

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 958**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2012 PCT/US2012/030581**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12135125**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2012 E 12764396 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2691775**

54 Título: **Medición de la longitud de telómeros en muestras fijadas en formalina, embebidas en parafina (FFPE) por PCR cuantitativa**

30 Prioridad:

**28.03.2011 US 201161468491 P**

**15.09.2011 US 201161535291 P**

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

**01.03.2018**

73 Titular/es:

**GERON CORPORATION (100.0%)**

**149 Commonwealth Drive  
Menlo Park, CA 94025, US**

72 Inventor/es:

**WANG, HUI;  
GO, NING, F. y  
PIROT, ZHU, ZHEN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 656 958 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

Medición de la longitud de telómeros en muestras fijadas en formalina, embebidas en parafina (FFPE) por PCR cuantitativa

5 Campo de la invención

La invención se refiere a métodos para cuantificar la longitud de telómeros en muestras de tejido fijadas en formalina embebidas en parafina.

10 Antecedentes de la invención

Los telómeros son secuencias repetitivas de ácidos nucleicos presentes en los extremos de los cromosomas lineales de organismos eucariotas. Las secuencias de telómeros junto con las proteínas que se unen a telómeros confieren estabilidad a los cromosomas. Los telómeros se componen generalmente de repeticiones en tándem cortas con una unidad de secuencia de repetición especificada por la enzima telomerasa en particular para el organismo. Se conocen las secuencias de repetición de telómeros para diversos organismos. La unidad de secuencia de repetición de telómero humana es (TTAGGG)<sub>n</sub>. Además de las secuencias de repetición bicatenarias, los extremos 3' de algunos telómeros contienen una región monocatenaria que para los humanos está localizada en la cadena rica en G.

La telomerasa es una riboproteína que sintetiza ADN telomérico. En ausencia de telomerasa, los telómeros se acortan gradualmente ya que las ADN polimerasas no pueden replicar los extremos de ADN bicatenarios lineales. El acortamiento gradual de los telómeros conduce en última instancia a la detención del ciclo celular o muerte celular.

25 En los seres humanos, la mortalidad de células dependiente de la longitud del telómero tiene lugar por la represión de telomerasa en células somáticas normales antes del nacimiento, una longitud de telómero inicial en el nacimiento y a lo largo de la vida y una expresión de telomerasa rígidamente regulada en células madre o progenitoras. Los seres humanos nacen con telómeros de "longitud completa". Dado que la telomerasa se regula a la baja en los tejidos somáticos, esto conlleva una pérdida de ADN telomérico con la edad celular y cronológica. De esta forma, los telómeros actúan como un reloj mitótico que confiere una capacidad finita para la división de células humanas normales. Los telómeros cortos dificultan la proliferación de células madre. Por ejemplo, los telómeros cortos en las células madre epidérmicas dificultan el crecimiento de la piel y el cabello.

35 Las células tumorales, que surgen de las células normales, tienen por lo general telómeros más cortos que los tejidos normales, pero mantienen sus telómeros mediante la expresión de telomerasa. Existen tres puntos de verificación reguladores dependientes de telómero en la mortalidad de las células. El primer punto de verificación de daños del ADN desencadena senescencia replicativa cuando la longitud media del telómero es menos de 5 pb. El segundo punto de verificación desencadena muerte celular cuando la longitud media del telómero se reduce a 1-3 kpb. El tercer punto de verificación, denominado, desprotección de telómero, puede tener lugar a cualquier longitud de telómero y se desencadena mediante telómeros anormalmente estructurados (Harley Nature vol. 8 (marzo 2008)) Las células tumorales que experimentan rondas de mutación y expansión clónica durante la tumorigénesis empobrecen rápidamente la longitud de telómero y mueren si no se activa telomerasa. Durante la progresión del cáncer, las poblaciones de células tumorales evolucionan a través de sucesivos cambios genéticos y epigenéticos que les permiten escapar de los controles celulares somáticos normales. Uno de los mecanismos de escape del tumor es la activación de telomerasa esquivando las rutas de mortalidad celular dependientes de telómero. La telomerasa se expresa en la mayoría de los tumores desde todos los tipos de cáncer. Por lo tanto, los tumores generalmente tienen telómeros significativamente más cortos que los tejidos normales, pero con una mayor expresión de telomerasa (Harley et al., Nature, vol. 8, pp. 167-179, 2008).

50 El tejido embebido en parafina fijado en formalina es un valioso recurso de muestras biológicas de procedimientos médicos. Dichos tejidos incluyen por ejemplo los de biopsias de cáncer o tumor. Dichos tejidos se fijan en formalina y se embeben en parafina una vez extirpados del paciente y se archivan para una futura referencia. Dichos tejidos archivados podrían ser una útil fuente de información en lo que se refiere a la longitud de los telómeros en el tejido de tumor y el tejido normal que lo rodea. Sería útil medir la longitud de telómeros en muestras de tejido embebido en parafina fijado en formalina. Sin embargo, todavía no se ha desarrollado un método rápido y de alto rendimiento para medir la longitud media del telómero en tejidos embebidos en parafina fijados en formalina.

60 Se dispone de algunos métodos más lentos y laboriosos para determinar la longitud de telómeros en tejidos. En uno de dichos métodos, se determina la longitud de los telómeros midiendo la longitud media de un fragmento de restricción terminal (TRF por sus siglas en inglés). TRF se define como la longitud, en general la longitud promedio, de fragmentos que son el resultado de una digestión completa de ADN genómico con enzima(s) de restricción que no escinden el ácido nucleico dentro de las secuencias teloméricas y subtelméricas, pero sí que lo escinden frecuentemente dentro de las secuencias genómicas de copia única. El fragmento de restricción terminal resultante contiene tanto repeticiones teloméricas como ADN subtelmérico. El ADN genómico digerido con enzimas de restricción se separa por electroforesis y se transfiere a un soporte como pueda ser una membrana de nilón. Los

fragmentos que contienen las secuencias de telómero se detectan por hibridación de una sonda específica para las secuencias de telómero para la membrana. Tras la visualización de los fragmentos que contienen telómero, se pueden calcular las longitudes medidas de los fragmentos de restricción terminales. La estimación de TRF por transferencia de Southern proporciona una distribución de la longitud de telómeros en las células o el tejido y, así, la longitud media del telómero. Sin embargo, el ensayo TRF es un proceso laborioso y requiere una cantidad relativamente grande de ADN genómico. Por otra parte, no es adecuado para muestras embebidas en parafina fijadas en formalina (FFPE) por la fuerte reticulación y fragmentación del ADN derivada de la fijación en formalina del tejido.

