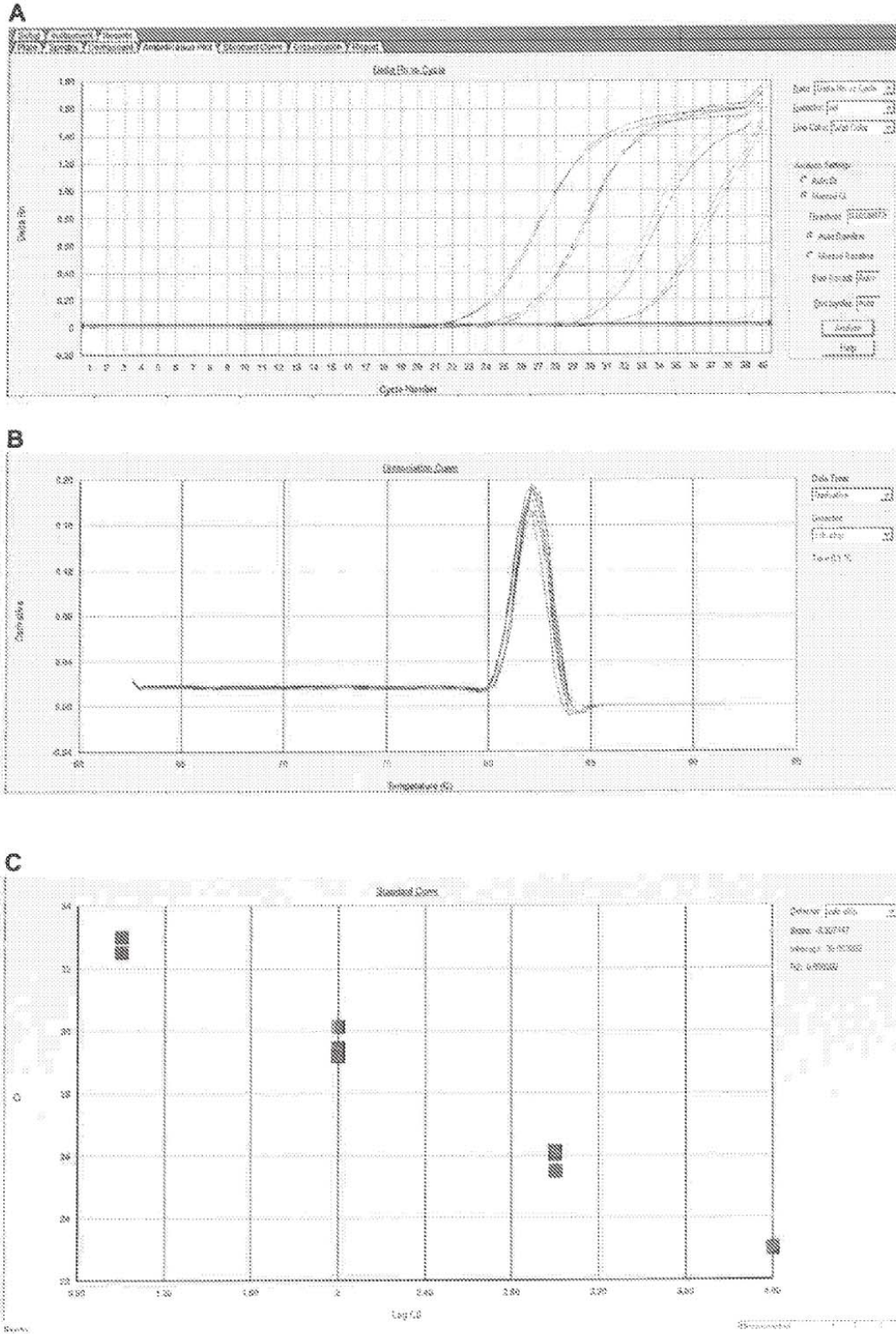
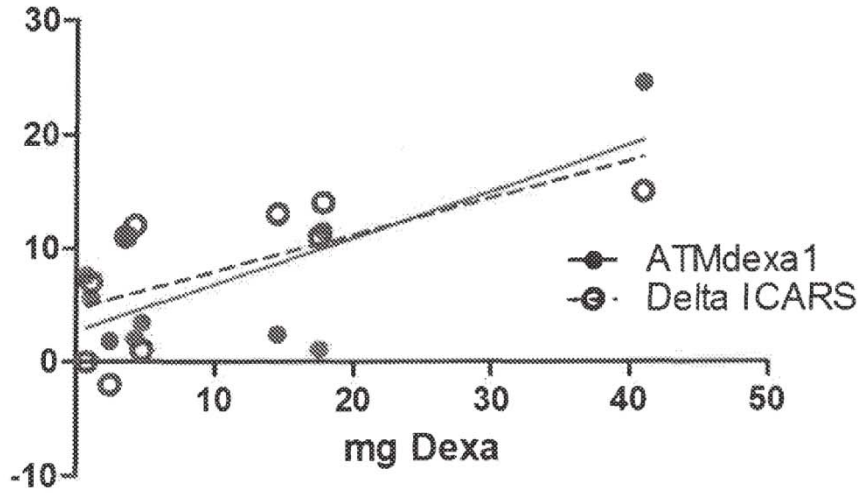


