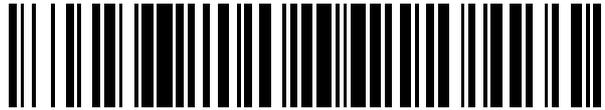


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 606**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2012 E 12753796 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 2744913**

54 Título: **Metodología de pronóstico**

30 Prioridad:

15.08.2011 GB 201113968

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

19.01.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE CARDIFF CONSULTANTS
LIMITED (100.0%)**

**Dr Philip Barnes, 30-36 Newport Road
Cardiff, South Glamorgan CF24 0DE, GB**

72 Inventor/es:

**BAIRD, DUNCAN;
PEPPER, CHRIS y
FEGAN, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 556 606 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

Metodología de pronóstico

La invención se refiere a un nuevo método de pronóstico para determinar al menos una, o una combinación, de los siguientes: tiempo hasta el primer tratamiento, respuesta al tratamiento o supervivencia en general para un paciente con una enfermedad que incluye o está caracterizada por el acortamiento de los telómeros, que comprende una evaluación de la longitud promedio más larga de los telómeros a la que los eventos de fusión de los telómeros de extremo a extremo pueden ser detectados y luego una determinación de la longitud promedio de los telómeros en el intervalo fusogénico (es decir, el intervalo por debajo de dicha longitud promedio del telómero a la que los eventos de fusión del telómero de extremo a extremo pueden ser detectados) y el uso posterior de la longitud promedio del telómero en el intervalo fusogénico como un indicador del pronóstico. La invención también se refiere al uso de dicho método en un régimen de tratamiento.

Antecedentes de la invención

La leucemia linfocítica crónica (CLL) es la leucemia en adultos más común, caracterizada por la acumulación de linfocitos B CD5⁺ monoclonales inmunoincompetentes. CLL tiene un curso clínico muy heterogéneo con una supervivencia que va desde unos pocos meses hasta muchas décadas. Las estrategias de tratamiento varían con el estado y progresión de la enfermedad e incluyen quimioterapia, radioterapia, terapia con anticuerpos monoclonales o trasplante de médula ósea, con los pacientes en fase inicial a menudo no recibiendo tratamiento. Se requiere la intervención clínica temprana para los pacientes con una forma agresiva de la enfermedad, mientras que los pacientes con formas más benignas simplemente necesitan un control de la progresión de la enfermedad y en ese punto se puede administrar un tratamiento adecuado. En este último aspecto, se ha demostrado que la intervención en la etapa temprana de la CLL no mejora las tasas de supervivencia. Por tanto, es inapropiado exponer a alguien que se presenta con una enfermedad que es poco probable que sea peligrosa para su vida a hasta 30 años de fármacos quimioterápicos altamente peligrosos. Un método fiable para distinguir las diversas formas de la enfermedad es por lo tanto deseable. Aunque los sistemas de clasificación de Binet y Rai son indicadores fiables de los resultados clínicos entre los grupos de estratificación, no logran identificar buenos y malos subconjuntos de pronóstico dentro de cada etapa. Como la mayoría de los pacientes se presentan con estados tempranos de la enfermedad en el diagnóstico, se han desarrollado una serie de pruebas de laboratorio para tratar de predecir el curso clínico de estos pacientes, más notablemente, el estado de la mutación somática de cadena pesada variable de la inmunoglobulina, la expresión de CD38, las anomalías citogenéticas y la expresión de tirosina quinasa de las células T (ZAP-70). Los genes no mutados *IGHV*, la alta expresión de CD38, la alta expresión de ZAP-70 y la presencia de supresiones 17p y 11q están todos asociados con un mal pronóstico. La explotación de este tipo de datos de laboratorio para proporcionar un ensayo pronóstico se describe en el documento de patente de los Estados Unidos US 2008/0026383. Sin embargo, ninguno de estos marcadores individuales solos puede proporcionar información pronóstica definitiva y cuando se usan en combinación ofrecen solamente una predicción de pronóstico razonable.

El cáncer de mama es otro tipo de tumor muy común en el mundo occidental. Los tumores de mama se pueden extirpar quirúrgicamente, pero los restos del tumor pueden permanecer dando lugar a la reaparición de la enfermedad. Por lo tanto, los pacientes tienen tratamientos adyuvantes que tienen efectos secundarios tóxicos, y la sospecha es que muchos pacientes reciben un tratamiento que no será beneficioso para ellos. El enfoque habitual es adaptar la agresividad de la quimioterapia al riesgo de recurrencia. En comparación con la quimioterapia estándar, la quimioterapia agresiva está asociada con un mayor beneficio, pero también con efectos tóxicos más agudos y a largo plazo, tales como la leucemia y la insuficiencia cardíaca. Al igual que con CLL, hay por lo tanto un requisito de marcadores que permitan el pronóstico después de la cirugía para el cáncer de mama. Colecciones de expresión génica se han empleado para identificar firmas específicas de expresión de genes que son indicativas del pronóstico; estas proporcionan coeficientes de riesgo de hasta 3,4 para la supervivencia general en pacientes con cáncer de mama con ganglios negativos. Las matrices de expresión génica se encuentran entre los mejores marcadores de pronóstico actualmente disponibles para el cáncer de mama.

Los síndromes mielodisplásicos (MDS) son un conjunto heterogéneo de trastornos de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea que se caracterizan por la interrupción de la hematopoyesis que en última instancia, conduce a la insuficiencia de la médula ósea. Esta condición se conocía anteriormente como "preleucemia" porque un tercio de los pacientes progresa a leucemia mieloide aguda (AML). Por tanto, existe una necesidad clínica de distinguir los pacientes que progresan a AML, y por lo tanto pueden requerir la terapia, de los que manifiestan una forma más benigna de la enfermedad. Al igual que la CLL, MDS se caracteriza por grandes reordenamientos cromosómicos desequilibrados; estos tipos de reordenamientos son consistentes con la disfunción de los telómeros. Además, hay evidencia de erosión de los telómeros en MDS y de que la mutación en los componentes de la ARN telomerasa puede conferir MDS en los niños.

Se desprende de lo anterior, que hay una gama de enfermedades para las que el pronóstico en una etapa relativamente temprana sería ventajoso. Por otra parte, muchas de estas enfermedades se caracterizan por anomalías genéticas y, en concreto por el acortamiento de los telómeros. Estas enfermedades incluyen la enfermedad de Alzheimer¹, infarto cerebral¹, enfermedad del corazón¹, infección crónica por el VIH¹, hepatitis

crónica¹, enfermedades de la piel¹, enfermedad inflamatoria crónica del intestino¹ incluyendo colitis ulcerosa, anemia¹, aterosclerosis¹, esófago de Barrett y cánceres¹ incluyendo las condiciones precancerosas. Por consiguiente, la invención tiene aplicación en todas estas enfermedades.

5 Los telómeros son estructuras de nucleoproteínas compuestas por secuencias repetitivas de ADN que tapa los extremos de los cromosomas eucariotas lineales, protegiéndolos contra el deterioro o la fusión con cromosomas adyacentes. Durante la replicación del ADN, los extremos de los cromosomas no se pueden procesar, y como resultado durante la división celular se perderían los extremos de los cromosomas; sin embargo los telómeros lo impiden por sí mismos ya que se consumen en cada etapa de la división celular, esencialmente “taponando” el cromosoma. Los extremos de los telómeros están, sin embargo, mantenidos en ciertos tipos de células tales como
10 las células germinales, células madres y ciertas células blancas de la sangre, por parte de la telomerasa transcriptasa inversa que cataliza la adición de la plantilla de ARN de repeticiones teloméricas. La longitud de los telómeros es un determinante clave de la función telomérica y se ha demostrado que los telómeros disfuncionales cortos pueden impulsar la inestabilidad genómica y la génesis de tumores en modelos de ratón. Además, la desregulación de la telomerasa se ha demostrado que conduce a la oncogénesis. Además, la pérdida de los
15 telómeros en las células somáticas se ha relacionado con la senescencia replicativa previniendo la inestabilidad genómica y el cáncer. A la inversa, también se ha demostrado que las células malignas pueden evitar esta senescencia y convertirse en inmortales por extensión de los telómeros por medio de la activación aberrante de la telomerasa.

20 En consonancia con el papel de la biología de los telómeros en la progresión tumoral, ahora hay un cuerpo de evidencia sustancial que indica que la longitud del telómero puede proporcionar información para el pronóstico en muchos tumores malignos humanos incluyendo CLL^{2,9}. Sin embargo, hay una falta de resolución en las tecnologías disponibles en la actualidad y esto ha obstaculizado el progreso en la traducción de ensayos teloméricos a la práctica clínica. Por ejemplo, se ha demostrado un papel putativo de la disfunción de los telómeros durante la progresión del cáncer de mama¹⁰, y la longitud de los telómeros de baja resolución se ha demostrado que
25 proporciona información^{11,12} de pronóstico limitada. Un problema clave con estas tecnologías es que se basan en la hibridación de sondas de ADN para unidades de repetición de los telómeros. En consecuencia, a medida que los telómeros se acortan, hay menos sonda diana, y por lo tanto los telómeros cortos no son detectables^{13,14}. Esto es importante porque los telómeros más cortos son los que se convierten en disfuncionales y están sujetos a la fusión, causando la inestabilidad genómica que puede conducir a la progresión del cáncer humano¹⁵⁻¹⁷. También se han descrito métodos basados en Q-PCR para la estimación del contenido de repetición del telómero (documento de patente internacional WO 2004068110US), esto permite un análisis de alto rendimiento. Sin embargo, la linealidad de estos métodos para la detección de telómeros cortos (< 4 kb) no ha sido establecida¹⁸, esto, junto con valores altos reportados para los CV de hasta 28%, hace que los métodos de Q-PCR sean inapropiadas para la detección de telómeros cortos y para utilizar esta información como una herramienta de pronóstico para tomar decisiones
30 clínicas¹⁹. Hasta ahora, el análisis de los telómeros mediante las técnicas de baja resolución existentes no es un marcador pronóstico suficientemente informativo.

35 Para hacer frente a este problema, hemos desarrollado previamente tecnologías de una sola molécula que nos permiten detectar la presencia de telómeros acortados de manera crítica^{20,21} y caracterizar las fusiones de extremo a extremo de los telómeros^{16,17}. El análisis de la longitud de un telómero único (STELA) permite la resolución completa de las longitudes de los telómeros en los extremos de los cromosomas específicos, incluidos los telómeros en el intervalo de las longitudes en el que las fusiones de extremo a extremo de los telómeros pueden ocurrir^{16,20}. Por lo tanto, permite la detección de los telómeros cortos que son potencialmente disfuncionales y capaces de fusión. En parte de este estudio el telómero XpYp fue elegido para su uso en STELA porque en contraste con 13q, 6q, 17p y 11q, no hay pruebas para implicar la pérdida de este telómero en la patología de la CLL en particular. Además
40 nuestros datos anteriores indican que la longitud del telómero XpYp es representativa de la longitud de los telómeros en todo el genoma^{20,22}, y que las células que expresan telomerasa pueden homogeneizar longitudes de telómeros en diferentes extremos de los cromosomas^{15,23}. Usando estas herramientas, hemos demostrado un vínculo entre los telómeros cortos, los eventos de fusión de extremo a extremo de los telómeros y la inestabilidad genómica en enfermedades tales como, pero no limitadas a, CLL, cáncer de mama y MDS.

45 En nuestras investigaciones, hemos utilizado la longitud del telómero y el análisis de fusión para proporcionar una definición de la disfunción del telómero y luego hemos utilizado esto como una herramienta de pronóstico. Específicamente, hemos identificado la longitud promedio del telómero más larga a la que pueden detectarse eventos de fusión de extremo a extremo de los telómeros para un cromosoma seleccionado, se muestran ejemplos en la Tabla 1. Usando este límite superior para la detección del evento de fusión hemos sido capaces de demostrar
50 que la longitud promedio de los telómeros en el rango fusogénico (es decir, \leq que el límite superior) proporciona un parámetro biológico que es altamente pronóstico para al menos uno de los siguientes: tiempo hasta el primer tratamiento, respuesta al tratamiento o supervivencia general. Además, este parámetro biológico también se puede utilizar para proporcionar una resolución del pronóstico notablemente en pacientes con un estadio de la enfermedad temprano en términos de tiempo hasta el primer tratamiento, respuesta al tratamiento o supervivencia general; de hecho, los pacientes en el subconjunto de los telómeros mas largos mostraron una tasa de supervivencia general del 96% a los 10 años. La longitud promedio de los telómeros más larga a la cual los eventos de fusión de extremo a extremo de los telómeros pueden ser detectados, representa por lo tanto una indicación de la longitud promedio de
60

los telómeros a la que los telómeros se convierten en disfuncionales y capaces de fusión. El conocimiento de la longitud de los telómeros de un individuo y así la probabilidad de eventos de fusión de extremo a extremo permite predecir donde el individuo se coloca con respecto a la progresión de la enfermedad y así se asegura que el individuo recibe el tratamiento acorde con sus requisitos; no menos y no más. Además, la prueba para evaluar la longitud de los telómeros de un individuo se puede repetir periódicamente para controlar la progresión de la enfermedad.

Hemos sido capaces de demostrar que mediante la aplicación de un valor umbral de longitud del telómero basado en la disfunción del telómero, sorprendentemente somos capaces de transformar el poder pronóstico del análisis de la longitud del telómero. Así, en contraste con los informes anteriores utilizando el análisis de longitud del telómero de baja resolución (es decir, los métodos descritos anteriormente para medir la longitud de los telómeros de 4 kb y por encima), nuestros datos indican que el análisis de la longitud del telómero de alta resolución (es decir, utilizando, por ejemplo, el método STELA, o cualquier otro método que puede medir el intervalo completo de la longitud del telómero de un TTAGGG de repetición a más de 25 kb de longitud del telómero), junto con una definición de la disfunción de los telómeros o un conocimiento de nuestro parámetro biológico, es suficiente para el pronóstico exacto en diversas enfermedades que se caracterizan por el acortamiento de los telómeros, incluyendo el cáncer.

Declaraciones de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método de pronóstico para determinar la progresión de una enfermedad o condición que incluye o está caracterizada por el acortamiento de los telómeros que comprende:

i) utilizar el análisis de alta resolución de longitud del telómero para determinar el promedio de la longitud del telómero más largo en el que los eventos de fusión del telómero de extremo a extremo puedan ser detectados en muestras de tejido de un número de individuos que se presentan con la misma enfermedad o condición, con el fin de identificar un valor umbral que representa una indicación de la longitud promedio del telómero a la que el telómero se vuelve disfuncional y es capaz de la fusión;

ii) determinar la longitud promedio del telómero de pronóstico de muestras de tejido de un número de individuos que se presentan con dicha enfermedad o condición, mediante la adopción de aquellas muestras cuya longitud promedio del telómero es inferior a dicho valor umbral y promediando la longitud promedio de los telómeros de esas muestras;

iii) determinar la longitud promedio del telómero de ensayo de una muestra tomada de un paciente sospechoso de tener o presentar dicha enfermedad o condición y, donde dicha longitud promedio del telómero de ensayo es menor que dicha longitud promedio del telómero de pronóstico lo que indica que el tiempo hasta el primer tratamiento es malo y/o la respuesta al tratamiento es deficiente y/o la supervivencia general es mala; o

iv) determinar la longitud promedio del telómero de ensayo de una muestra tomada de un paciente sospechoso de tener o presentarse con dicha enfermedad o condición y, donde dicha longitud promedio del telómero de ensayo es mayor que la longitud promedio del telómero de pronóstico, lo que indica que el tiempo hasta el primer tratamiento es bueno y/o la respuesta al tratamiento es buena y/o la supervivencia en general es buena.