Se ha descrito un método basado en reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (QPCR) para la medición de la longitud relativa de telómero en muestras de tejido frescas normales (sin fijar) Cawthon Nucleic Acids Research vol. 30, no. 10 (2002) and Cawthon, Nucleic Acids Research vol. 37, no. 3 (2009). El protocolo utiliza dos conjuntos de cebadores. Un conjunto de cebadores se utiliza para amplificar repeticiones de hexámero de telómero. El otro conjunto de cebadores se utiliza para amplificar un gen de copia única en el genoma, por ejemplo una fosfoproteína ribosómica ácida (36B4). La longitud de telómero se expresa como un producto de telómero normalizado mediante un producto génico de copia única. Es decir, la longitud relativa de telómero de una muestra es el factor en el que la muestra experimental difiere de una muestra de ADN de referencia en su relación del número de copias de repetición de telómero con respecto al número de copias de gen única. La cantidad de repeticiones de telómero en cada muestra experimental se mide como el nivel de dilución de una muestra de ADN de referencia seleccionada arbitrariamente que podría hacer las muestras experimentales y de referencia equivalentes en lo que respecta al número de ciclos de PCR necesarios para generar una cantidad dada de producto de PCR de telómero durante la fase exponencial de amplificación por PCR. De manera similar, la cantidad relativa de gen de copia única en cada muestra experimental se expresa como el nivel de dilución de la muestra de ADN de referencia necesario para ajustarlo a la muestra experimental en lo que se refiere al número de ciclos de PCR necesarios para generar una cantidad dada de producto de PCR de gen de copia única durante la fase exponencial de la PCR. Para cada muestra experimental, la relación de estos factores de dilución es el telómero relativo con respecto a la relación de gen de copia única (T/S). Por lo tanto  $T/S = 1$  cuando el ADN desconocido es idéntico al ADN de referencia en su relación de número de copias de repetición de telómero con respecto al número de copias únicas. La muestra de ADN de referencia (con la que se comparan todas las muestras experimentales en un estudio dado) puede ser de un solo individuo o puede ser una muestra agrupada de múltiples individuos. La relación T/S de un individuo en relación con la relación T/S del individuo de referencia o la muestra agrupada corresponde a la longitud de telómero relativa del ADN del individuo.

Se ha adoptado el ensayo para la medición de la longitud de telómero en leucocitos recién aislados. Sin embargo, no se ha utilizado con éxito para muestras FFPE. (Koppelstaetter et al., Mechanisms of Ageing and Development vol. 126 1331(2005)). Los principales retos técnicos son la reticulación y fragmentación de ADN, las impurezas de ADN aislado, la eficacia de amplificación por PCR variable y la normalización de la señal de telómero con una señal de gen de copia única en la misma muestra.

En la patente internacional WO 2009/080783 se describe un método para la determinación *ex vivo* de la calidad de un órgano para trasplante que comprende determinar la cantidad de CDKN2A en la muestra, determinando la longitud de telómero y correlacionando la cantidad de CDKN2A con la longitud de telómero con el fin de determinar la cantidad del órgano. En la patente internacional WO 03/064615 se describe un método para dirigir la amplificación de secuencias de repetición telomérica humanas. En la patente internacional WO 2010/075413 se describe un método para medir la longitud de telómeros promedio. Asimismo, se notifica un método para la extracción y amplificación de ADN desde tejidos embebidos en parafina y fijados en formalina en Wu et al., Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology vol. 10(3) 269 (2002).

Los autores de la invención describen en el presente documento un protocolo de PCR cuantitativa que sirve para medir de forma segura las longitudes de telómeros en células o tejidos que han sido fijados en formalina y embebidos en parafina.

#### Sumario de la invención

De acuerdo con los objetos mencionados de la invención, la presente invención proporciona métodos de determinación de la longitud de telómero en muestras embebidas en parafina fijadas en formalina (FFPE) por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa tal como se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona un método de medición de la longitud de telómeros en un tejido embebido en parafina fijado en parafina que comprende:

- a) extraer el ácido nucleico telomérico diana de un tejido embebido en parafina fijado en formalina utilizando un método de extracción suave que no aísla los fragmentos de ADN en una columna y que retiene una mayoría de los fragmentos de ácido nucleico diana teloméricos que son de al menos 50 pb,

65

- 5 b) combinar en una reacción en cadena de la polimerasa el ácido nucleico telomérico diana extraído de la etapa (a) que comprende una primera y una segunda cadena sustancialmente complementarias, un primer cebador telomérico en el que el primer cebador telomérico es capaz de hibridarse con la primera cadena del ácido nucleico telomérico diana y de ser extendido por ADN polimerasa para formar un cebador telomérico extendido, y un segundo cebador telomérico, en el que el segundo cebador telomérico es capaz de hibridarse con el primer cebador telomérico extendido y de ser extendido por ADN polimerasa pero que no es capaz de hibridarse con el ácido nucleico telomérico diana y que se extiende mediante ADN polimerasa;
- 10 c) calentar la reacción en cadena de la polimerasa a una temperatura suficiente para generar monocadenas de ácido nucleico y reducir la temperatura a una temperatura comprendida entre 49 °C y 60 °C para dejar que los cebadores se hibriden con sus dianas y se extiendan, y
- 15 d) repetir la etapa (c) durante al menos 4 ciclos,
- 15 e) calentar la reacción en cadena de la polimerasa a una temperatura suficiente para generar una monocadena de ácidos nucleicos y reducir la temperatura de 55°C a 65 °C para dar cabida a que se hibriden los cebadores con sus dianas y se extiendan durante otros 20 a 40 ciclos más,
- 20 f) identificar el ciclo de replicación en el que se pasa la señal de PCR umbral, y
- 20 g) determinar la longitud de telómero media.

25 En una realización, la secuencia del primer cebador telomérico es Telg 5'-ACA CTA AGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTA GTG T (SEQ ID NO:1) y el segundo cebador telomérico es Telc 5'-TGT TAG GTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA ACA (SEQ ID NO:2).