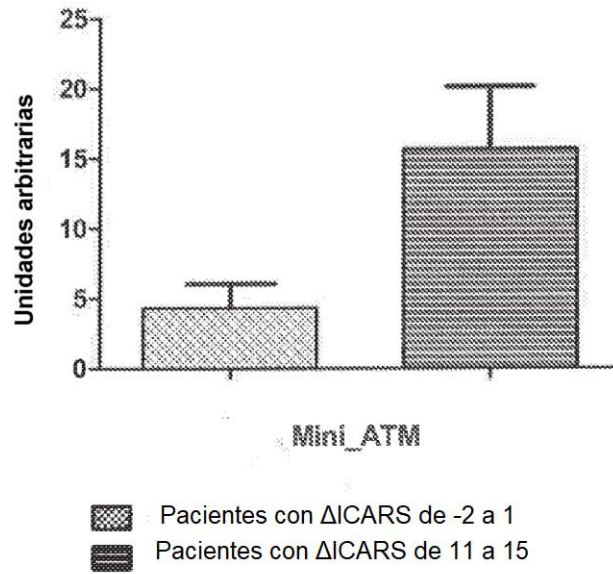
FIGURA 3

a)



	ATMdexa1	Delta ICARS
Número de pares XY	10	10
r de Pearson	0,7136	0,6466
Intervalo de confianza del 95 %	0,1523 a 0,9268	0,02848 a 0,9070
Valor P (bilateral)	0,0205	0,0433
Valor P resumido	*	*
¿Correlación significativa? (alfa = 0,05)	Sí	Sí
R ²	0,5092	0,4181

FIGURA 5a



Número de valores	3	3	3	3
Media	4,317	-0,3333	15,69	13,33
Desviación típica	3,003	1,528	7,713	2,082
Error típico	1,734	0,8819	4,453	1,202
IC del 95% inferior de la media	-3,142	-4,128	-3,470	8,162
IC del 95% superior de la media	11,78	3,461	34,85	18,50
Total	12,95	-1,000	47,07	40,00

1 mini ATM	1 ΔICARS	2 Mini ATM	2 ΔICARS
3,44	1.	10,95	11.
7,66	0.	11,53	14.
1,85	-2.	24,59	15.

Mini ATM Valor de corte = $4,3 \pm 6$

ΔICARS Valor de corte = $-0,33 \pm 3$

FIGURA 5b

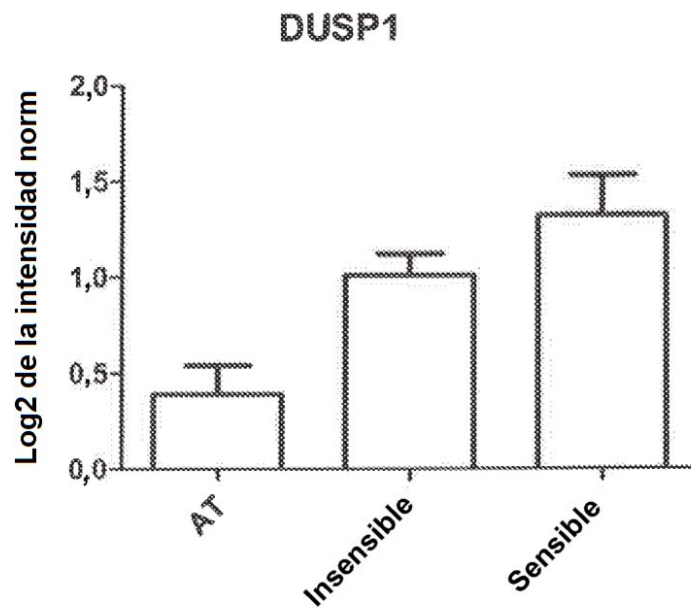
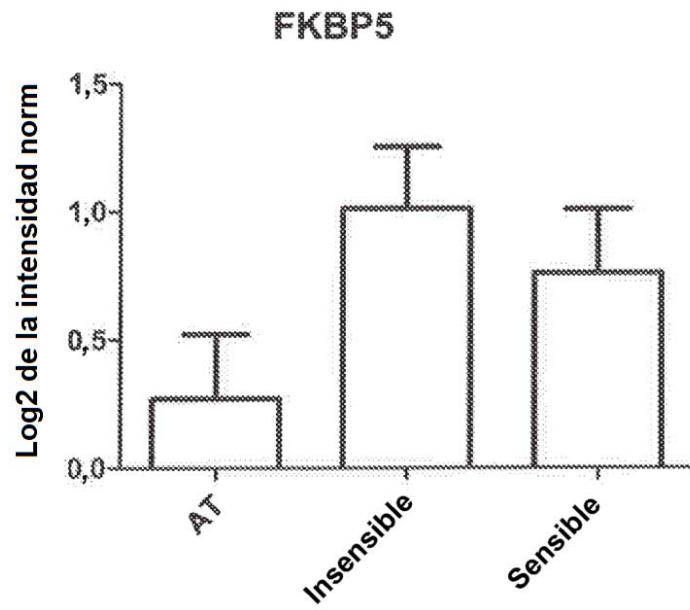


FIGURA 6