La invención por lo tanto implica la identificación de una metodología específica que permite definir parámetros teloméricos críticos para una enfermedad en particular o, por lo general, malignidad. Estos parámetros son el valor umbral telomérico superior para eventos de fusión de extremo a extremo, como en i) anteriormente, y una longitud promedio subsecuente del telómero de pronóstico por debajo de dicho valor umbral o en el intervalo fusogénico, como en ii) anterior. Además, la invención también implica un análisis de la distribución de los telómeros del paciente, como en iii) o iv) anterior, y relacionando esto al valor umbral determinado y dicho promedio de pronóstico, la invención predice si un paciente va a requerir tratamiento y también predice la falta de progresión o la supervivencia general de cada paciente en el momento que se lleva a cabo el método.

En un método preferido de la invención, dicho evento de fusión en parte i) anterior se verifica como tal por análisis de la secuencia directa de ADN antes de que los datos relativos al mismo se incluyan en el método.

Adicionalmente o alternativamente, en un método preferido adicional de la invención, dicha longitud promedio del telómero de pronóstico de una muestra de tejido de un número de individuos que se presentan con dicha enfermedad se determina tomando aquellas muestras que exhiben fusión de los telómeros y promediando la longitud promedio del telómero de esas muestras. Por tanto, este método preferido incluye muestras cuya longitud promedio del telómero es inferior a dicho valor de umbral y también muestras cuya longitud promedio del telómero es superior a dicho valor de umbral, pero, independientemente de este hecho, sólo las muestras que exhiben fusión se utilizan para generar una longitud promedio del telómero. Como los expertos en la técnica apreciarán, el hecho de que el método se pueda trabajar usando este conjunto adicional o alternativo de las muestras indica que cualquier longitud del telómero por debajo de dicho valor de umbral es de pronóstico; el promedio de los mismos lo es particularmente.

En un método preferido de la invención dicha enfermedad o condición que incluye o se caracteriza por el acortamiento de los telómeros comprende una enfermedad donde se acortan los telómeros, como se describe en este documento, en particular donde la telomerasa tiene actividad reducida (estadísticamente significativa en el nivel

p <0,05) con respecto a la actividad media en líneas celulares immortalizadas, y lo más preferiblemente comprende una o más de las siguientes enfermedades: envejecimiento, enfermedad de Alzheimer; infarto cerebral; enfermedad del corazón; infección crónica por VIH; hepatitis crónica; enfermedades de la piel; enfermedad intestinal inflamatoria crónica; colitis ulcerosa; anemia; aterosclerosis; esófago de Barrett; y cáncer, incluyendo las condiciones precancerosas.

Preferiblemente, dicho cáncer es o bien una neoplasia hematológica o un tumor sólido.

Todavía, más preferiblemente dicho cáncer es CLL, MDS o cáncer de mama.

Sin embargo, más preferiblemente, dicha longitud del telómero a la que los eventos de fusión de extremo a extremo del telómero pueden ser detectados es, idealmente, pero no necesariamente, determinada para un cromosoma único seleccionado. Ejemplos de los cromosomas en los que ha sido llevado a cabo este análisis se muestran en la Tabla 1 junto con el valor del límite superior para la detección de la fusión de extremo a extremo para cada cromosoma. Utilizando cinco ejemplos hemos demostrado que el límite superior para la detección de eventos de fusión de extremo a extremo en diferentes cromosomas es muy similar es decir, entre 3,81 y 5,01 kb. La media es 4,52 kb con una desviación estándar de solamente 0,46 kb. Del mismo modo, también hemos demostrado que la longitud promedio del telómero en el intervalo fusogénico para estos cinco cromosomas es también muy similar es decir, entre 2,26 y 3,01 kb. El promedio es de 2,69 kb con una desviación estándar de solamente 0,30 kb.

En un método preferido alternativo de la invención, dicha longitud del telómero a la que los eventos de fusión de extremo a extremo de los telómeros pueden ser detectados se determina para un número de diferentes cromosomas. De hecho, cualquier cromosoma que puede ser sometido a análisis de longitud de los telómeros de alta resolución podría utilizarse. En este caso, el límite superior promedio para la detección de eventos de fusión de extremo a extremo en los diferentes cromosomas se utiliza en parte i) anterior; y el promedio de la longitud promedio de los telómeros en el intervalo fusogénico para estos diferentes cromosomas en parte ii) anterior también se utiliza.

En un método preferido de la invención, en el caso en que dicha enfermedad sea CLL, que el tiempo hasta el primer tratamiento es malo significa que un individuo tiene una mediana del tiempo hasta el tratamiento de menos de 2 años (por ejemplo, 1,84 años) con un coeficiente de riesgo de 23,2 lo que indica que tiene 23,2 veces más probabilidades de requerir tratamiento en la unidad de tiempo que una persona con la longitud del telómero por encima del valor umbral. Que la respuesta al tratamiento es deficiente significa que la mediana del tiempo desde el primer tratamiento hasta la muerte es de menos de 5 años (por ejemplo, 4,1 años) con un cociente de riesgo de 6,4 y que la supervivencia general es mala significa que la mediana del tiempo de supervivencia desde el diagnóstico es de menos de 8 años (por ejemplo, 7,49 años) con un coeficiente de riesgo de 71,3.

En un método preferido de la invención, en el caso en que dicha enfermedad sea CLL, que el tiempo hasta el primer tratamiento es bueno significa que un individuo no necesitará tratamiento y se puede monitorizar de forma convencional; y que la respuesta al tratamiento es buena significa que el tiempo promedio de tratamiento no se alcanzará dentro de los 10 años; y que la supervivencia general es buena significa que la mediana de supervivencia es mayor de 10 años con el 96% de la cohorte sobreviviendo a este punto censor y que se puede controlar de forma convencional.

En un método preferido de la invención, en el caso en que dicha enfermedad sea MDS, que la supervivencia general es mala significa que la mediana del tiempo de supervivencia desde el diagnóstico es de menos de 1,5 años (por ejemplo, 1,15 años) con un coeficiente de riesgo de 9,5.

En un método preferido de la invención, en el caso en que dicha enfermedad sea MDS, que la supervivencia general es buena significa que la mediana de la supervivencia es de 4,9 años y puede ser monitorizada de forma convencional.

En un método preferido de la invención, en el caso en que dicha enfermedad sea un cáncer de mama, que la supervivencia global es mala significa una mediana del tiempo de supervivencia de menos de 1 año (por ejemplo, 0,95 años) con un cociente de riesgo de 87080.

En un método preferido de la invención, en el caso en que dicha enfermedad sea un cáncer de mama, que la supervivencia global es buena significa que la mediana de supervivencia es mayor de 6 años y puede ser monitorizado de forma convencional.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método de pronóstico para determinar la progresión de una enfermedad o condición que incluye o se caracteriza por el acortamiento de los telómeros que comprende:

i) utilizar el análisis de alta resolución de longitud del telómero para determinar la longitud promedio de los telómeros de pronóstico de muestras de tejido de un número de individuos que se presentan con dicha enfermedad o condición, cuya longitud promedio del telómero, el valor de la cual ha sido determinada según la invención es menor que un valor umbral de longitud del telómero de 4,52 kb, a la cual los eventos de fusión de extremo a extremo del telómero se pueden detectar en la enfermedad cancerosa, mediante la adopción de aquellas muestras cuya longitud

promedio de los telómeros es inferior a dicho valor umbral y promediando las longitudes promedio de los telómeros de esas muestras;

5 ii) determinar la longitud promedio del telómero de ensayo de una muestra tomada a un paciente sospechoso de tener o presentar dicha enfermedad o condición y, cuando dicha longitud promedio del telómero de ensayo es menor que dicha longitud promedio del telómero de pronóstico esto significa que el tiempo hasta el primer tratamiento es malo y/o la respuesta al tratamiento es deficiente y/o la supervivencia general es mala; o

10 iii) determinar longitud promedio del telómero de ensayo de una muestra tomada a un paciente sospechoso de tener o presentar dicha enfermedad o condición y, cuando dicha longitud promedio del telómero de ensayo es mayor que dicha longitud promedio del telómero de pronóstico esto significa que el tiempo hasta el primer tratamiento es bueno y/o la respuesta al tratamiento es buena y/o la supervivencia general es buena.

En este segundo modo de realización de la invención, preferiblemente, dicha longitud promedio de los telómeros de pronóstico se determina utilizando un valor umbral de 4,06 kb (es decir, 4,52 - 0,46 kb) o un valor umbral de 4,98 kb (es decir, 4,52 + 0,46 kb) al que los eventos de fusión de extremo a extremo del telómero pueden ser detectados.

15 En una forma de realización preferida del segundo aspecto de la invención, dicha enfermedad es cáncer y, por lo general, dicho cáncer es CLL, cáncer de mama o MDS e, idealmente, dicho valor de la longitud promedio del telómero de pronóstico de 2,26 kb se utiliza para CLL y para el cáncer de mama y dicho valor de la longitud promedio del telómero de pronóstico de 2,5 kb se utiliza para MDS.

20 Aún más preferiblemente, en este segundo aspecto de la invención, dicha longitud de los telómeros a la que los eventos de fusión de extremo a extremo de los telómeros pueden ser detectados se determina para un número de cromosomas. Idealmente, los cromosomas son XpYp, 17p, 2p, 16p y 18q, aunque cualquier otra combinación de los cromosomas puede ser usada y su valor umbral superior promedio al que los eventos de fusión de extremo a extremo de los telómeros se pueden detectar se utiliza en el método anterior.

Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona un método de pronóstico para determinar la progresión de una enfermedad o condición que incluye o se caracteriza por el acortamiento de los telómeros que comprende:

25 1. determinar la longitud promedio del telómero de ensayo de una muestra tomada de un paciente sospechoso de tener o presentarse con dicha enfermedad o condición y, cuando dicha longitud promedio del telómero de ensayo, el valor de la cual ha sido determinado según la invención, es menor que la longitud promedio del telómero de pronóstico de 2,69 kb, esto significa que el tiempo hasta el primer tratamiento es malo y/o la respuesta al tratamiento es deficiente y/o la supervivencia general es mala; o

30 2. determinar la longitud promedio del telómero de ensayo de una muestra tomada de un paciente sospechoso de tener o presentarse con dicha enfermedad o condición y, cuando dicha longitud promedio del telómero de ensayo, determinada según la invención, es mayor que la longitud del telómero de pronóstico de 2,69 kb, esto significa que el tiempo hasta el primer tratamiento es bueno y/o la respuesta al tratamiento es buena y/o la supervivencia general es buena.

35 En esta tercera forma de realización de la invención, preferiblemente, dicha longitud promedio del telómero de pronóstico es o bien 2,39 kb (es decir, 2,69 - 0,3 kb) o 2,99 kb (es decir, 2,69 + 0,3 kb).

En una forma de realización preferida del tercer aspecto de la invención, dicha enfermedad es un cáncer hematológico, y típicamente dicho cáncer es CLL o MDS y, más idealmente aún, dicha longitud promedio de los telómeros de pronóstico es de 2,26 kb para el primero y 2,5 kb para el segundo.

40 En una forma de realización preferida del tercer aspecto de la invención, dicha enfermedad es un cáncer de mama y, más aún idealmente, dicha longitud promedio del telómero de pronóstico es de 2,26 kb.

45 Aún más preferiblemente, en este tercer aspecto de la invención, dicha longitud promedio del telómero de pronóstico se determina para un número de cromosomas. Idealmente, los cromosomas son XpYp, 17p, 2p, 16p y 18q, aunque cualquier otra combinación de los cromosomas puede ser usada y su longitud promedio de las longitudes promedio de los telómeros de pronóstico es usada en el método anterior.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona uno o más, incluyendo combinaciones de los mismos, de los primers descritos en este documento.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un régimen de tratamiento que incluye o comprende dicho método de pronóstico anterior según un cualquier aspecto o forma de realización de la invención.

50 En las reivindicaciones que siguen y en la descripción precedente de la invención, excepto cuando el contexto lo requiera de otra forma para expresar el lenguaje o la implicación necesaria, la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se utiliza en un sentido inclusivo, es decir para especificar la presencia de las características establecidas, pero no excluye la presencia o adición de otras características en diversas realizaciones de la invención.

No se hace ninguna admisión de que cualquier referencia citada en esta solicitud constituya técnica anterior. Además no se hace ninguna admisión de que cualquiera de la técnica anterior constituya parte del conocimiento general común de la técnica.

5 Las características preferidas de cada aspecto de la invención pueden ser como se describen en relación con cualquiera de los otros aspectos.

10 Otras características de la presente invención se harán evidentes a partir de los siguientes ejemplos. En términos generales, la invención se extiende a cualquier invención nueva, o cualquier combinación nueva, de las características descritas en esta solicitud (incluyendo las reivindicaciones adjuntas y dibujos). Por lo tanto, rasgos, características, números, compuestos o restos químicos descritos en conjunción con un aspecto particular, realización o ejemplo de la invención han de entenderse que son aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en el presente documento, a menos que sean incompatibles con el mismo.

Por otra parte, a menos que se indique lo contrario, cualquier característica descrita en este documento puede ser sustituida por una característica alternativa que sirve al mismo o a un propósito similar.

15 La invención se describirá ahora por medio de los ejemplos solamente con referencia a las siguientes tablas y figuras:

La tabla-1 muestra la longitud promedio de telómero más larga a la que los eventos de fusión de extremo a extremo de los telómeros pueden ser detectados para una serie de cromosomas, incluyendo el promedio de los mismos y la longitud promedio de los telómeros de pronóstico para cada uno de dichos cromosomas, incluyendo el promedio de los mismos.

20 La tabla-2 muestra una comparación de los factores pronósticos en el análisis univariante, en términos de tiempo hasta el primer tratamiento y supervivencia en general.

La tabla-3 muestra las características clínicas de la cohorte de los 184 pacientes de CLL.

La tabla-4 muestra el análisis de los conjuntos de datos concordantes combinando el análisis de la longitud del telómero con marcadores de pronósticos conocidos.

25 La Figura 1 define los parámetros teloméricos para el pronóstico en la CLL. [A] Un ejemplo de STELA en el telómero XpYp en 12 pacientes con CLL en los que se detectó o no se detectó fusión. El promedio y la desviación estándar se muestran a continuación y los promedios se resaltan en rojo en la imagen de gel. [B] Ejemplos de análisis de fusión en 4 pacientes con CLL. [C] Ejemplos de la secuencia de ADN de los eventos de fusión resaltados en el panel B. Las flechas indican la intersección de la fusión, junto con el telómero participante y la eliminación desde el inicio de los respectivos telómeros. Se subraya la homología entre los telómeros participantes. [D] Promedio de los datos de longitud del telómero XpYp representados como una función de las etapas de Binet. Los cuadrados negros indican los que no fueron probados para la fusión, cuadrados azules los que fueron negativos y los cuadrados rojos los que fueron positivos para los eventos de fusión. El panel E muestra los datos de longitud del telómero de toda la cohorte, junto con los que fueron positivos para eventos de fusión. El promedio más largo del telómero XpYp (3,81 kb) en el que se detectó la fusión se indica con una línea de puntos y la longitud promedio del telómero XpYp de las muestras en las que se detectó la fusión fue de 2,26 kb.

40 Figura 2. La longitud promedio del telómero es pronóstica en la CLL. Los paneles A y B muestran las curvas de Kaplan Meier de toda la cohorte para el tiempo hasta el primer tratamiento, gráfico superior, y la supervivencia general, gráfico inferior. Los valores de P y el coeficiente de riesgo (HR) se indican en los gráficos junto con los números en cada brazo.

45 La Figura 3 muestra que la longitud del telómero, tal como se define por la fusión, es altamente pronóstica en CLL. Curvas de Kaplan Meier [A-B, E] de toda la cohorte, para el tiempo hasta el primer tratamiento y la supervivencia en general. Los valores P y el coeficiente de riesgo (HR) se indican en las representaciones junto con los números en cada brazo. Curvas de Kaplan Meier [CD] para la única cohorte de la etapa A de Binet. El particionamiento recursivo del conjunto de datos [F-G] muestra que 2,26 kb es el valor del umbral óptimo del telómero como una herramienta de pronóstico para la definición de la supervivencia en el conjunto entero de datos, y en las 2 cohortes de población.