30 En una realización, hay de 5 a 10 ciclos de la etapa (c) de calentar la reacción en cadena de a polimerasa a una temperatura suficiente para generar una monocadena de ácido nucleico y reducir la temperatura a una temperatura para dar cabida a que los cebadores se hibriden con sus dianas y se extiendan. En una realización, hay al menos 6 ciclos. En esta etapa de los ciclos, el intervalo de temperatura es de 49 °C – 60 °C. La etapa (c) se puede repetir durante al menos 5 ciclos de la etapa (d).

35 En una realización hay una etapa más de calentar la reacción en cadena de la polimerasa a una temperatura suficiente para generar una monocadena de ácidos nucleicos y reducir la temperatura a una temperatura que permita que se hibriden los cebadores con sus dianas y se extiendan durante otros 20 a 40 ciclos más. En esta etapa de la reacción de PCR, el intervalo de temperatura es de 55 °C a 65 °C.

En otra realización, se mide la longitud del telómero desde células tumorales fijadas en formalina.

40 En una realización, el método de medición de la longitud de telómero en tejido embebido en parafina fijado en formalina se caracteriza por que en la etapa (b), el primer cebador telomérico es Telg 5'-ACA CTA AGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTA GTG T (SEQ ID NO: 1) y el segundo cebador telomérico es Telc 5'-TGT TAG GTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA ACA (SEQ ID NO: 2), en la etapa (c) la reacción de PCR comprende ADN polimerasa, 50 mM KC1, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada desoxinucleosida trifosfato, 5 mM ditiotreitól, 1 % de sulfóxido de dimetilo y 15 mM Tris-HCl pH 8,0, y en la etapa (d), se repite la etapa (c) durante al menos 4 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 10 segundos a 50 °C, y en la etapa (e), se repite otra vez la etapa (c) durante 25 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 60 °C.

50 En esta realización, se puede repetir la etapa (c) durante al menos 5 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 10 segundos a 50 °C.

El amplicón telomérico generado por extensión de los cebadores primero y segundo es de aproximadamente 50 a 100 nucleótidos.

55 En otra realización más, la presente invención comprende también una etapa más de combinar en una reacción en cadena de la polimerasa un ácido nucleico de copia única diana obtenido de un tejido embebido en parafina fijado en formalina que comprende una primera y una segunda cadena sustancialmente complementarias, un primer cebador de gen de copia única, en el que el primer cebador de gen de copia única es capaz de hibridarse con la primera cadena de ácidos nucleicos del gen de copia única diana y ser extendido por ADN polimerasa para formar un cebador de gen de copia única extendido, y un segundo cebador de gen de copia única, en el que el segundo cebador de gen de copia única es capaz de hibridarse con el primer cebador extendido de gen de copia única y/o el ADN diana o de ser extendido por ADN polimerasa permitiendo que prosiga la reacción en cadena de la polimerasa en ciclos de desnaturalización y extensión, e identificar el ciclo de replicación en el que se pasa la señal de PCR umbral y usar dicho valor y el valor en el que se pasa la señal de PCR umbral para la reacción en cadena de la polimerasa de la secuencia de ácido nucleico de la diana telomérica para determinar la longitud de telómero promedio.

La etapa de determinación de la longitud de telómero se realiza sustrayendo el ciclo umbral de la PCR cuantitativa del gen de copia única del ciclo umbral de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa telomérica ( $\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{telómero}} - Ct_{\text{gen de copia única}}$ ). La diferencia del número de ciclos promedio entre el gen de copia única y la reacción en cadena de la polimerasa telomérica determinará las longitudes de telómero ( $\Delta Ct = Ct_{\text{telómero}} - Ct_{\text{gen de copia única}}$ ).

La longitud de telómero se determina para un individuo y se correlaciona con la longitud de telómero observada en una población de individuos o con un individuo de referencia. La población de individuos se ajusta en edad con la edad del individuo del ensayo. Para los seres humanos, la población con el ajuste de edad está dentro de una diferencia de aproximadamente 10 años con el individuo, más preferentemente una diferencia de 5 años siendo sobre todo preferente una diferencia de 1 año.

La correlación de la longitud de telómero medida del individuo y de la población se examina a través de diversos métodos estadísticos, tales como análisis de supervivencia, incluyendo el modelo de los riesgos proporcionales o de regresión de Cox, estimación de la distribución de la supervivencia de Kaplan-Meier, prueba de Peto Wilcoxon, análisis de probabilidad máxima, análisis de regresión múltiple, entre otros.

Los métodos de la presente invención se pueden emplear para determinar la respuesta de un individuo al tratamiento con un inhibidor de telomerasa, un agente inductor de daños del telómero o un activador de la telomerasa que comprende la medición de la longitud de telómero en un tejido embebido en parafina fijado en formalina de acuerdo con el método descrito en el presente documento. Se mide la velocidad a la que se acorta la longitud relativa del telómero en tumores sólidos a lo largo del tiempo de tratamiento para determinar la reacción del individuo al inhibidor de telomerasa o el agente inductor de daños del telómero. Se mide la velocidad a la que aumenta la longitud relativa del telómero para un individuo en relación con el tiempo de tratamiento para determinar la reacción del individuo al activador de telomerasa. El inhibidor de telomerasa puede ser Imetelstat (GRN163L) (patente estadounidense No. 7.494.982).

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig.1 es una fotografía de la tinción con hemolisina y eosina de cuatro líneas celulares de referencia y tumores de mama humanos (T-645 y T-654)

La Fig.2a es una fotografía de geles de agarosa de ADN genómicos extraídos de muestras de líneas celulares FFPE utilizando un kit BioChain. Se fragmentaron los ADN y los tamaños de cada fragmento de ADN fueron de 50 pb a 2 kb. La Fig. 2b es una fotografía de geles de agarosa de ADN genómicos extraídos con un kit de extracción BioChain, un kit Qiagen y el kit de extracción TrimGene.

La Fig. 3 es una fotografía de los tamaños de sección de tejidos FFPE y rendimiento de ADN. Fig. 3a: las muestras de tejido FFPE en las zonas rodeadas con un círculo se utilizaron para el aislamiento de ADN, que corresponde a aproximadamente 16, 36, 100 y 150 mm<sup>2</sup> respectivamente. Fig. 3b. Se generaron los valores Ct de las secuencias de telómero y el gen de copia única 36B4 en ADN FFPE extraído de la zona rodeada con un círculo en diferentes muestras (10 ng/reacción).

Fig.4a Se aisló cada ADN del submuestreo de cinco muestras de tumor humano de xenoinjerto de ratón idénticas con un kit de extracción de ADN FFPE BioChain. El área de tejido de cada muestra fue 150, 100, 36 y 16 mm<sup>2</sup> por separado. Fig. 4b. El aumento de la concentración de ADN de los extractos guardó una alta correlación con el aumento del área de tejido para el aislamiento de ADN.

Fig.5a. Se sometieron a ensayo ocho submuestras de cada muestra de línea celular por triplicado en un solo proceso de PCR. Cada punto en el gráfico indicó la relación T/S de una submuestra. Se determinó la longitud relativa de telómero según la media de la relación T/S de cada línea celular. La longitud relativa del telómero de la más corta a la más larga en las líneas celulares de cáncer Ovar5, MDAMB-231, CCRF-CEM y A549. Fig. 5b. Se determinaron ocho y siete submuestras de tejidos de tumor T-645 y T-654. El promedio de la longitud relativa de telómero de T-645 fue más larga que la de T-654.

Fig. 6. Reproducibilidad de relaciones T/S relativas en procesos independiente de ensayo de PCR cuantitativa FFPE. Se sometieron a ensayo las mismas 32 submuestras, por triplicado, en tres días diferentes. La ecuación de regresión lineal y el coeficiente de correlación se determinaron utilizando Prism.

Fig.7a. Se determinaron las longitudes de telómero de cuatro líneas celulares y dos tumores utilizando el ensayo de longitud de telómero TeloTAGGG (Roche). El promedio de las longitudes de telómero de dos ensayos independientes fueron 2,7kb (Ovar-5), 3,72b (MDA-MB-231), 6,3kb (CCRF-CEM), 8,6kb (A549), 8 kb (T-645) y 5 kb (T-654). Fig. 7b. Se determinaron las longitudes relativas de telómero según se midieron por PCR según la media de la relación T/S de submuestras en cada línea celular o tejido tumoral. En cada ensayo, se determinaron cuatro de las ocho submuestras de cada línea celular.

Fig. 8a. La correlación entre TRF y la relación T/S en cuatro líneas celulares y dos tumores humanos,  $R^2=0,79$ ,  $P<0,017$ . Fig. 8b. La correlación entre TRF y la relación T/S en cuatro líneas celulares solamente,  $R^2=0,99992$ ,  $P<0,0006$ .

5 Fig. 9: Fotografía de productos de PCR cuantitativa realizada en 15 % de gel de acrilamida no desnaturizante

(a) Se generaron varios tamaños de productos de PCR por Tell/Tel2 (Cawthon, 2002) tanto en condiciones de tampón ABI como en el tampón del ejemplo 1. La reproducibilidad y eficiencia de PCR varió en cada ensayo. (b) cebadores Telg/Telc, se genera una gama de tamaños de producto de PCR con un enriquecimiento moderado de productos 100-150 nt en tampón ABI. (c) Se generó un producto de 79 nt uniforme a partir de ADN FFPE con cebadores Telg/Telc en el tampón del Ejemplo 1.

10 Fig.10: El producto telomérico y el producto de gen de copia única 36B4 presentan un tamaño de amplicón similar en ADN FFPE aislado de diferentes líneas celulares. El amplicón de telómero calculado es 79 nt y el amplicón del gen de copia única 36B4 es de 76 nt.

15 Fig.11: Titulación de ADN de entrada en telómero y reacciones de PCR cuantitativa de gen de copia única. Se obtuvo una alta eficiencia de amplificación de PCR a partir de ADN de 60 ng-0,08 ng tanto en el telómero como en el gen de copia única 36B4 utilizando ADN genómico recién aislado de la línea celular OVCAR-5.

20 Fig.12: Se demuestra la especificidad de productos amplificados por PCR aumentando la temperatura de fusión con el tampón del Ejemplo 1.

#### 25 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos para determinar la longitud relativa de telómeros en tejidos fijados en formalina, tal como se define en las reivindicaciones.

30 En un aspecto, la invención proporciona un método para medir la longitud de telómero en un tejido embebido en parafina fijado en formalina que comprende:

- (a) extraer el ácido nucleico telomérico diana del tejido embebido en parafina fijado en formalina utilizando un método de extracción suave que no aísla los fragmentos de ADN en una columna y que retiene la mayoría de los fragmentos de ácido nucleico diana teloméricos que son de al menos 50 pb.
- 35 (b) combinar en una reacción en cadena de la polimerasa el ácido nucleico telomérico diana de la etapa (a) que comprende una primera y una segunda cadena sustancialmente complementarias, un primer cebador telomérico, en el que el primer cebador telomérico es capaz de hibridarse con la primera cadena del ácido nucleico telomérico diana y de ser extendido por ADN polimerasa para formar un cebador telomérico extendido, y un segundo cebador telomérico, en el que dicho segundo cebador telomérico es capaz de hibridarse con el primer cebador telomérico extendido y de ser extendido por ADN polimerasa, pero no es capaz de hibridarse con el ácido nucleico telomérico diana ni de ser extendido por ADN polimerasa.
- 40 (c) calentar la reacción en cadena de la polimerasa a una temperatura suficiente para generar una monocadena de ácido nucleico y reducir la temperatura a una temperatura de 49 °C a 60 °C para permitir que se hibriden los cebadores con sus dianas y se extiendan, y
- 45 (d) repetir la etapa (c) durante al menos 4 ciclos,
- (e) calentar la reacción en cadena de la polimerasa a una temperatura suficiente para generar una monocadena de ácidos nucleicos y reducir la temperatura de 55°C a 65 °C para dar cabida a que se hibriden los cebadores con sus dianas y se extiendan durante otros 20 a 40 ciclos más,
- 50 (f) identificar el ciclo de replicación al que se pasa la señal de PCR umbral, y
- (g) determinar la longitud de telómero media.

Tal como se ha descrito en el presente documento, tanto el primer cebador telomérico como el segundo no son exactamente complementarios para la secuencia diana telomérica. En una realización, el primer cebador telomérico tiene una secuencia desapareada cada 4 a 6 nucleótidos. En una realización, el segundo cebador telomérico tiene una secuencia desapareada cada 4 a 6 nucleótidos. En una realización, el segundo cebador telomérico comprende un nucleótido en su extremo 3' que no es complementario para el complemento de la secuencia telomérica diana evitando así que el segundo cebador sea extendido por ADN polimerasa en caso de que el segundo cebador se hibride con el complemento de la secuencia telomérica diana. En una realización, el desapareamiento del nucleótido 3' en el segundo cebador es exactamente complementario con el nucleótido correspondiente en el primer cebador telomérico extendido de manera que, si se hibrida el segundo cebador telomérico con el primer cebador telomérico extendido, se puede extender mediante ADN polimerasa.