50 Figura 4. El panel A muestra los datos de longitud promedio del telómero 17p representados gráficamente como una función de la estratificación de Binet. Los marcadores negros indican los que no fueron probados para la fusión, azules los que fueron negativos y los rojos los que fueron positivos para eventos de fusión. El panel B muestra los datos de longitud de los telómeros de toda la cohorte, junto con los que fueron positivos para eventos de fusión. El promedio del telómero más largo XpYp (4,81 kb) en el que se detectó la fusión se indica con una línea discontinua y denota el límite superior del intervalo fusogénico para el telómero 17p. La longitud promedio de telómero de las muestras en las que las fusiones se pudieron detectar fue de 2,57 kb. Los paneles C y D muestran las curvas de Kaplan Meier del tiempo hasta el primer tratamiento y la supervivencia en general, respectivamente, basados en un corte de 2,5 kb derivado del particionamiento recursivo de los datos. Los paneles E y F muestran las curvas de Kaplan Meier para el tiempo hasta el primer tratamiento y la supervivencia en general, respectivamente, para los

pacientes de la etapa A solamente basados en un punto de corte de 2,5 kb derivados del particionamiento recursivo de los datos. El panel G muestra un gráfico del promedio de la longitud del telómero 17p frente a coeficientes de riesgo para la supervivencia en general. El particionamiento recursivo ilustra que 2,5 kb es el valor umbral óptimo para definir el pronóstico usando este telómero.

- 5 La figura 5 muestra que la longitud de los telómeros es superior a otros parámetros de pronóstico conocidos. Curvas de Kaplan Meier con la longitud de los telómeros junto con la citogenética [AB], estado de *IGHV* [CD], estado de CD38 [EF] y estado de ZAP-70 [GH] como una función tanto del tiempo hasta el primer tratamiento como de la supervivencia en general.

- 10 La figura 6 muestra que el valor umbral de los telómeros de 2,26 kb, derivado del cromosoma XpYp, es altamente pronóstico para la respuesta al tratamiento de los pacientes con CLL. Curvas de Kaplan Meier para un subconjunto de pacientes con CLL que recibieron tratamiento (n = 75). El tiempo de supervivencia se calculó a partir del tiempo hasta el primer tratamiento. Los valores de P y el coeficiente de riesgo (HR) se indican en los gráficos, junto con los números en cada brazo.

- 15 La figura 7 muestra que la longitud de los telómeros, tal como se definió por la fusión, también es pronóstica en el cáncer de mama. Curvas de Kaplan Meier [AD] de toda la cohorte, para la supervivencia general. Los valores de P y el coeficiente de riesgo (HR) se indican en los gráficos, junto con los números en cada brazo. El particionamiento recursivo [E] del conjunto de datos muestra que 2,26 kb es el valor umbral óptimo del telómero como una herramienta de pronóstico para la definición de la supervivencia en el conjunto de datos.

- 20 Figura 8. La figura de MDS muestra que el valor umbral de los telómeros de 2,26 kb ofrece poder pronóstico limitado en MDS. Curvas de Kaplan Meier [AD] de toda la cohorte, para la supervivencia general. Los valores de P y el coeficiente de riesgo (HR) se indican en los gráficos, junto con los números en cada brazo. D muestra el valor umbral del telómero de 2,5 kb que ofrece mejor poder de pronóstico en MDS. [E] El particionamiento recursivo del conjunto de datos muestra que 2,5 kb es el valor umbral óptimo de los telómeros como una herramienta de pronóstico para la definición de la supervivencia en el conjunto completo de datos.

25 **Métodos**

Pacientes con CLL

- 30 Se tomaron muestras de sangre periférica de 184 pacientes con CLL que consintieron, de conformidad con la Declaración de Helsinki y como se aprobó por el Comité de Ética de Investigación Local del Sureste de Gales (LREC # 02/4806). CLL se definió por criterios clínicos, así como por la morfología celular, y también la co-expresión de CD19 y CD5 en los linfocitos que simultáneamente mostraban restricción de la reordenación de la cadena ligera. Información clínica completa estuvo disponible para todos los pacientes con una mediana de seguimiento de 5,8 años. Todas las muestras se recogieron en, o cerca de, el momento del diagnóstico en dos centros, Cardiff y Birmingham, y la estratificación se basó en el sistema de clasificación de Binet²⁴. Las características clínicas de la cohorte de pacientes con CLL se presentan en la Tabla 2.

35 Pacientes con cáncer de mama

Se obtuvo el ADN genómico, junto con los datos de seguimiento clínico, a partir de un panel de 28 carcinomas ductales de mama invasivos del banco de cáncer de Gales, en virtud de la aprobación del MREC del País de Gales

Pacientes con MDS

- 40 Se obtuvieron muestras de médula ósea de 63 pacientes con diagnóstico de síndrome mielodisplásico (MDS), según la clasificación de acuerdo con el sistema franco-americano-británico. De ellos, 40 pacientes eran hombres y 23 eran mujeres, con una edad media al diagnóstico de 67,5 años; la mediana de seguimiento de la cohorte fue de 5,6 años. Criterios IPSS estuvieron disponibles para 55/63 pacientes con 15 de criterio alto, 20 medio y 20 bajo.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con CLL

- 45 Se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de sangre venosa EDTA de los 184 pacientes con CLL por centrifugación de densidad utilizando centrifugación Ficoll-Hypaque (Invitrogen). Posteriormente, las células B se aislaron positivamente usando Dynabeads marcadas con CD19 (Invitrogen)²⁵. Las células se almacenaron a -20° C como gránulos secos antes de la extracción del ADN.

Extracción de ADN y PCR

- 50 Se extrajo el ADN a partir de células humanas utilizando protocolos estándar de proteinasa K, ARNasa A, y fenol/cloroformo²⁶. Para el análisis de la longitud de los telómeros en los telómeros XpYp, 17p, 2p, 16p y 18q, se utilizó una modificación del ensayo de análisis de la longitud de un telómero único (ESTELA) como se ha descrito anteriormente^{16,20}. Brevemente, el ADN genómico se solubilizó mediante dilución con 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), se cuantificó mediante el uso de la fluorometría de Hoechst 33258 (BioRad, Hercules, Estados Unidos), y se diluyó a 10 ng/μl en 10 mM Tris-HCl (pH 7,5). El ADN (10 ng) se diluyó adicionalmente a 250 pg/μl en un volumen de 40 μl, que

5 contenía enlazador Telorette2 (1 μ M) y Tris-HCl (1 mM; pH 7,5). Se llevaron a cabo múltiples reacciones de PCR (típicamente 6 reacciones por muestra) para cada prueba de ADN, en volúmenes de 10 μ l. La mezcla de reacción consistió en ADN (250 pg), telómero adyacente y primers Teltail (0,5 μ M), Tris-HCl (75 mM; pH 8,8), (NH₄)₂SO₄ (25 mM), 0,01% de Tween-20, MgCl₂ (1,5 mM), y 0,5 U de Taq (ABGene, Epsom, Reino Unido) y polimerasa Pwo (Roche Molecular Biochemicals, Lewes, Reino Unido) en una proporción de 10:1. Las reacciones se ciclaron con un termociclador MJ PTC-225 (MJ Research, Watertown, Estados Unidos). Los fragmentos de ADN se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa TAE 0,5%, y se detectaron por dos hibridaciones Southern separadas, con la sonda de repetición TTAGGG cebada al azar marcada con α -³²P (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) y una sonda adyacente al telómero, junto con una sonda para detectar los marcadores de peso molecular de 1 kb (Stratagene, La Jolla, Estados Unidos) y 2,5 kb (BioRad). Los fragmentos hibridados se detectaron por imagen de fósforo con un Molecular Dynamics Storm 860 Phosphorimager (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido). Los pesos moleculares de los fragmentos de ADN se calcularon usando el cuantificador Phoretix 1D (Nonlinear Dynamics, Newcastle-upon-Tyne, Reino Unido).

15 La fusión de los telómeros se detectó mediante los ensayos de fusión de una sola molécula de telómero^{16,17} que se han descrito anteriormente. Se realizaron reacciones de PCR que contenían 100 ng de ADN, cada una conteniendo los primers de PCR XpYpM, 17p6 y 21q1. Se detectaron las moléculas de fusión, y las frecuencias se cuantificaron por transferencia de Southern y la hibridación con las sondas adyacentes al telómero XpYp como se ha descrito anteriormente¹⁵. Con el fin de determinar los cromosomas que participaban en los eventos de fusión para la posterior caracterización de la secuencia, se llevaron a cabo hibridaciones adicionales con las sondas adyacentes al telómero 20 17p y 21q; la sonda 21q produce productos no específicos adicionales y por lo tanto no se utilizó para la cuantificación. Cualquier producto de fusión fue luego re-amplificado para el análisis directo de secuencia usando primers de PCR anidados (XpYpO, 17p7 y 21qseq1).

25 Los oligonucleótidos utilizados fueron: XpYpM (5'-ACCAGTTTTCCAGTGTGTT-3'), 17p6 (5'-GGCTGAACTATAGCCTCTGC-3'), 21q1 (5'-CTTGGTGTCGAGAGAGGTAG-3') para la PCR de fusión; XpYpO (5'-CCTGTAACGCTGTTAGGTAC-3'), 17p7 (5'-CCTGGCATGGTATTGACATG-3'), 21qseq1 (5'-TGGTCTTATACTGTGTTC-3') para re-amplificación de productos de fusión; 21qseq1 (5'-TGGTCTTATACTGTGTTC-3'), 21qseq1rev (5'-AGCTAGCTATCTACTCTAACAGAGC-3'), XpYpO (5'-CCTGTAACGCTGTTAGGTAC-3'), XpYpB2 (5'-TCTGAAAGTGGACC(A/T)ATCAG-3'), 17p7 (5'-CCTGGCATGGTATTGACATG-3'), 17pseq3 (5'-AGAATCCTGTCCTCAACAAGT-3') para generar sondas de 30 hibridación para el análisis de fusión.

Primers que se pueden utilizar para el análisis STELA (los que normalmente se utilizan están en negrita):

XpYpE2 **TTGTCTCAGGGTCCTAGTG**

XpYp-427A/415T **GGTTATCAACCAGGTGCTCT**

XpYp-427G/415C **GGTTATCGACCAGGTGCTCC**

XpYpins TGTGTCTGGAATTGGTGGGTT

XpYpdel CCTAGTGTGTCTGGAATTGGTTC

XpYpM ACCAGGTTTTCCAGTGTGTT

XpYpC CAGGGACCGGGACAAATAGAC

XpYpO CCTGTAACGCTGTTAGGTAC

17pseq1rev **GAATCCACGGATTGCTTTGTGTAC**

17p6 GGCTGAACTATAGCCTCTGC

17p7 CCTGGCATGGTATTGACATG

16prev1 **GTGAATAATCAAGGTCAGAGCA**

18qrev4 **CCTGTGGGTCTAAAACCAGAAGG**

2p2 **GAGCTGCGTTTTGCTGAGCAC**

11q13B **CAGACCTTGGAGGCACGGCCTTCG**

12q-197A **GGGAGATCCACACCGTAGCA**

12q-550C **ACAGCCTTTTGGGGTACCGC**

Métodos estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando Prism 3.0 (Graphpad) y el software SAS versión 9.1.3 (SAS Institute).

La relación entre la longitud de los telómeros, los factores de pronóstico conocidos, el tiempo hasta el primer tratamiento (TTFT) y la supervivencia en general (OS) se exploró a través de las pruebas de la suma de rango de Wilcoxon para las variables categóricas de la etapa de Binet, CD38, ZAP-70, estado de la mutación del gen *IGHV*, β 2-microglobulina y citogenética FISH. Se realizaron comparaciones univariantes no estratificadas de supervivencia entre los subconjuntos de pronóstico con el test log-rank, con los datos de supervivencia mostrados utilizando curvas de Kaplan-Meier. El análisis multivariante, que ajusta por otros factores de pronóstico, se realizó utilizando la selección hacia adelante para definir covariables significativas con regresión de Cox. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Resultados

Longitud de los telómeros y análisis de fusión

Analizamos la distribución de la longitud de los telómeros en 184 pacientes con CLL utilizando el análisis de la longitud de un telómero único (ESTELA) en el telómero XpYp (Fig. 1A). Dado que hemos demostrado anteriormente que los eventos de fusión de extremo a extremo de los telómeros pueden ser detectados en pacientes con CLL con telómeros cortos¹⁵, sistemáticamente buscamos fusiones de telómeros en las muestras de CLL con el promedio menor de longitud del telómero ($n = 88$). Sólo se consideró un evento de fusión como de *bona fide* cuando pudo ser totalmente caracterizado por el análisis de secuencias de ADN directo (Figs. 1B, 1C). Las fusiones de telómeros fueron detectables en muestras derivadas de todas las etapas de Binet, lo que sugiere que no son meramente una característica de la enfermedad avanzada (Fig. 1D; las fusiones están marcadas en rojo). Sin embargo, las fusiones sólo se detectaron en las muestras con una longitud promedio de los telómeros de $\leq 3,81$ kb. Por lo tanto, utilizamos esta longitud de los telómeros como un valor umbral para definir el límite superior del intervalo "fusogénico" para nuestra cohorte usando este cromosoma. La Fig. 1E muestra que 98/184 (53,3%) de las muestras de CLL tenían una longitud promedio de los telómeros XpYp igual o menor que 3,81 kb con una longitud promedio de los telómeros fusogénicos de 2,26 kb. Por lo tanto, se utilizó 2,26 kb como una manera de definir dos subconjuntos de muestras de pacientes con CLL en nuestra cohorte y se determinó el valor de pronóstico de este valor umbral de longitud promedio de los telómeros en nuestra cohorte. Un total de 33/184 (17,9%) de las muestras tuvo una longitud promedio de los telómeros $\leq 2,26$ kb.

La disfunción de los telómeros es muy pronosticadora en la CLL

Según estudios anteriores, la longitud promedio de los telómeros fue de pronóstico en nuestra cohorte de pacientes para TTFT ($P < 0,001$; HR = 5,5) y OS ($p = 0,0017$; HR 4,2) (Fig. 2). Sin embargo, la clasificación de las muestras basada en la disfunción de los telómeros (longitud de telómero $\leq 2,26$ kb del telómero XpYp) reveló una discriminación del pronóstico notablemente mejorada. Las Figs. 3A y 3B muestran que una longitud promedio de los telómeros $\leq 2,26$ kb fue altamente de pronóstico para TTFT y OS. La mediana de TTFT fue de 1,8 años ($p < 0,0001$; HR = 23,2) y la mediana de OS fue de 7,5 años ($p < 0,0001$; HR = 71,3). Por el contrario, no se llegó a la mediana de TTFT y OS en el subconjunto de los telómeros más largos. Especialmente llamativo fue el impacto de la longitud de los telómeros en OS en nuestra cohorte; la curva de Kaplan Meier para los pacientes con longitud de los telómeros $> 2,26$ kb no mostró casi ninguna erosión durante el período de seguimiento de 10 años; 98% de supervivencia a los 5 años y 96% de supervivencia a los 10 años. Mientras que, sólo el 36% del grupo de los telómeros cortos estaba vivo en el momento censor de 10 años lo que indica que los pacientes con $\leq 2,26$ kb tuvieron más de 70 veces más probabilidades de morir en la unidad de tiempo. Estos datos se resumen en la Tabla-2.