55 Tal como se describe en el presente documento, la secuencia del primer cebador telomérico es Telg 5'-ACA CTA AGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTA GTG T (SEQ ID No: 1) y la del segundo cebador telomérico es Telc 5'-TGT TAG GTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA ACA (SEQ ID NO: 2).

5 Tal como se describe en el presente documento, hay de 5 a 10 ciclos de calentamiento de la reacción en cadena de la polimerasa para una temperatura suficiente para generar una monocadena de ácido nucleico y de reducción de la temperatura a una temperatura que permita que se hibriden los cebadores con sus dianas y se extiendan. En una realización, hay al menos 5 ciclos, al menos 6 ciclos, al menos 7 ciclos, al menos 8 ciclos, al menos 9 ciclos o al menos 10 ciclos. En esta etapa de los ciclos el intervalo de temperatura es de 49 °C – 60 °C o de 50 °C a 58 °C o a 56° C o a 57 °C o a 58 °C o a 59 °C.

10 Tal como se describe en el presente documento, hay una etapa más de calentamiento de la reacción en cadena de la polimerasa a una temperatura suficiente para generar una monocadena de ácido nucleico y de reducción de la temperatura a una temperatura que permita que los cebadores se hibriden con sus dianas y se extiendan durante 20 a 40 ciclos más o de 20 a 30 ciclos más o de 25 a 30 ciclos más. En esta etapa, la temperatura es suficiente para maximizar la hibridación de los cebadores con los cebadores extendidos, tal que se genera preferentemente el amplicón. En esta etapa de la reacción de PCR, la temperatura el intervalo de temperatura es de 55 °C a 65°C o de 58 °C a 63 °C o a 59 °C o a 60 °C o a 61 °C o a 62 °C.

15 Tal como se describe en el presente documento, se mide la longitud de telómero a partir de células tumorales fijadas en formalina. Las muestras adecuadas son las derivadas de muestras de tejido embebido en parafina fijado en formalina. Las muestras adecuadas se derivan de tejido sólido.

20 Tal como se describe en el presente documento, el amplicón generado por extensión del primer y el segundo cebador es de aproximadamente 50 a 100 pares de base, de 60 a 90 pares de base, de 70 a 80 pares de base.

25 Tal como se describe en el presente documento, el ácido nucleico telomérico diana se extrae tejido embebido en parafina, fijado en formalina utilizando un método de extracción suave que retiene la mayoría de los fragmentos de ácido nucleico diana teloméricos que son de al menos 50 pb, al menos 60 pb, al menos 70 pb, al menos 80 pb. El método de extracción retiene los fragmentos de ácido nucleico que son de menos de 60 pb, que son de menos de 70 pb, que son de menos de 80 pb, que son de menos de 90 pb, que son de menos de 100 pb, que son de menos de 110 pb. El método de extracción de ADN suave no utiliza una columna para aislar los fragmentos de ADN. Es posible encontrar fragmentos de ADN pequeños en las muestras de FFPE que se pueden perder durante la extracción en columna. El método de extracción de ácido nucleico puede ser el kit de extracción de ADN de tejido FFPE BioChain.

35 Tal como se describe en el presente documento, la muestra FFPE se desparafina antes de la extracción del ADN. Se extrae el ADN de la muestra FFPE sin previo desparafinado de la muestra de FFPE. La parafina no se elimina de la muestra FFPE.

40 Tal como se describe en el presente documento, el ácido nucleico extraído se calienta a al menos 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96°C, 97 °C durante al menos 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 60 minutos, 70 minutos, 80 minutos.

45 El tamaño del amplicón del gen de copia única en la reacción de PCR es similar al tamaño del amplicón para la reacción de PCR de telómero. El amplicón de gen único generado por la extensión de los cebadores primero y segundo es de aproximadamente 50 a 100 nucleótidos, de 60 a 90 nucleótidos, de 70 a 80 nucleótidos.

La etapa de determinación de la longitud de telómero es sustrayendo el ciclo umbral de la PCR cuantitativa del gen de copia única del ciclo umbral de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa telomérica ( $\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{telómero}} - Ct_{\text{gen de copia única}}$ ). La diferencia del número de ciclos promedio entre el gen de copia única y la reacción en cadena de la polimerasa telomérica determinará las longitudes de telómero ( $\Delta Ct = Ct_{\text{telómero}} - Ct_{\text{gen de copia única}}$ ).

50 La longitud de telómero se determina para un individuo y se correlaciona con la longitud de telómero observada en una población de individuos o con un individuo de referencia. La población de individuos se ajusta en edad con la edad del individuo del ensayo. Para los seres humanos, la población con el ajuste de edad está dentro de una diferencia de aproximadamente 10 años con el individuo, más preferentemente una diferencia de 5 años siendo sobre todo preferente una diferencia de 1 año.

55 La correlación de la longitud de telómero medida del individuo y de la población se examina a través de diversos métodos estadísticos, tales como análisis de supervivencia, incluyendo modelo de los riesgos proporcionales o de regresión de Cox, estimación de la distribución de la supervivencia de Kaplan-Meier, prueba de Peto Wilcoxon, análisis de probabilidad máxima, análisis de regresión múltiple, entre otros.

60 Los métodos de la presente invención se pueden emplear para determinar la respuesta de un individuo al tratamiento con un inhibidor de telomerasa, un agente inductor de daños del telómero o un activador de la telomerasa. Se mide la velocidad a la que se acorta la longitud relativa del telómero en tumores sólidos a lo largo del tiempo de tratamiento medido para determinar la reacción del individuo al inhibidor de telomerasa o el agente inductor de daños del telómero. Se mide la velocidad a la que aumenta la longitud relativa del telómero para un

individuo en relación con el tiempo de tratamiento para determinar la reacción del individuo al activador de telomerasa.