Los pacientes de etapa A con telómeros cortos tienen una enfermedad más agresiva

Teniendo en cuenta que la mayoría de los pacientes con CLL se presentan con enfermedad en estadio temprano y que este grupo representa el mayor desafío en términos de pronóstico, realizamos un análisis de subgrupo de sólo los pacientes de etapa A de Binet. De nuestra cohorte 130/184 (70,6%) fue de etapa A de Binet en los que en el diagnóstico 15 (11,5%) tenían $\leq 2,26$ kb de longitud de telómero para el telómero XpYp. Las Figs. 3C y 3D muestran el impacto pronóstico de los telómeros cortos en la enfermedad en estadio temprano. La mediana de TTFT fue de 2,1 años ($p < 0,0001$; HR = 33,0) y la mediana de OS fue de 9,0 años ($p < 0,0001$; HR = 994,2). Una vez más, no se llegó a la mediana de TTFT y OS en el grupo de los telómeros más largos. El notable coeficiente de riesgo para OS sugiere que estos pacientes tienen casi 1000 veces más probabilidades de sucumbir a su enfermedad en la unidad de tiempo que los pacientes con telómeros más largos. Una vez más, la curva superior de Kaplan Meier reveló que los pacientes con telómeros más largos tenían una tasa de supervivencia del 96% a los 10 años.

La expansión de la base de datos a 144 pacientes de etapa A, proporcionó verificación adicional de que la longitud de telómero específica de 2,26 kb proporciona el poder máximo de pronóstico para este ensayo en la CLL y el HR con la supervivencia en general aumentada a 1353 (Fig. 3E).

El particionamiento recursivo identifica el valor umbral de 2,26 kb como el de mejor pronóstico de supervivencia

Aunque habíamos determinado experimentalmente la longitud de los telómeros para la disfunción de los telómeros en la CLL y demostrado que esta era altamente pronóstica, hemos querido establecer si esto representaba el corte óptimo de longitud de telómero para predecir la supervivencia en nuestra cohorte. Mediante la realización del particionamiento recursivo en nuestro conjunto de datos, se encontró que 2,26 kb representaba la longitud óptima de telómero, y era el valor umbral más pronóstico para toda la cohorte y la cohorte de etapa A (Fig. 3E). Teniendo en cuenta que nuestra cohorte era de muestras procedentes de dos centros diferentes (Cardiff y Birmingham), se repitió el análisis en estas dos poblaciones separadas y se derivó esencialmente el mismo resultado (Fig. 3F). Este enfoque proporciona evidencia circunstancial adicional de que 2,26 kb representa el límite biológico de la estabilidad de los telómeros y confirma la importancia clínica de esta longitud promedio de telómero fusogénico en la CLL.

Consideramos que esta longitud promedio de telómero fusogénico puede ser conservada en otros extremos de cromosomas y por lo tanto analizamos la longitud del telómero en 17p (Fig. 4A) en 149/184 (81%) de la cohorte de pacientes. La longitud promedio del telómero 17p de las muestras en las que pudimos detectar fusiones fue similar a la observada en XpYp (2,57 kb, \pm 0,79; p = 0,21; Fig. 4B). El particionamiento recursivo reveló que la longitud óptima de los telómeros para determinar el pronóstico era 2,5 kb; esto fue altamente pronóstico en toda la cohorte (OS p < 0,0001, HR = 72) y pacientes de la etapa A (OS p = 0,009, HR = 71, Figs. 4C-G).

La longitud del telómero es superior a otros parámetros de pronóstico

A continuación investigamos el impacto de los telómeros disfuncionales en otros marcadores de pronóstico conocidos en la CLL, incluyendo la citogenética, estado de mutación *IGHV*, expresión de CD38, expresión de ZAP-70 y Beta-2 microglobulina (β 2M). El análisis combinado de longitud de los telómeros con citogenética FISH, estado de mutación *IGHV*, expresión de CD38, y expresión de ZAP-70 se muestra en la Fig. 5. Como se muestra, la longitud corta de los telómeros define subconjuntos de pacientes con mal pronóstico en grupos de riesgo citogenético, grupos con *IGHV* no mutada y mutada, grupos CD38⁺ y grupos CD38⁻, grupos ZAP-70⁺ y ZAP-70⁻ y grupos de β 2M alta y baja, en términos de TTFT y OS. La combinación de estos marcadores con la longitud del telómero mejoró el poder pronóstico aún más; por ejemplo, el análisis de los conjuntos de datos concordantes reveló que la alta expresión de CD38 en conjunción con la longitud del telómero \leq 2,26 kb produjo un HR de 2915 (P < 0,0001, Tabla-4).

La longitud de los telómeros es la co-variable dominante en el análisis multivariante

En el análisis multivariante la selección hacia adelante identificó la disfunción de los telómeros (\leq 2,26 kb) como el parámetro más importante para TTFT (HR = 4,2; CI 1,9-8,8; p = 0,0002) y OS (HR = 10,9; CI 3,8-31,2, P < 0,0001). Sólo el estatus de mutación *IGHV* y la etapa de Binet conservaron importancia pronóstica independiente como co-variables en el modelo para TTFT y sólo CD38 en términos de OS. Es de particular interés que el estatus de mutación *IGHV* y citogenética 'de alto riesgo' no fueran independientemente pronósticas en términos de OS. A nuestro entender, esta es la primera vez que estos parámetros no se han podido probar como significativos para OS en esta enfermedad.

La longitud de los telómeros define la respuesta al tratamiento en CLL

Dado que hemos mostrado que la longitud de los telómeros ofrece información poderosa pronóstica en CLL, consideramos, además, que la longitud de los telómeros también puede ofrecer información acerca de la capacidad de los pacientes para responder al tratamiento. Por ello, realizamos un análisis de subgrupo (n = 75) de nuestra cohorte de pacientes con CLL para aquellos que habían recibido tratamiento. La longitud de los telómeros fue altamente pronóstica de la respuesta al tratamiento con HR de 6,4 (P = 0,0002) (Fig. 6).

Los parámetros teloméricos definidos en CLL son de pronóstico en otras indicaciones.

Examinamos una cohorte de 28 pacientes con carcinoma ductal invasivo de la mama. Analizamos la longitud del telómero XpYp usando STELA y categorizamos a los pacientes en función del corte de longitud de 2,26 kb de los telómeros definido en CLL. A pesar de un período de seguimiento limitado de 4,6 años, la longitud promedio telomérica fusogénica de 2,26 kb proporcionó niveles notables de pronóstico en cuanto a la supervivencia general en esta enfermedad con una relación de riesgo de 112 (p = 0,0056), y una mediana de supervivencia en el grupo de mal pronóstico de 301 días (Fig. 7A-C). Ampliación de la base de datos a 120 pacientes con cáncer de mama, proporcionó verificación adicional de que la longitud específica de 2,26 kb de los telómeros proporcionó el poder pronóstico máximo para este ensayo en el cáncer de mama y el HR para la supervivencia en general aumentó a 87080 (Fig. 7D).

Como con CLL, particionamiento recursivo de los datos de la cohorte de cáncer de mama mostró que la longitud óptima de los telómeros definida por HR fue de 2,26 kb (Fig. 7E).

También examinamos la longitud de los telómeros en MDS usando STELA y utilizamos la longitud promedio de los telómeros fusogénicos definida en CLL para proporcionar información pronóstica en MDS. Analizamos un panel de 63 pacientes con MDS para los que teníamos los datos de supervivencia. La longitud promedio de los telómeros fusogénicos de 2,26 kb como se definió en CLL, proporcionó algún poder pronóstico en MDS con un HR de 4,7 (p = 0,09) para la supervivencia en general (Figs. 8 A-C). A diferencia de las muestras de CLL y de cáncer de mama, las

muestras de MDS no se purificaron y contenían proporciones variables no identificadas de células no afectadas. Se consideró que la presencia de células normales no afectadas sesgaría el valor umbral de la longitud óptima del telómero para el pronóstico en esta cohorte. Esto fue evidente a partir de la partición recursiva, donde la longitud óptima de los telómeros fue de 2,5 kb (HR = 9,5; P = 0,026) una diferencia de tan sólo 240 bp (Fig. 8E). La ampliación de la base de datos a 78 pacientes con MDS proporcionó verificación adicional de que la longitud específica de los telómeros de 2,5 kb proporcionó el poder pronóstico máximo de este ensayo en MDS y HR para la supervivencia en general que aumentó a 10,45 (Fig. 7D). La purificación de las células MDS utilizando CD34 puede mejorar la exactitud de pronóstico basado en los telómeros en MDS.

RESUMEN

10 Las principales conclusiones de este estudio se pueden resumir de la siguiente manera:

El análisis de longitud de los telómeros, como se define por la disfunción de los telómeros, proporciona una herramienta muy pronóstica en enfermedades humanas, tales como la CLL y otros tumores malignos humanos, permitiendo una discriminación considerable para el resultado clínico después del tratamiento. El poder pronóstico debería permitir a los médicos clínicos predecir con confianza el curso clínico de estas enfermedades heterogéneas.

15 Por otra parte, la disfunción de los telómeros proporciona una resolución pronóstica notable en la etapa temprana de la enfermedad.

Sólo los telómeros en la parte inferior del perfil de distribución de longitud tienen propensión a la fusión de extremo a extremo; utilizando el cromosoma XpYp una longitud de los telómeros de $\leq 2,26$ kb es una longitud promedio de telómeros fusogénicos para la disfunción de los telómeros en un tumor humano primario, por debajo de la cual los pacientes con tumores malignos humanos muestran mal resultado de pronóstico. El uso de un número de cromosomas de una longitud de los telómeros $\leq 2,69$ kb es un predictor de disfunción de los telómeros.

Los pacientes con telómeros XpYp más largos que 2,26 kb tienen una enfermedad notablemente estable e indolente (98% de estos pacientes estaban vivos a los 5 años y 96% en el punto censor de 10 años).

25 El análisis consistente de los telómeros en MDS y cáncer de mama muestra que el análisis de alta resolución de la longitud de los telómeros es probable que sea muy pronóstico en otros tumores malignos hematológicos pero importantemente también en los tumores sólidos.

Mediante la aplicación de un valor umbral de longitud de los telómeros en base a la disfunción de los telómeros, esto transforma el poder pronóstico del análisis de los telómeros en el parámetro más pronóstico jamás descrito tanto en el análisis univariante como en el multivariante.

30 Bibliografía

1. Jiang H, Ju Z, Rudolph K L. Telomere shortening and ageing. *Z. Gerontol Geriat* 2007; 40:314-324.
2. Gertler R, Rosenberg R, Stricker D, et al. Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22:1807-14.
3. Meeker A K, Argani P. Telomere shortening occurs early during breast tumorigenesis: a cause of chromosome destabilization underlying malignant transformation? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9:285-96.
4. Damle R N, Batliwalla F M, Ghiotto F, et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* 2004; 103:375-82.
5. Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K, et al. Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood* 2005; 105:4807-12.
- 40 6. Rossi D, Lobetti Bodoni C, Genuardi E, et al. Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richter's syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009; 23:1062-72.
7. Sellmann L, de Beer D, Bartels M, et al. Telomeres and prognosis in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Int J Hematol* 2011; 93:74-82.
- 45 8. Roos G, Krober A, Grabowski P, et al. Short telomeres are associated with genetic complexity, high risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111:2246-52.
9. Ricca I, Rocci A, Drandi D, et al. Telomere length identifies two different prognostic subgroups among VH-unmutated B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia* 2007; 21:697-705.
10. Chin K, de Solorzano C O, Knowles D, et al. In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet.* 2004; 36:984-8.

11. Heaphy C M, Baumgartner K B, Bisoffi M, Baumgartner R N, Griffith J K. Telomere DNA content predicts breast cancer-free survival interval. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:7037-43.
12. Lu L, Zhang C, Zhu G, et al. Telomerase Expression and Telomere Length in Breast Cancer and their Associations with Adjuvant Treatment and Disease Outcome. *Breast Cancer Res.* 2011; 13:R56.
- 5 13. Aubert G, Hills M, Lansdorp P M. Telomere length measurement-Caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res.* 2011 8 de Junio [publicado electrónicamente previo a su publicación en papel].
14. Baird D M. New developments in telomere length analysis. *Exp Gerontol.* 2005; 40:363-8.
- 10 15. Lin T T, Letsolo B T, Jones R E, et al. Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukaemia: evidence for a telomere crisis. *Blood* 2010; 116:1899-907.
16. Capper R, Britt-Compton B, Tankimanova M, et al. The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. *Genes Dev.* 2007; 21:2495-508.
17. Letsolo B T, Rowson J, Baird D M. Fusion of short telomeres in human cells is characterised by extensive deletion and microhomology and can result in complex rearrangements. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38:1841-52.
- 15 18. Cawthon, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30; e47.
19. Shen, J., Terry, M. B., Gurvich, I., Liao, Y., Senie, R. T. y Santella, R. M. Short telomere length and breast cancer risk: a study in sister sets. *Cancer Res.* 2007; 67: 5538-5544. Revisado en Aviv, A. The epidemiology of human telomeres: faults and promises. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2008; 63: 979-983.
- 20 20. Baird D M, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet.* 2003; 33:203-7.
21. Britt-Compton B, Rowson J, Locke M, Mackenzie I, Kipling D, Baird D M. Structural stability and chromosome-specific telomere length is governed by cis-acting determinants in humans. *Hum Mol Genet.* 2006; 15:725-33.
22. Baird D M, Britt-Compton B, Rowson J, Amso N N, Gregory L, Kipling D. Telomere instability in the male germline. *Hum Mol Genet.* 2006; 15:45-51.
- 25 23. Britt-Compton B, Capper R, Rowson J, Baird D M. Short telomeres are preferentially elongated by telomerase in human cells. *FEBS Lett* 2009; 583:3076-80.
24. Binet J L, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198-206.
- 30 25. Hewamana S, Alghazal S, Lin T T, et al. The NF-kappaB subunit Rel A is associated with in vitro survival and clinical disease progression in chronic lymphocytic leukemia and represents a promising therapeutic target. *Blood* 2008; 111:4681-9.
26. Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2ª Edición ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.

35 Tabla 1. Límite superior y longitud promedio de los telómeros en los que los eventos de fusión de extremo a extremo se pueden detectar para cinco extremos de cromosomas diferentes.

Extremo de cromosoma	Límite superior (kb)	Promedio de intervalo fusogénico (kb)
XpYp	3,81	2,26
17p	4,81	2,57
2p	5,01	3,01
16p	4,49	2,94
18q	4,47	2,66
Promedio ± DE	4,52 ± 0,46	2,69 ± 0,30

Tabla 2. Comparación de los factores pronósticos en el análisis univariante en términos del tiempo hasta el primer tratamiento y supervivencia en general

Parámetro	Tiempo hasta el primer tratamiento			Supervivencia en general		
	Mediana (años)	HR (95% IC)	Valor de p	Mediana (años)	HR (95% IC)	Valor de p
TL (promedio de la fusión)		23,2 (11,0-48,7)	<0,0001		71,3 (20,0-253,7)	<0,0001
≤2,26 kb	1,8			7,5		
>2,26 kb	No alcanzó			No alcanzó		
Estatus de <i>IGHV</i>		4,6 (2,4-8,8)	<0,0001		2,9 (1,0-8,1)	0,04
≥98%	2,9			No alcanzó		
<98%	No alcanzó			No alcanzó		
CD38		3,0 (1,7-5,3)	0,0003		3,2 (1,1-9,1)	0,03
≥20%	3,0			No alcanzó		
<20%	No alcanzó			No alcanzó		
ZAP-70		1,7 (1,0-2,9)	0,07		2,3 (0,9-6,2)	0,08
≥20%	6,0			No alcanzó		
<20%	No alcanzó			No alcanzó		
β2-M		3,1 (1,6-6,2)	0,001		3,1 (0,99-9,5)	0,05
≥4 g/dl	3,0			12,7		
<4 g/dl	No alcanzó			No alcanzó		
Genética		7,7 (3,1-18,9)	<0,0001		10,1 (2,7-36,9)	0,0004
11q ⁺ / 17p ⁺	2,0			6,9		
N / O	No alcanzó			No alcanzó		

5 TL (promedio de la fusión): la longitud promedio de los telómeros de las muestras en las que se detectaron eventos de fusión

Estatus de *IGHV*: <98% de homología de secuencia con la secuencia de la línea germinal más cercana (mutada); ≥ 98% de homología de secuencia con la secuencia de la línea germinal más cercana (no mutada)

β2-M: beta 2 microglobulina

11q⁺ y 17p⁺: cualquier anomalía FISH o anomalía cariotípica de 11q o 17p

10 N: ninguna aberración citogenética detectable por FISH

O: Otra anomalía citogenética (excluyendo 11q⁺ o 17p⁺)

HR = coeficiente de riesgo

95% CI = intervalo de confianza del 95%

ES 2 556 606 T3

Tabla 3. Características clínicas de la cohorte de 184 pacientes con CLL

Factor	Subconjunto	Número
Mediana de la edad		64 años
Intervalo		27 – 95 años
Mediana del seguimiento		5,8 años
Requirieron tratamiento	Tratados	75
	No tratados	104
CD38	<20%	105
	≥20%	53
	No determinado	26
Genética	11q ⁺ / 17p ⁺	21
	N / O	125
	No determinado	38
Estatus de <i>IGHV</i>	<98%	93
	≥98%	45
	No determinado	46
ZAP-70	<20%	95
	≥20%	59
	No determinado	30
β2-microglobulina	<4 mg/dl	81
	≥4 mg/dl	37
	No determinado	56

Tabla 4. Análisis de conjuntos de datos concordantes combinando la longitud de los telómeros con los marcadores de pronóstico conocidos.

Parámetro	n	TTFT		OS	
		HR (IC 95%)	Valor de p	HR (IC 95%)	Valor de p
TL + <i>IGHV</i>		141,2 (40,5-492,1)	<0,0001	72,4 (14,4-365,5)	<0,0001
TL≤2,26 kb + UM <i>IGHV</i>	16				
TL>2,26 kb + M <i>IGHV</i>	79				
TL + CD38		134,7 (35,5-512,1)	<0,0001	2915 (261,1-32550)	<0,0001
TL≤2,26 kb + CD38 ⁺	14				
TL>2,26 kb + CD38 ⁻	88				
TL + ZAP-70		29,3 (9,9-86,0)	<0,0001	681,2 (99,9-4645)	<0,0001
TL≤2,26 kb + ZAP-70 ⁺	16				

ES 2 556 606 T3

TL>2,26 kb + ZAP-70 ⁻	80				
TL + citogenética		52,2 (14,8-186,3)	<0,0001	308,5 (44,1-2147)	<0,0001
TL≤2,26 kb + 11q-/17p-	13				
TL>2,26 kb + otros	105				

* El análisis se muestra para casos concordantes únicamente por ejemplo, TL ≤ 2,26 kb / *IGHV* no mutado vs TL > 2,26 kb / *IGHV* mutado. Los conjuntos de datos discordantes no se incluyeron en este análisis.

TL = longitud de los telómeros

5 UM = casos de *IGHV* no mutado: ≥ 98% de homología de secuencia con la secuencia de la línea germinal más cercana

M = casos de *IGHV* mutados: <98% de homología de secuencia con la secuencia de la línea germinal más cercana

Listado de secuencias

<110> University University College Cardiff Consultants Limited Baird, Duncan Pepper, Christopher Fegan, Christopher Fegan, Christopher

5 <120> Longitud del telómero y enfermedad

<130> 0043P/WO

10 <150> GB1113968.0
<151> 15-08-2011

<160> 23

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

accaggtttt ccagtgtgtt 20

25 <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

30 <400> 2

ggctgaacta tagcctctgc 20

35 <210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

40 <400> 3

cttgggtcgc agagaggtag 20

45 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 4

50 cctgtaacgc tgtaggtac 20

<210> 5
<211> 20
<212> ADN

55 <213> Homo sapiens

<400> 5

60 cctggcatgg tattgacatg 20

<210> 6
<211> 20
<212> ADN

65 <213> Homo sapiens

ES 2 556 606 T3

<400> 6
 tggctctata cactgtgttc 20
 5 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 7
 agctagctat ctactctaac agagc 25
 <210> 8
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 20 tctgaaagtg gaccaatcag 20
 <210> 9
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 30 tctgaaagtg gacctatcag 20
 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 40 agaatcctgt cctcaacaag t 21
 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 11
 ttgtctcagg gtcctagtg 19
 50 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 12
 ggttatcaac caggtgctct 20
 <210> 13
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 65 ggttatcgac caggtgctcc 20

ES 2 556 606 T3

<210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 14

 10 tgtgtctgga attggtgggt t 21
 <210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 15

 cctagtgtgt ctggaattgg ttc 23

 20 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 25 <400> 16

 cagggaccgg gacaaataga c 21

 30 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 35 <400> 17

 40 gaatccacgg attgcttgt gtac 24
 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 45 <400> 18

 50 gtgaataatc aaggtcagag ca 22
 <210> 19
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 19

 55 cctgtgggtc taaaaccaga agg 23
 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 60 <400> 20

 gagctgcgtt ttgctgagca c 21

 65 <210> 21
 <211> 24

ES 2 556 606 T3

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 21

5 cagaccttgg aggcacggcc ttcg 24

<210> 22

<211> 20

10 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 22

15 gggagatcca caccgtagca 20

<210> 23

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

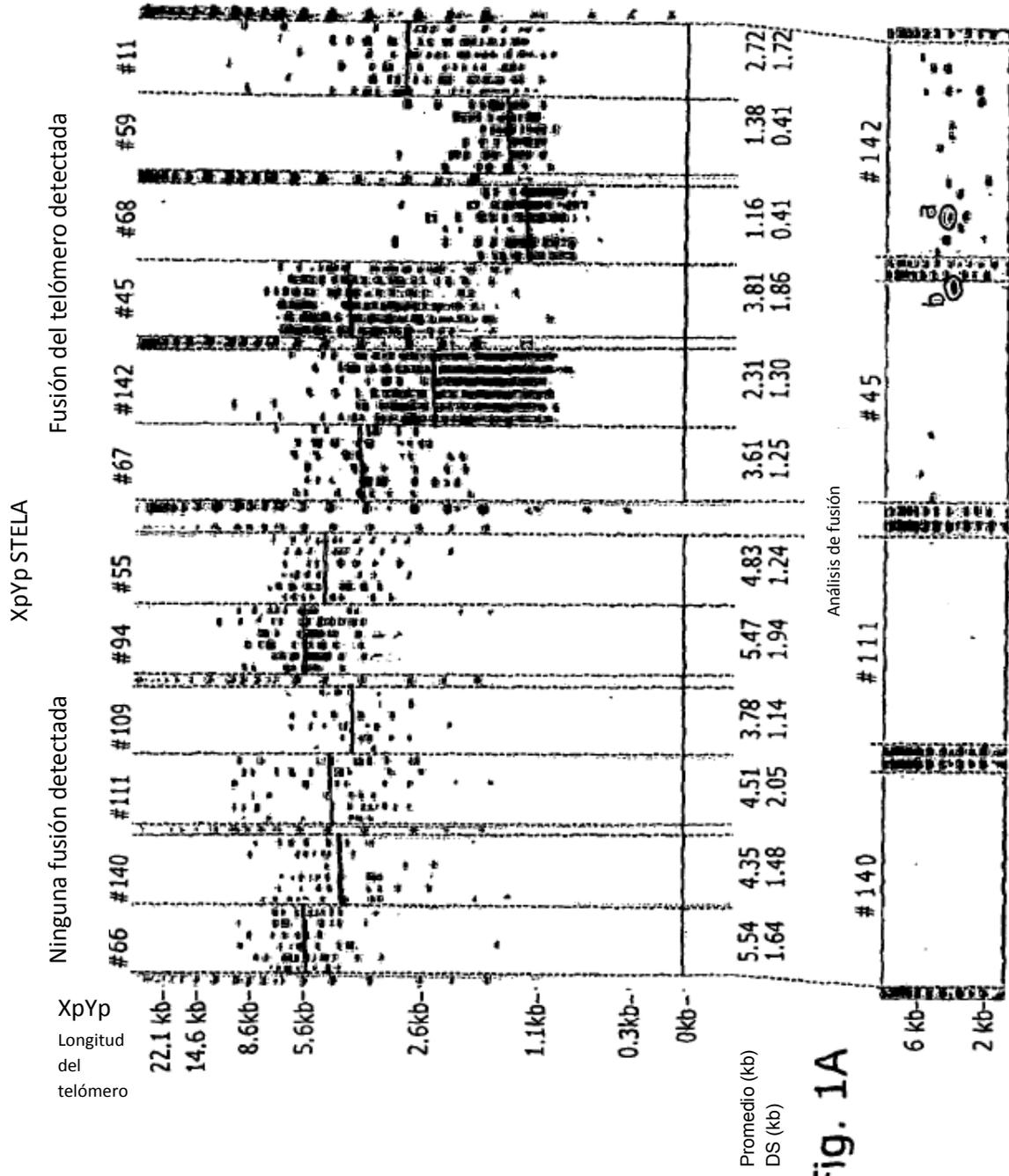
<400> 23

25 acagcctttt ggggtaccgc 20

REIVINDICACIONES

1. Un método de pronóstico para determinar la progresión de una enfermedad o condición que incluye o se caracteriza por el acortamiento de telómeros que comprende:
 - 5 i) utilizar el análisis de alta resolución de longitud de telómeros para determinar la longitud promedio más larga de los telómeros en la que los eventos de fusión de extremo a extremo de los telómeros se puedan detectar en muestras de tejido de un número de individuos que se presentan con la misma enfermedad o condición, con el fin de identificar un valor umbral que represente una indicación de la longitud promedio de los telómeros a la que los telómeros se vuelven disfuncionales y capaces de fusión;
 - 10 ii) determinar la longitud promedio de pronóstico de muestras de tejido de un número de individuos que se presentan con la misma enfermedad o condición, mediante la adopción de aquellas muestras cuya longitud promedio de los telómeros es inferior a dicho valor umbral y promediando la longitud promedio de los telómeros de esas muestras;
 - 15 iii) determinar la longitud promedio del telómero de ensayo de una muestra tomada de un paciente sospechoso de tener o presentar dicha enfermedad o condición y, cuando dicha longitud promedio del telómero de ensayo es menor que dicha longitud promedio del telómero de pronóstico esto indica que el tiempo hasta el primer tratamiento es malo y/o la respuesta al tratamiento es deficiente y/o la supervivencia general es mala; o
 - iv) determinar la longitud promedio del telómero de ensayo de una muestra tomada de un paciente sospechoso de tener o presentar dicha enfermedad o condición y, cuando dicha longitud promedio del telómero de ensayo es mayor que dicha longitud promedio del telómero de pronóstico esto indica que el tiempo hasta el primer tratamiento es bueno y/o la respuesta al tratamiento es buena y/o la supervivencia general es buena.
- 20 2. El método según la reivindicación 1, en donde dicho evento de fusión de la parte i) anterior se verifica como que es tal mediante el análisis directo de secuencia de ADN.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde, adicionalmente o alternativamente, dicha longitud promedio del telómero de pronóstico de muestras de tejido de un número de individuos que se presentan con dicha enfermedad se determina tomando aquellas muestras que exhiben la fusión de los telómeros y promediando la
 - 25 longitud promedio de los telómeros de esas muestras.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha enfermedad o condición es una de las siguientes enfermedades: el envejecimiento, enfermedad de Alzheimer; infarto cerebral; enfermedad del corazón; infección crónica por VIH; hepatitis crónica; enfermedades de la piel; enfermedad intestinal inflamatoria crónica; colitis ulcerosa; anemia; aterosclerosis; cáncer de esófago de Barrett, incluidas las condiciones pre-
 - 30 cancerosas.
5. El método según la reivindicación 4, en donde dicho cáncer es o un tumor maligno hematológico o un tumor sólido.
6. El método según la reivindicación 5, en donde dicho cáncer es CLL, MDS o cáncer de mama.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha longitud del telómero a la
 - 35 que los eventos de fusión de extremo a extremo de los telómeros se pueden detectar se determina para un solo cromosoma.
8. El método según las reivindicaciones 1-6, en donde dicha longitud del telómero a la que los eventos de fusión de extremo a extremo de los telómeros pueden ser detectados se determina para un número de diferentes cromosomas.
- 40 9. El método según la reivindicación 8, en donde el límite superior promedio para detectar eventos de fusión de extremo a extremo en diferentes cromosomas se utiliza en la parte i) de la reivindicación 1 y la longitud promedio del telómero en el intervalo fusogénico para estos diferentes cromosomas se utiliza en la parte ii) de la reivindicación 1.
10. Un método de pronóstico para determinar la progresión de una enfermedad o condición que incluye o se caracteriza por el acortamiento de los telómeros que comprende:
 - 45 i) utilizar el análisis de alta resolución de longitud de telómero para determinar la longitud promedio del telómero de pronóstico de muestras de tejido de un número de individuos que se presentan con dicha enfermedad o condición cuya longitud promedio de los telómeros, el valor de la cual se ha determinado según la reivindicación 1, es menor que un valor umbral de longitud de los telómeros de 4,52 kb al que los eventos de fusión de extremo a extremo de
 - 50 los telómeros se pueden detectar en una enfermedad cancerosa, mediante la adopción de aquellas muestras cuya longitud promedio de los telómeros es inferior a dicho valor umbral y promediando la longitud promedio de los telómeros de esas muestras;

- ii) determinar la longitud promedio de los telómeros de ensayo de una muestra tomada de un paciente sospechoso de tener o presentar dicha enfermedad o condición y, cuando dicha longitud promedio de los telómeros de ensayo es menor que dicha longitud promedio de los telómeros de pronóstico esto significa que el tiempo hasta el primer tratamiento es malo y/o la respuesta al tratamiento es deficiente y/o la supervivencia en general es mala; o
- 5 iii) determinar la longitud promedio de los telómeros de ensayo de una muestra tomada de un paciente sospechoso de tener o presentar dicha enfermedad o condición y, cuando dicha longitud promedio de los telómeros de ensayo es mayor que dicha longitud promedio de los telómeros de pronóstico esto significa que el tiempo hasta el primer tratamiento es bueno y/o la respuesta al tratamiento es buena y/o la supervivencia en general es buena.
- 10 11. El método según la reivindicación 10, en donde dicha enfermedad es un cáncer tal como CLL, cáncer de mama o MDS.
12. El método según la reivindicación 11, en donde dicha longitud promedio de los telómeros de pronóstico es de 2,26 kb.
- 15 13. El método según la reivindicación 10 o 11, en donde dicha longitud de los telómeros a la que se puede detectar dichos evento de fusión de extremo a extremo de los telómeros se determina para un número de diferentes cromosomas.
14. El método según la reivindicación 13, en donde los cromosomas son XpYp, 17p, 2p, 16p y 18q.
- 20 15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 – 14, en donde en la parte i), adicionalmente o alternativamente, dicha longitud promedio de los telómeros de pronóstico de muestras de tejido de un número de individuos que presentan dicha enfermedad o condición se determina mediante la selección de muestras que exhiben fusión de los telómeros y promediando la longitud promedio de los telómeros de esas muestras.
- 25 16. Un método de pronóstico para determinar la progresión de una enfermedad o condición que incluye o se caracteriza por el acortamiento de los telómeros que comprende:
- i) determinar la longitud promedio de los telómeros de ensayo de una muestra tomada de un paciente sospechoso de tener o presentar dicha enfermedad o condición y, cuando dicha longitud promedio de los telómeros de ensayo es menor que una longitud promedio de los telómeros de pronóstico de 2,69 kb, el valor de la cual se ha determinado según la reivindicación 1, esto significa que el tiempo hasta el primer tratamiento es malo y/o la respuesta al tratamiento es deficiente y/o la supervivencia general es mala; o
- 30 ii) determinar la longitud promedio de los telómeros de ensayo de una muestra tomada de un paciente sospechoso de tener o presentar dicha enfermedad o condición y, cuando dicha longitud promedio de los telómeros de ensayo es mayor que una longitud promedio de los telómeros de pronóstico de 2,69 kb, el valor de la cual se ha determinado según la reivindicación 1, esto significa que el tiempo hasta el primer tratamiento es bueno y/o la respuesta al tratamiento es buena y/o la supervivencia en general es buena.
- 35 17. El método según la reivindicación 16, en donde dicha enfermedad es un cáncer hematológico tal como CLL o MDS.
18. El método según la reivindicación 17, en donde dicha longitud promedio de los telómeros de pronóstico es de 2,26 kb.
19. El método según las reivindicaciones 15 - 18, en donde dicha longitud promedio de los telómeros de pronóstico se determina para un número de diferentes cromosomas.
20. El método según la reivindicación 19, en donde los cromosomas son XpYp, 17p, 2p, 16p y 18q.
- 40 21. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 16 - 20, en donde en la parte i), adicionalmente o alternativamente, dicha longitud promedio de los telómeros de pronóstico de muestras de tejido de un número de individuos que presentan dicha enfermedad se determina tomando aquellas muestras que exhiben fusión de los telómeros y promediando la longitud promedio de los telómeros de esas muestras.