5 Las muestras de tejido embebidas en parafina fijadas en formalina para medir telómeros se obtienen aplicando métodos conocidos en la técnica. Las muestras que contienen telómero pueden obtenerse de cualquier tejido sólido de cualquier organismo, incluyendo tejidos del cerebro, el hígado, el bazo, la mama, el músculo, la piel, el riñón, el páncreas, la próstata, el ovario, el pulmón, así como otros tejidos incluyendo los obtenidos de muestras de biopsias.

10 Los organismos de los que pueden obtenerse dichos tejidos son cualquier organismo de mamífero. Dichos organismos de mamífero incluyen seres humanos. Dichos organismos de mamífero pueden incluir perros, gatos, monos, orangutanes, ratones, ratas, caballos, vacas, cerdos, etc.

15 Tal como se utiliza en el presente documento "ácidos nucleicos teloméricos" significa una secuencia de ácidos nucleicos en una monocadena o bicadena de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de telómero del mamífero. En los seres humanos, la secuencia de repetición telomérica es TTAGGG en una cadena y CCCTAA en la otra cadena.

20 Un ácido nucleico contendrá generalmente enlaces fosfodiéster, pero puede contener análogos de ácido nucleico que tienen cadenas principales alternativas. Los ácidos nucleicos deben ser capaces de extensión 3' mediante polimerasas en el proceso de PCR cuantitativa.

25 Las muestras que contienen ácidos nucleicos teloméricos se pueden preparar utilizando técnicas muy conocidas. Por ejemplo, es posible tratar una mezcla utilizando detergentes, sonicación, electroporación, desnaturalizantes, etc. para perturbar las células. Se pueden purificar los ácidos nucleicos diana según sea necesario. Se pueden añadir los componentes de la reacción simultáneamente o de forma sucesiva, en cualquier orden. Se ha observado que los métodos de extracción suave, que no emplean una columna para aislar los ácidos nucleicos, resultan beneficiosos, ya que estos métodos retienen los fragmentos más pequeños del ácido nucleico en la preparación de ácidos nucleicos final.

30 Asimismo, es posible añadir diversos agentes a la reacción de PCR para facilitar la óptima hibridación, amplificación y detección. Entre ellos se incluyen sales, tampones, proteínas neutras, detergentes, etc. Pueden añadirse otros agentes para mejorar la eficiencia de la reacción, tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa, agentes anti-microbianos, etc.

35 Las longitudes de telómero se determinan evaluando la longitud de telómero promedio utilizando una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCR). Los procedimientos para PCR están muy extendidos y se conocen perfectamente. Se incuban un ácido nucleico diana en presencia de cebadores que se hibridan con el ácido nucleico diana. Cuando el ácido nucleico diana es bicatenario, las cadenas se desnaturalizan primero para generar una primera monocadena y una segunda monocadena para permitir la hibridación de los cebadores. Se pueden emplear  
40 diversas técnicas de desnaturalización incluyendo la temperatura, la concentración de sal, cambios de pH o una combinación de las técnicas de desnaturalización. Las condiciones se alteran para permitir que el primer cebador telomérico se hibride con una de las cadenas de ADN. Se utiliza una enzima ADN polimerasa para extender el cebador hibridado generando así una nueva copia del ácido nucleico diana. El bicatenario sintetizado se desnaturaliza y se permite que el segundo cebador se hibride con el primer cebador extendido. Se repite este ciclo  
45 de desnaturalización, hibridación y extensión varias veces hasta que se amplifica exponencialmente la secuencia entre los dos cebadores.

50 En la PCR cuantitativa (o en tiempo real), se une un colorante de unión a todos los ADN bicatenarios causando la fluorescencia del colorante. Un aumento del producto de ADN durante la reacción de PCR conduce a un aumento de la intensidad de fluorescencia y se mide en cada ciclo de la reacción de PCR. Esto permite la cuantificación de la concentración de ADN. La concentración relativa del ADN presente durante la fase exponencial de la reacción se determina trazando un gráfico del nivel de fluorescencia con respecto al número de ciclos de PCR en una escala semi-logarítmica. Se determina un umbral para la detección de la fluorescencia por encima del fondo. El ciclo en el que la fluorescencia de la muestra cruza el umbral se denomina umbral de ciclo Ct. Dado que la cantidad del ADN se duplica teóricamente cada ciclo durante la fase exponencial, se pueden calcular las cantidades relativas de ADN.  
55

60 El valor basal es los ciclos de PCR iniciales, en los que se producen pocos cambios en la señal de fluorescencia. El umbral es un nivel de  $\Delta Rn$  que se determina automáticamente mediante el software Sequence Detection Systems o se ajusta manualmente y se utiliza para la determinación Ct en ensayos en tiempo real. Se ajusta el nivel para que esté por encima del valor basal y suficientemente bajo para que esté dentro de la región de crecimiento exponencial de la curva de amplificación. El umbral es la línea cuya intersección con el trazado en gráfico de amplificación define el Ct. El ciclo umbral (Ct) es el número de ciclos fraccionado en el que la fluorescencia ha pasado el umbral. El ciclo umbral de la muestra se determina sustrayendo el ciclo umbral de una muestra de referencia del ciclo umbral de la reacción en cadena de la polimerasa telomérica ( $\Delta Ct_{muestra} = Ct_{telómero} - Ct_{referencia}$ ). La reacción en cadena de la polimerasa también se lleva a cabo con cebadores dirigidos a un gen de número de copia única como referencia para  
65 determinar el ciclo umbral para el gen de número de copia única. La diferencia del número de ciclos promedio del

gen de copia única de la reacción en cadena de la polimerasa telomérica determinará las longitudes de telómero ( $\Delta Ct = Ct_{\text{telómero}} - Ct_{\text{gen de copia única}}$ ).

5 El término “complementariedad” o “sustancialmente complementario” significa que las sondas o cebadores son suficientemente complementarias con la secuencia diana con la que se hibridan en condiciones de PCR normales.

Las desviaciones de una complementariedad perfecta se conciben siempre y cuando las desviaciones no sean suficientes como para excluir completamente la hibridación.

10 El tamaño del amplicón que se amplifica con los cebadores teloméricos primero y segundo puede variar. El tamaño puede oscilar entre 50 y 100 pares de base, entre 60 y 90 pares de base, entre 70 y 80 pares de base.

Aplicando los métodos expuestos en el presente documento se puede realizar la medición de longitudes relativas de telómero promedio por PCR cuantitativa con tejido FFPE.