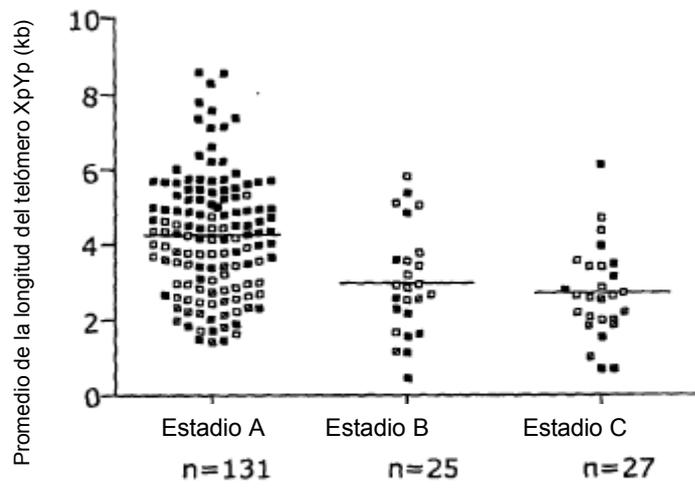


Fig. 1D

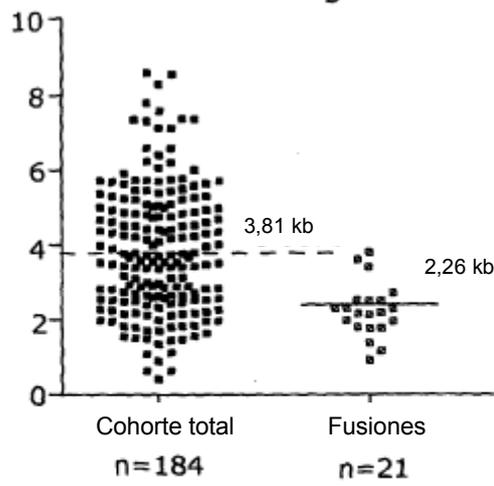


Fig. 1E

- Ninguna fusión de telómero
- ▣ Fusión del telómero
- No analizado por fusión

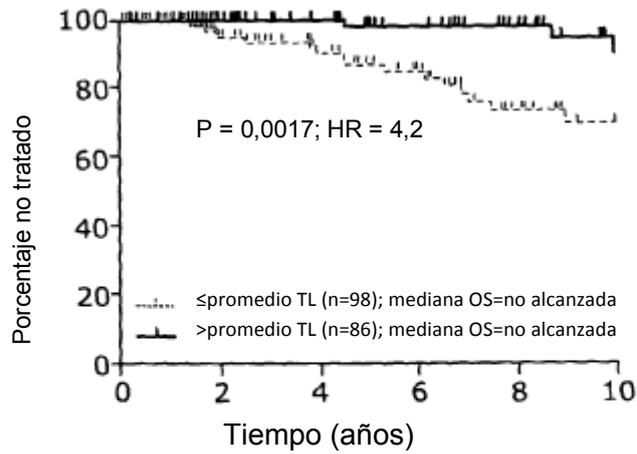
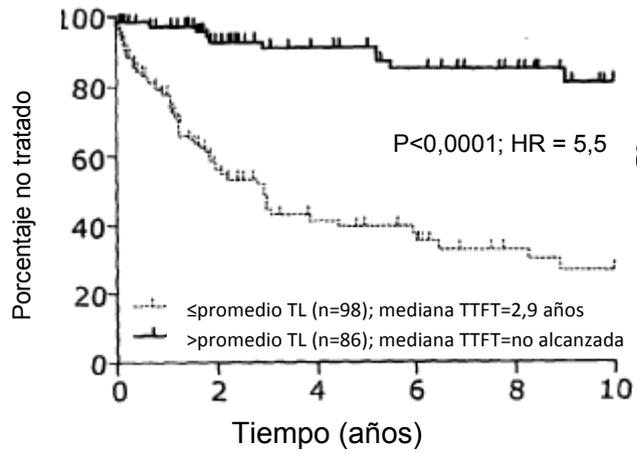


Fig. 2

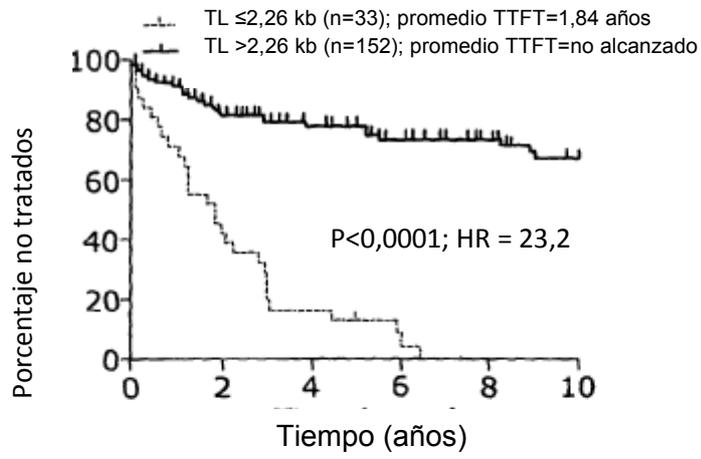


Fig. 3A

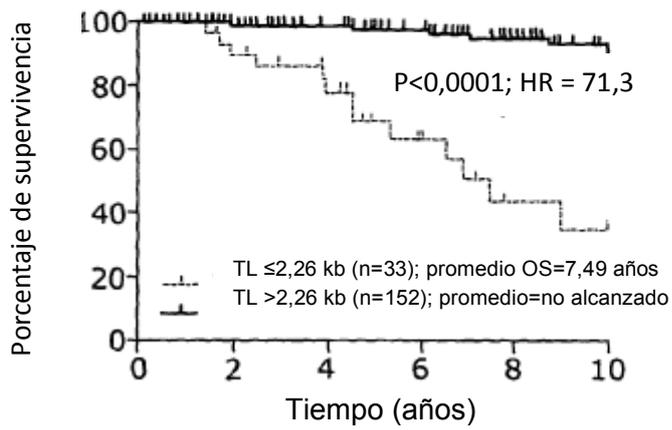


Fig. 3B

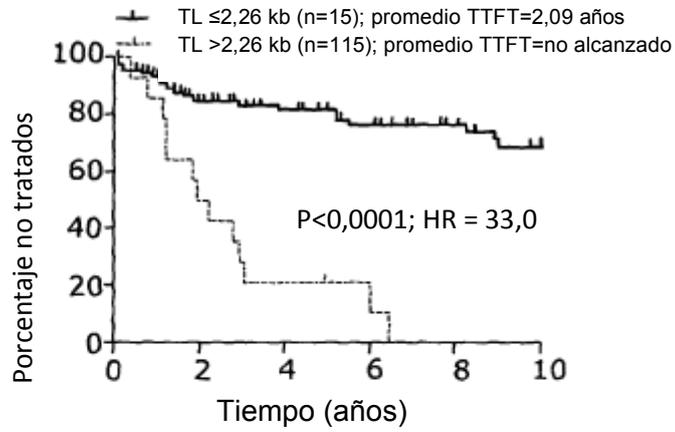


Fig. 3C

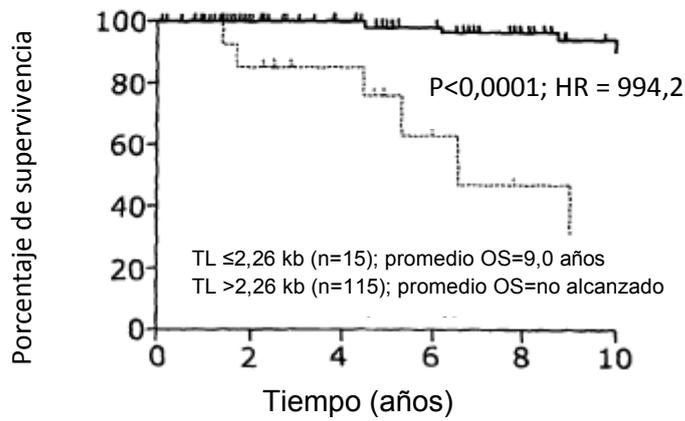


Fig. 3D

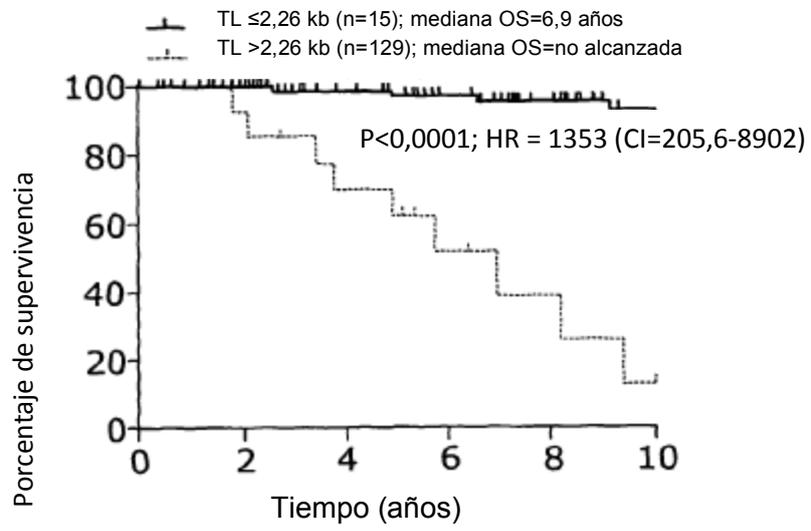


Fig. 3E

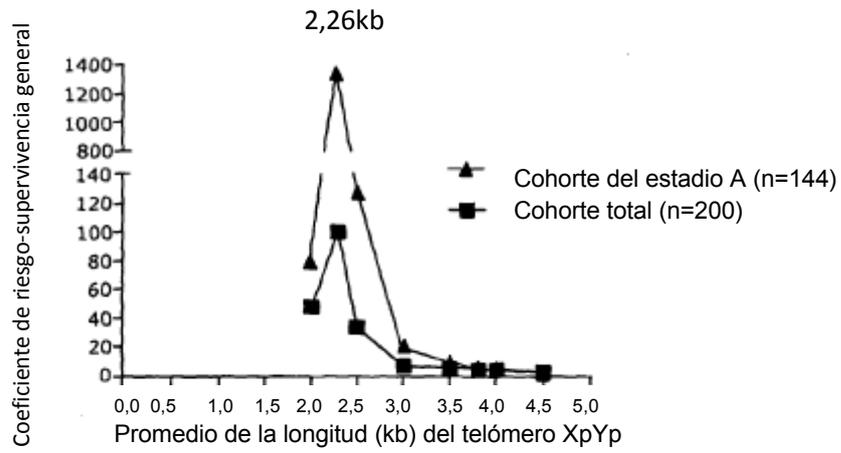


Fig. 3F

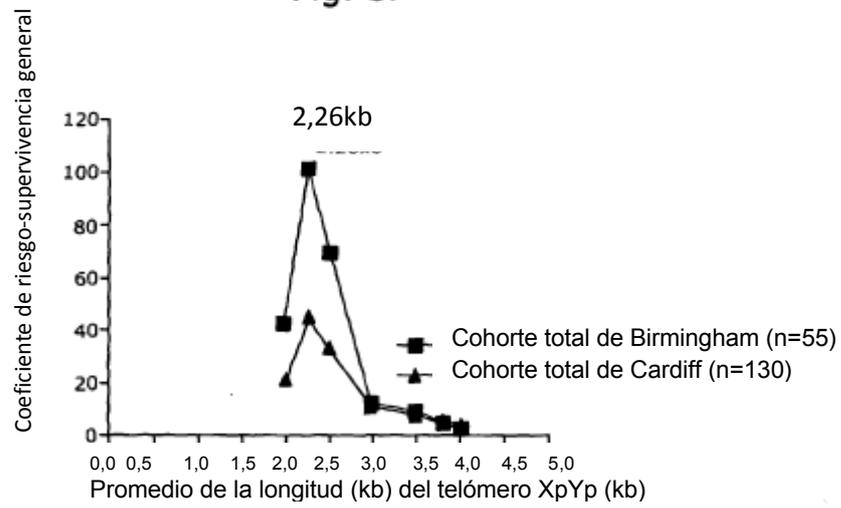


Fig. 3G

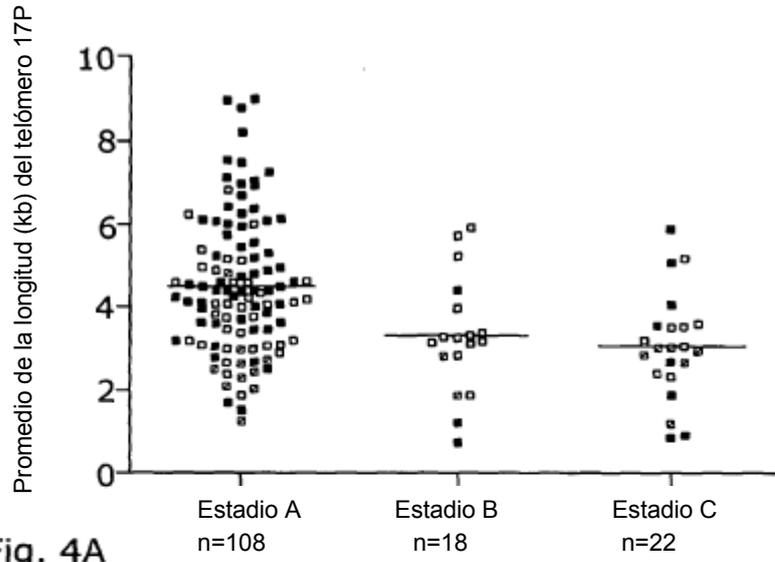


Fig. 4A

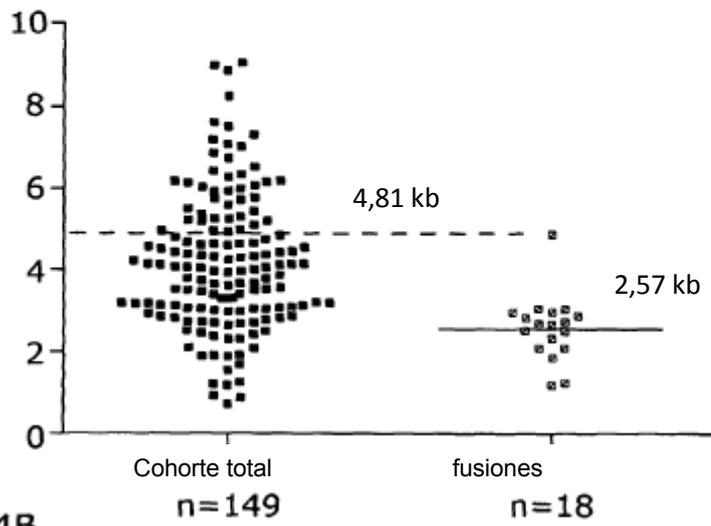


Fig. 4B

- Ninguna fusión del telómero
- ▣ Fusión del telómero
- No analizado para fusión

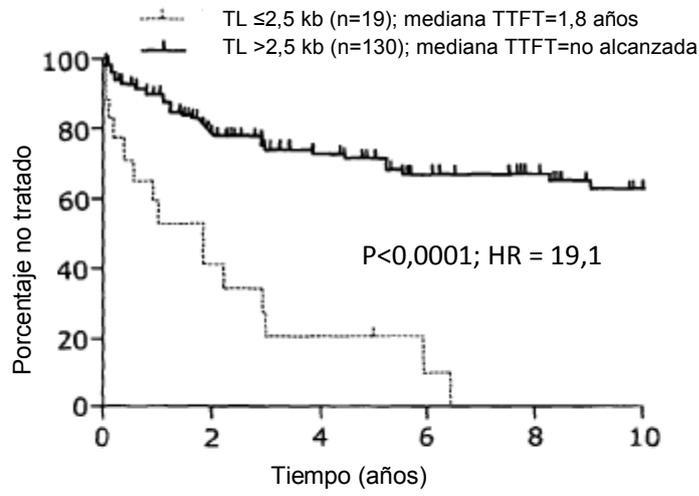


Fig. 4C

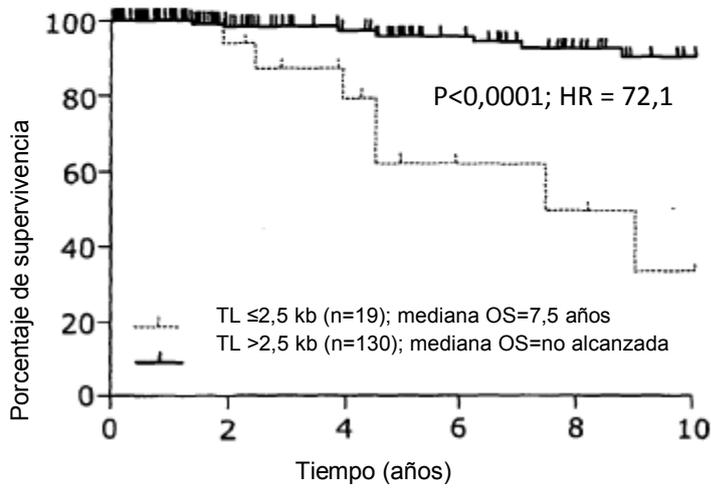


Fig. 4D

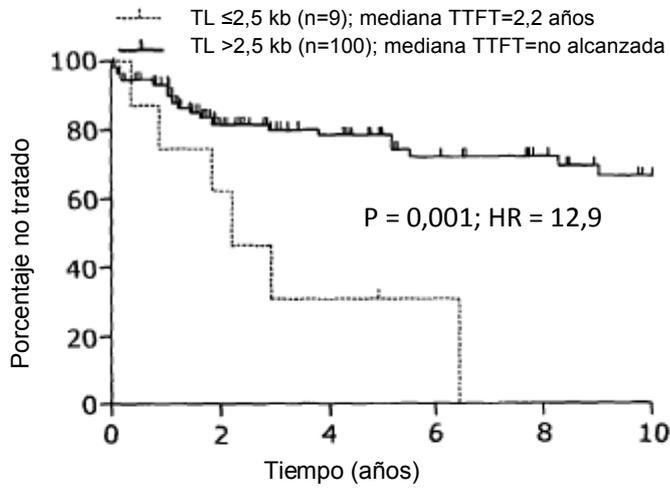


Fig. 4E

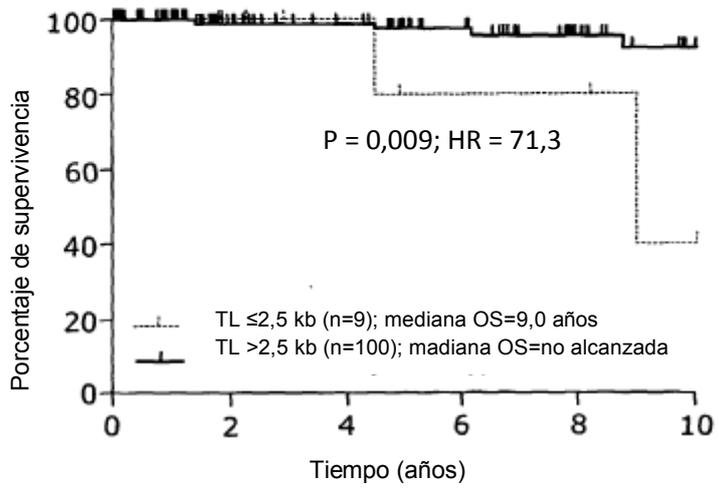


Fig. 4F

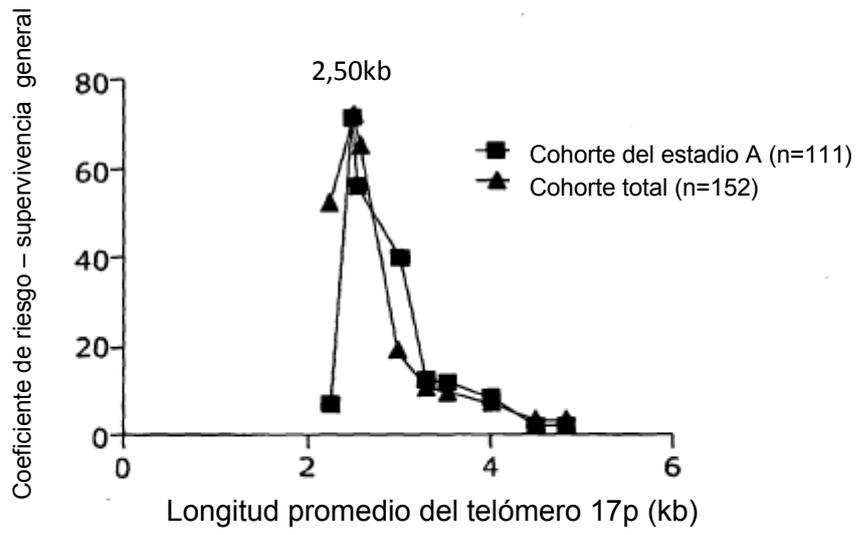


Fig. 4G

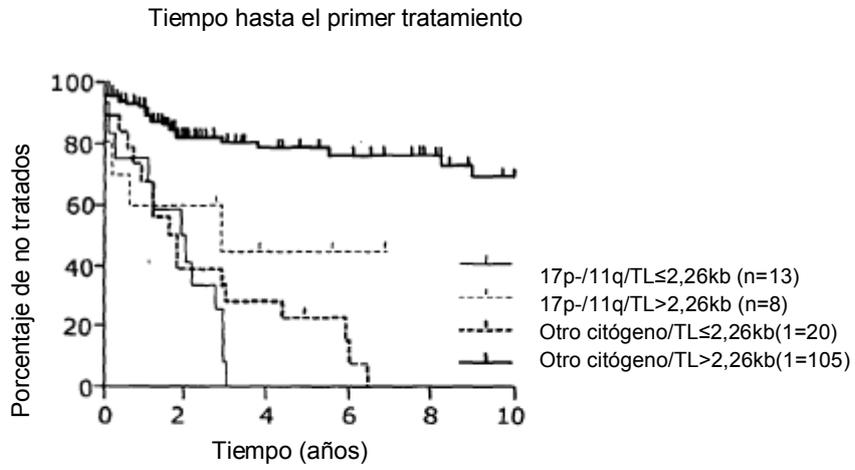


Fig. 5A

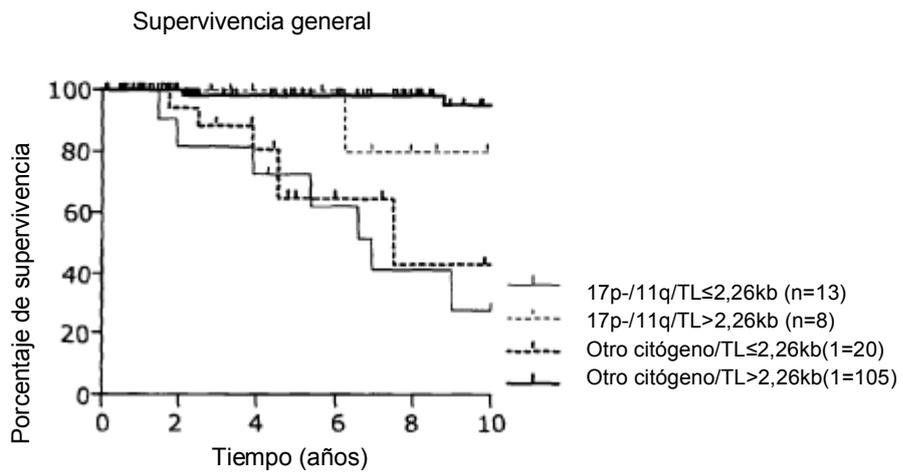


Fig. 5B