15 Los siguientes ejemplos sirven como referencia y no son exhaustivos.

### Ejemplos

#### 20 Ejemplo 1

En este ejemplo se demuestra el rendimiento de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para determinar la longitud relativa de telómero de células o tejidos que están fijados en formalina y embebidos en parafina. Se obtuvieron cuatro líneas celulares de cáncer, OVCAR-5, MDA-MB-231, CCRF-CEM y A549 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Maryland, VA). Se adquirieron dos muestras de carcinoma de mama humano, T-645 y T-654 de Asterand (Partners in Human Tissue Research, Detroit, MI) o bien recién-congelados a 80 °C o bien como tejidos embebidos en parafina fijados en formalina. Se utilizaron las cuatro líneas como referencia para demostrar la relación de la longitud de telómero según TRF y la longitud relativa de telómero por ensayo FFPE qPCR TL.

30 Se sembraron las cuatro líneas celulares de cáncer humanas y se obtuvieron aglomerados de células. Se congeló una porción de los aglomerados de células a -80°C. Se prepararon aglomerados de células de referencia embebidas en parafina fijadas en formalina utilizando un kit HistoGel cat #R904012 (Richard Allen Scientific, filial de ThermoFisher, Kalamazoo, MI). Se cultivaron las células a 80-90 %n de confluencia. En primer lugar se mezclaron suavemente los aglomerados de células ( $10^6$ / aglomerado) en 200 – 500  $\mu$ l de HistoGel fundido a  $50 \pm 5^\circ\text{C}$ , a continuación, se enfriaron en hielo para su solidificación. Tras la solidificación, se centrifugaron rápidamente las muestras para eliminar el líquido residual. Se añadieron 10 ml de formalina al 4 % a los aglomerados gelificados y se fijaron los aglomerados de células durante 48 horas a temperatura ambiente. A continuación, se embebieron los aglomerados de células fijados utilizando técnicas de histología convencionales, en el Histo-Tec Laboratory Hayward, CA. En la Fig. 1 se muestra la tinción con hemoxilina y eosina de aglomerados de células 1.

#### Extracción de ADN

45 Se aisló ADN genómico de cuatro líneas celulares humanas FFPE (A549, MDA-MB-231, CCRF-CEM y Ovar5) con tres kit de extracción de ADN FFPE fabricados por BioChain, QIAGEN y TrimGene respectivamente. A continuación, se hicieron correr los ADN genómicos aislados sobre un gel de agarosa al 0,8 %. En la Fig. 2b se muestra que los fragmentos de ADN pequeños (<100 pb) fueron capturados únicamente con el kit de BioChain, pero no por los kits de QIAGEN y TrimGene. No se requirió la etapa de purificación en columna con el kit de BioChain, pero fue necesario con los otros dos kit. La purificación en columna podría causar la pérdida de fragmentos de ADN pequeños a lo largo del proceso de aislamiento de ADN.

55 Se aisló ADN genómico de las cuatro líneas de células de cáncer humano de referencia recién congeladas y procesadas FFPE. Se aisló también el ADN genómico de los dos tejidos recién congelados y procesados FFPE T654 y T-645. Se utilizó el kit de extracción de ADN de tejido FFPE (BioChain Institute, cat #: K5019100, Wayward CA) para extraer el ADN genómico de los aglomerados de células FFPE y las muestras de tejido. Se utilizó el kit de purificación de ADN genómico de Wizard, Cat#A1120 (Promega Corp, Madison, WI) para extraer el ADN genómico de las muestras de aglomerado de células y tejido frescos y recién congelados de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se mezcló el tejido en 180  $\mu$ l del tampón del kit y 20  $\mu$ l de proteinasa K. Se incubó la mezcla a 56 °C durante una hora, se aumentó la temperatura a 90 °C durante una hora y después se volvió a aumentar a 98 °C durante 10 minutos. Se centrifugó la mezcla a 14.000 rpm durante 2 minutos y se obtuvo el sobrenadante. Se determinó la concentración de ADN con un kit de ensayo de ADNds de Quant-iT Pico Green (Invitrogen, Cat #: P7589, Carlsbad, CA). Se ajustó la concentración del ADN en el sobrenadante a 1 ng/ $\mu$ l con  $\text{H}_2\text{O}$ .

## Ensayo TRF

Se evaluaron las longitudes de telómero de las cuatro líneas celulares de referencia y dos muestras de cáncer de mama. Aproximadamente 1-2 µg del ADN genómico de cada línea celular o tejido fue digerida por Hinf/Rsal durante 2 horas a 37 °C. Tras la digestión de ADN, se separaron los fragmentos de ADN genómico en un gel de agarosa al 0,8 % y se transfirieron a una membrana de nilón por transferencia. Se proporcionaron todos los reactivos de hibridación de membrana y de detección en el kit de ensayo de longitud de telómero TeloTAGGG (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania). Se hibridaron las membranas transferidas con una sonda de APN marcada con digoxigenina (DIG) específica para repeticiones teloméricas, seguido de incubación con una fosfatasa algalina de anticuerpo anti-DIG de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la fosfatasa alcalina utilizando un sustrato quimioluminiscente. Se calcularon las longitudes de telómero de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## Ensayo de PCR cuantitativa

Se llevaron a cabo todas las reacciones de PCR cuantitativa utilizando un Sistema de Detección de Secuencia de ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems, Carlsbad CA). Se llevaron a cabo dos PCR para cada muestra, una para determinar el valor de umbral de ciclos (Ct) y para la amplificación de telómero (T) y otro para determinar el valor Ct para la amplificación de un gen de copia única (fosfoproteína ribosómica ácida P, 36b4). Las secuencias de cebador para la amplificación de telómero fueron Telg 5'-ACA CTA AGG TTT GGG TTT GGG TTA GGG TTT GGG TTA GTG T (SEQ ID NO: 1) y Tele 5'-TGT TAG GTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA ACA (SEQ ID NO: 2) (Cawthon, 13 14 2009); y las de la amplificación de 36B4 fueron 36B4u:5'-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC (SEQ ID NO: 3) y 36B4d: 5'-CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A (SEQ ID NO: 4) (Cawthon, 2002).