Tiempo hasta el primer tratamiento

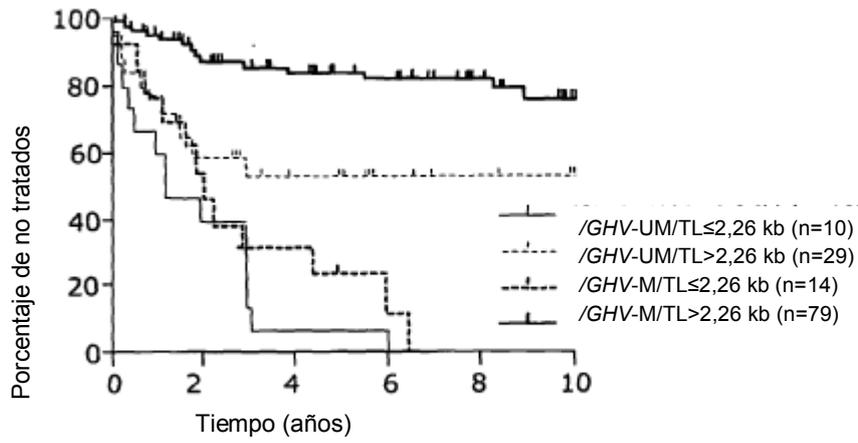


Fig. 5C

Supervivencia general

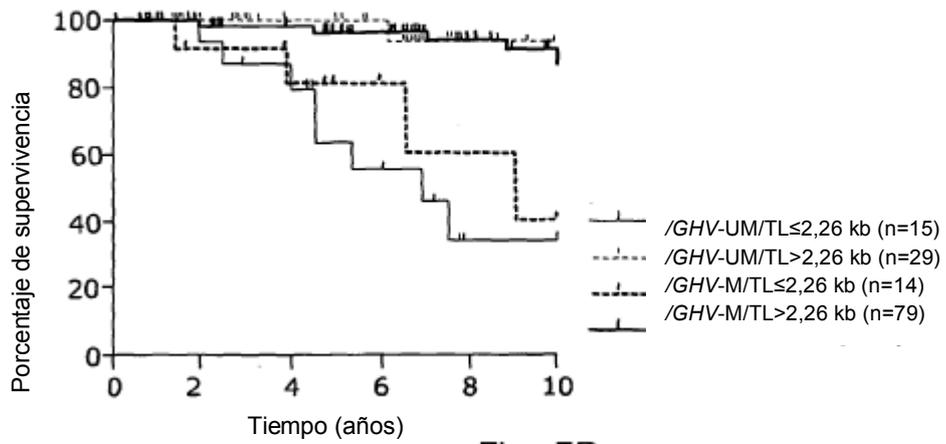


Fig. 5D

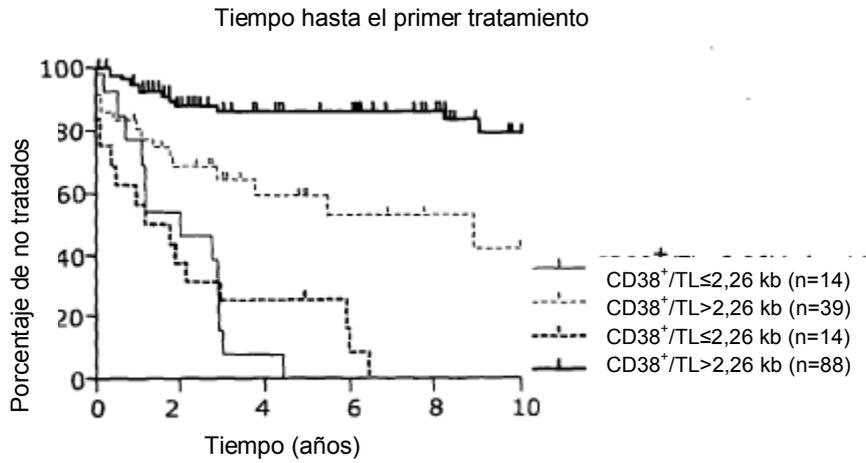


Fig. 5E

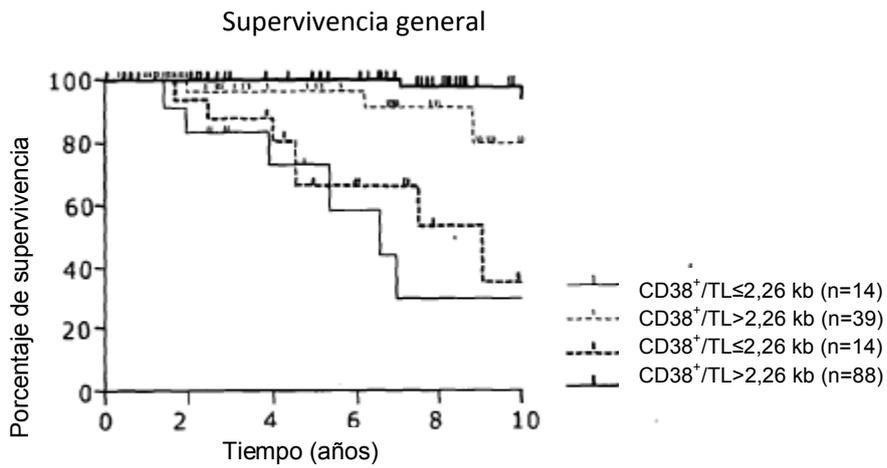


Fig. 5F

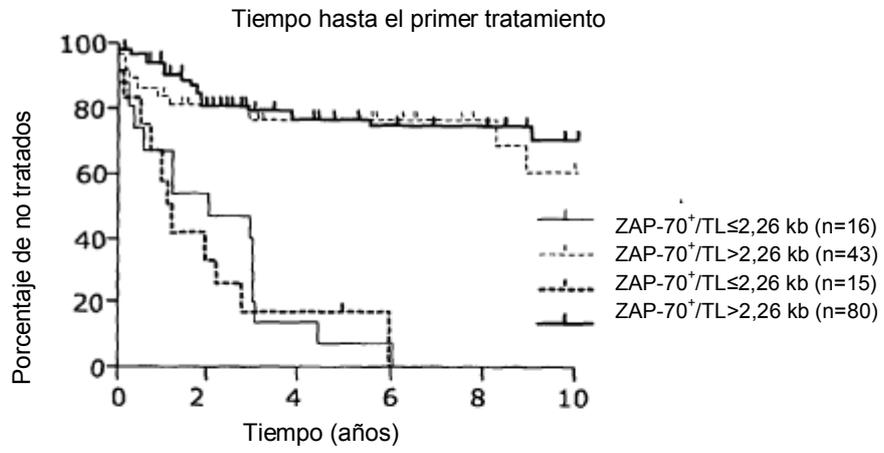


Fig. 5G

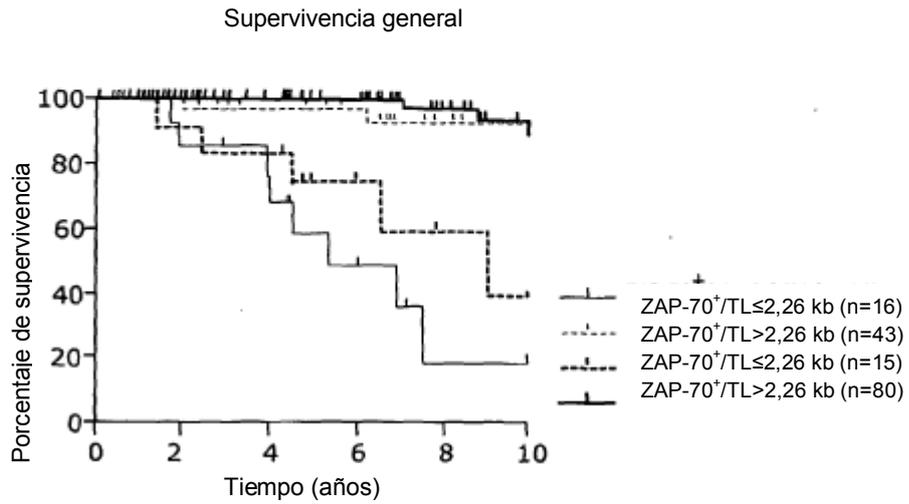


Fig. 5H

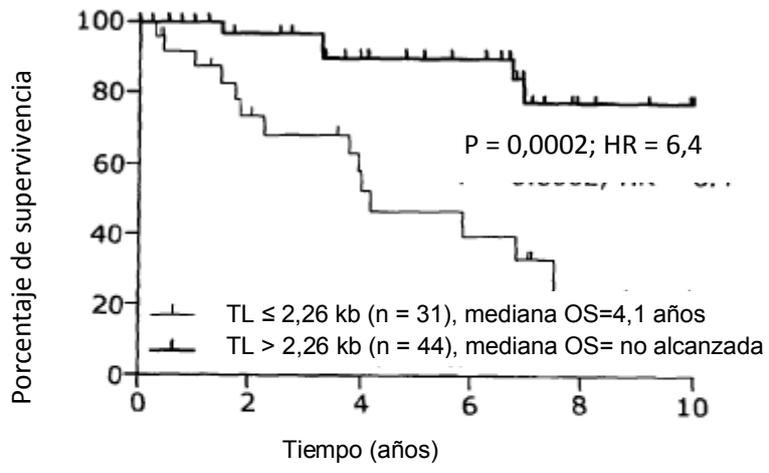


Fig. 6

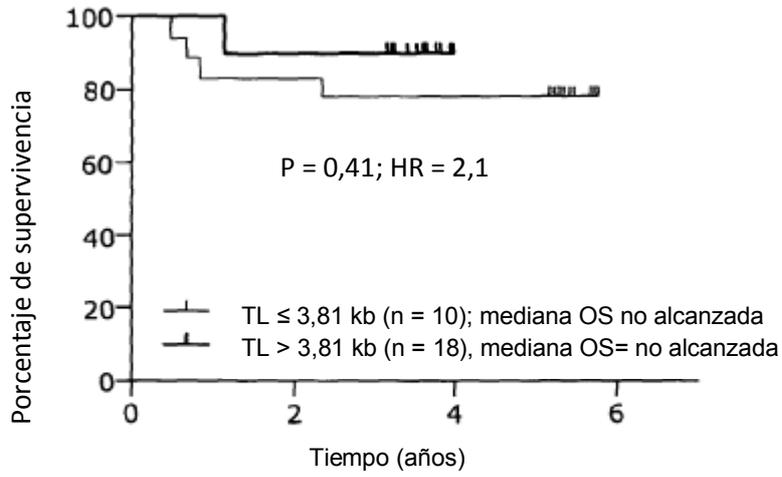


Fig. 7A

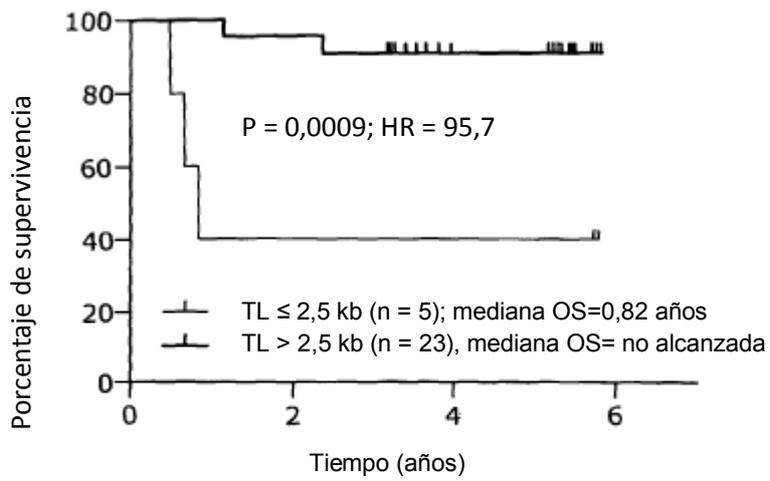


Fig. 7B

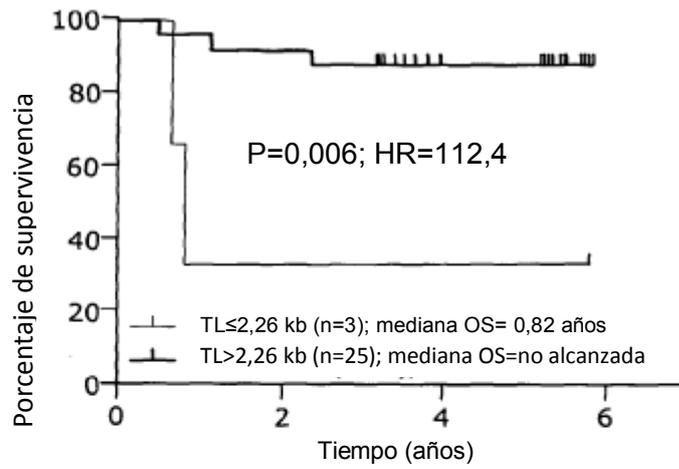


Fig. 7C

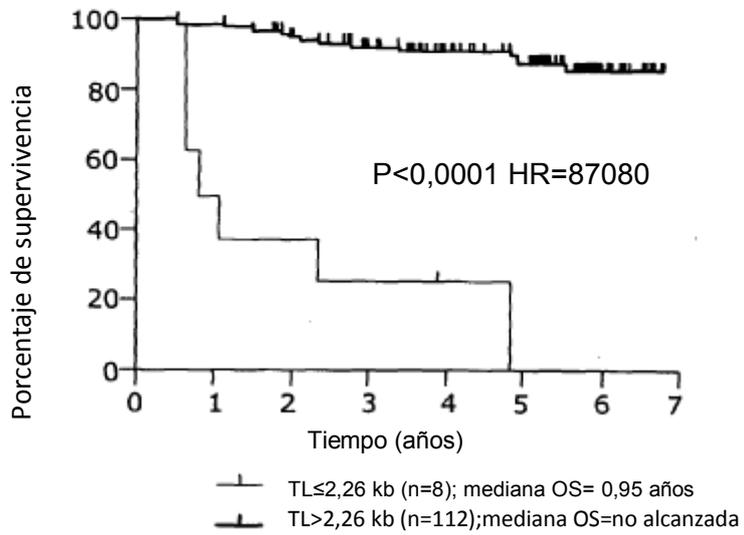


Fig. 7D

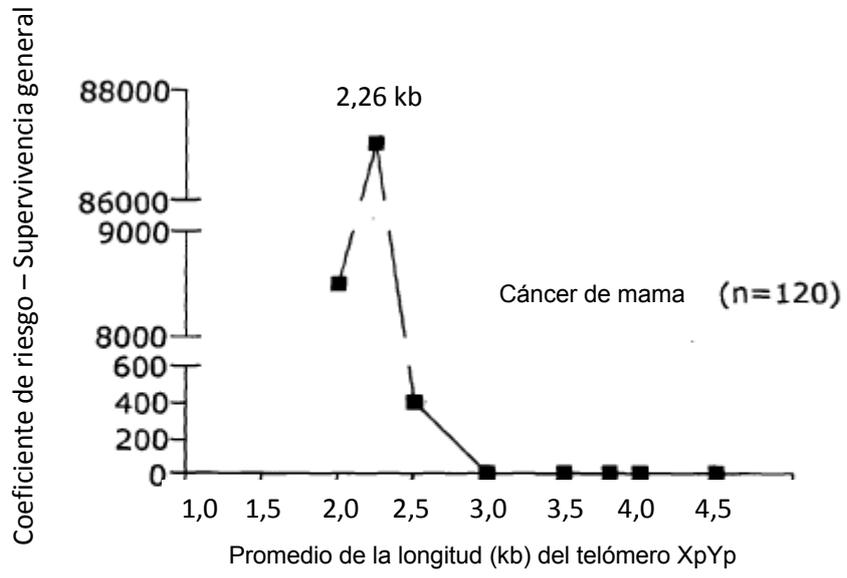


Fig. 7E

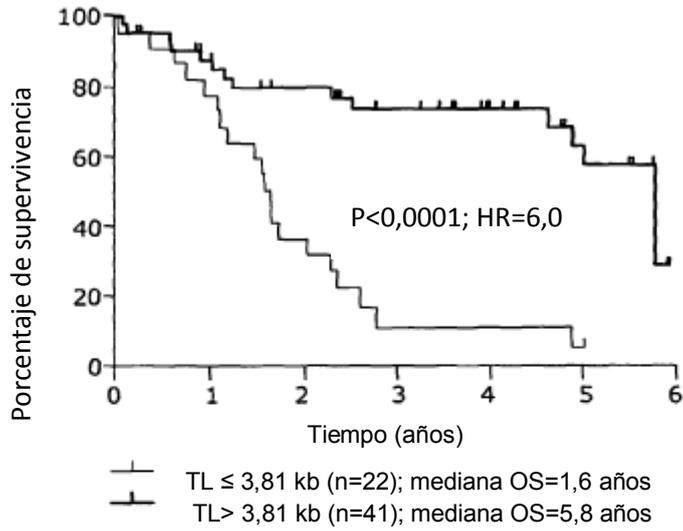


Fig. 8A

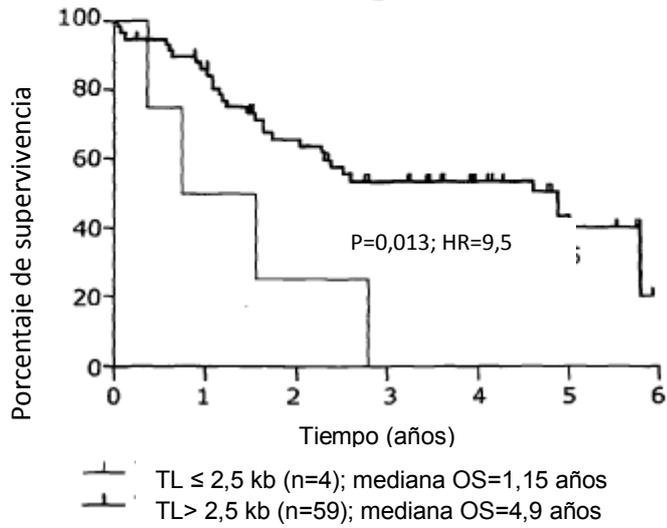


Fig. 8B

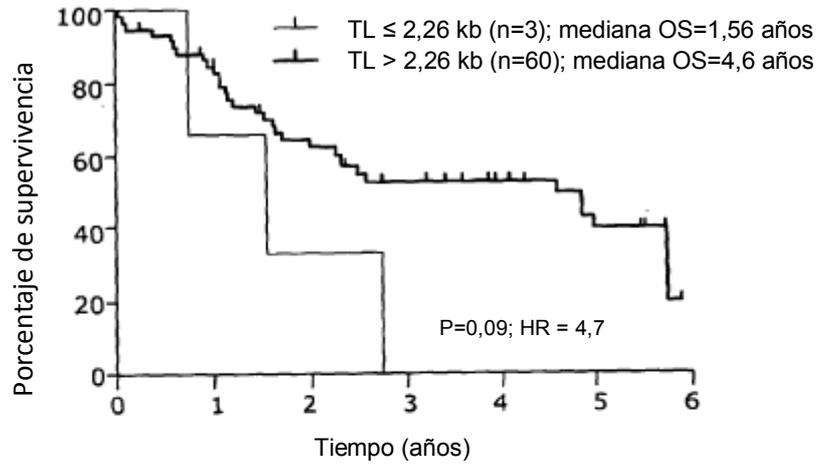


Fig. 8C

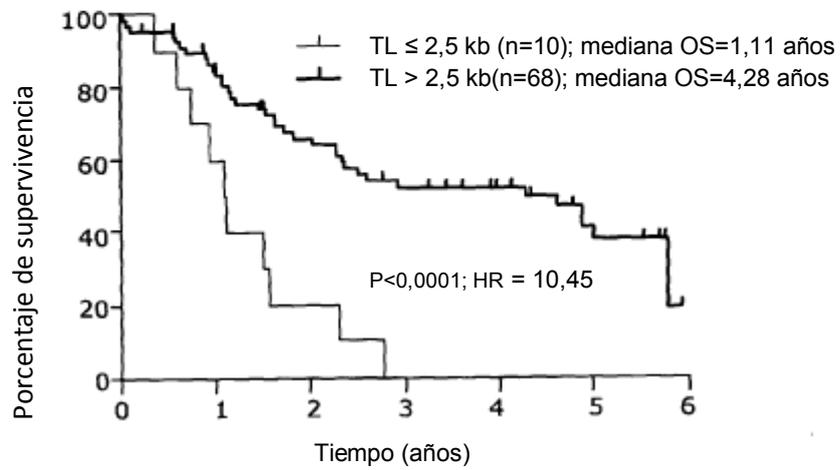


Fig. 8D

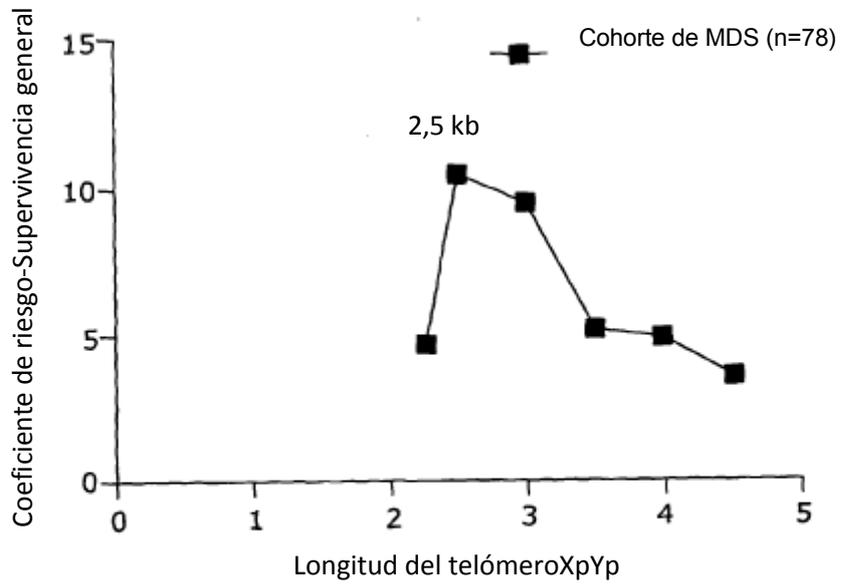


Fig. 8E