Se llevó a cabo cada reacción de PCR para amplificación de telómero utilizando una muestra de 10 ng/10 µl (1 ng/µl) y una mezcla de PCR de 40 µl que contenía 1,25 ADN polimerasa U AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 150 nM de colorante fluorescente 6-ROX, 0,2 x tinte de ácido nucleico SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad CA), 50 mM KC1, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de desoxinucleosido trifosfatos (Applied Biosystems, Carlsbad CA), 5 mM ditiotritol, 1% sulfóxido de dimetilo y 15 mM Tris-HCl pH 8,0, y par de cebadores Telg y Telc (ambos en 900 mM). Es preferente la concentración de cebador mayor para el ADN telomérico cuando se utiliza ADN FFPE, ya que concentraciones de cebadores altas permiten varios sitios de hibridación.

Se amplificaron secuencias de telómero en tres etapas. Etapa 1: 95 °C durante 10 min para activar la ADN polimerasa AmpliTaq Gold; etapa 2: 5 ciclos de 15 s a 95 °C, 10 s a 50 °C para generar un producto de PCR que actuará como matriz para posteriores ciclos de amplificación. La temperatura de hibridación en la etapa 2 podría oscilar entre 49 °C y 58 °C. Etapa 3: 25 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C con adquisición de señal a 60 °C. El tiempo de ciclo total fue 55 minutos.

Se llevó a cabo la amplificación del gen 36B4 de copia única del siguiente modo. 10 minutos a 95 °C para activar la ADN polimerasa AmpliTag Gold seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 58 °C con adquisición de señal a 58 °C. Se llevó a cabo la amplificación de 36B4 utilizando 10 ng/10 µl de muestras (1 ng/µl), 40 µl de mezcla madre de SYBR Green (Applied Biosystems, Carlsbad CA) y el par de cebadores 36B4d (300 nM) y 36B4u (300 nM).

Se evaluaron varios kits de extracción de ADN FFPE disponibles en el mercado. Entre estos kits, el kit de extracción de ADN de tejido FFPE (Bio Chain Institute Inc. Hayward CA) proporcionó un método fiable para extraer el ADN genómico de muestras FFPE. (1) no fue necesaria la desparafinado de la muestra antes de la extracción de ADN. (2) La purificación no depende de la separación de tamaños en la columna. Se observan pequeños fragmentos de ADN normalmente en las muestras de FFPE y se pueden perder en la purificación de columna. (3) Se puede invertir parcialmente la reticulación del ADN calentando ADN en una solución tamponada durante períodos de tiempo prolongados. (4) No se produce una interferencia detectable con las reacciones de PCR por el tampón de extracción, durante hasta 20 % de volúmenes de reacción de PCR en total.

En la Fig. 2 a se muestran ejemplos de ADN genómicos aislados de muestras FFPE o recién congeladas. La mayoría de los ADN de las muestras FFPE son relativamente cortas, en el intervalo de tamaño de 50 pb - 2 kb. La Fig. 2b muestra como el ADN extraído con otros kits no retiene los fragmentos de ADN pequeños. Se puede medir con éxito la longitud de telómero mediante ensayo FFPE qPCR TL utilizando muestras de sección de tejido FFPE de tan solo 16 mm<sup>2</sup> (espesor 10 µm) en un portaobjetos (Fig. 3). Se correlacionaron los rendimientos de ADN y el tamaño de la sección de tejido utilizada (Fig. 4).

## Amplificación por PCR

Se modificó el número de ciclos de la etapa 2 a 5 ciclos para obtener un valor  $\Delta Ct$  apropiado ( $\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{telómero}} - Ct_{\text{referencia}}$ ) cuando se utilizaron 10 ng de ADN en cada reacción de PCR. 10 ng -20 ng de ADN por reacción tuvieron una eficacia de PCR de >94 % en los estudios de reproducibilidad. El número de ciclos para la PCR de gen de copia única necesita ser de nueve ciclos más que para la PCR de telómero para producir un producto de PCR de gen de copia única suficiente. Las diferencias del número de ciclos promedio de gen de copia única y telómero ( $Ct_{36B4} - Ct$

telómero o  $\Delta Ct$ ) entre las cuatro líneas celulares oscilaron entre -8,93 y -11,17, que corresponde a longitudes de telómero entre 2,0 y 8,7 kb en ensayo TRF. Los coeficientes de inter-ensayo de  $\Delta Ct$  fueron 1,48 %, 1,34 %, 1,25 % y 1,49 % para las cuatro líneas celulares de referencia.

5 Se evaluó la reproducibilidad de la relación T/S relativa en tres procesos independientes. Se sometieron a ensayo tres submuestras de ADN, ocho submuestras de cada línea celular, por triplicado, en tres días diferentes. En la Figura 6 se muestra una fuerte correlación entre el promedio de relaciones T/S determinadas con los procesos primero y segundo y tercero,  $R^2 = 0,95$  y  $P < 0,0001$  con 95 % de confianza. La pendiente de la línea de regresión lineal en los datos fue próxima a la unidad y el intercepto y próximo a cero. El promedio del coeficiente de variación de inter-ensayo de la relación T/S fue 15 %. El coeficiente de variación de inter-ensayo de la pendiente fue 13 %.

15 Se evaluó la resolución del ensayo mediante prueba T múltiple (comparación múltiple de Bonferroni) a partir de los resultados los procesos de PCR de tres días diferentes. A excepción de la diferencia entre Ovar5 y MDA-MB-231 ( $P > 0,05$ ), la diferencia de la relación T/S entre dos líneas celulares cualquiera y dos tumores fue muy significativa ( $P < 0,001$ ) en 95 % de nivel de confianza. Dado que la diferencia de longitud de telómero entre Ovar-5 y MDA-MB-231 es  $\leq 1$  kb, según el ensayo TRF, esto indica que la resolución del ensayo para la longitud de telómero media es aproximadamente 1 kb (Fig.5).

#### 20 Correlación entre TRF medio y relación T/S relativa

Utilizando este método de amplificación qPCR modificado, los autores de la invención demuestran que se pueden medir cuantitativamente las longitudes de telómeros en muestras de FFPE según las relaciones T/S. Se correlacionan las longitudes de telómero medidas en 4 líneas celulares de tumor de referencia FFPE, así como dos tumores de mama utilizando el protocolo con las longitudes de telómero medidas mediante ensayo TRF en el ADN genómico recién aislado o recién congelado de las mismas muestras ( $R^2 = 0,79$ ,  $p < 0,017$ ). Se observó una correlación más fuerte entre las cuatro líneas celulares de tumor ( $R^2 = 0,89$ ,  $p < 0,0006$ ) (Fig. 7 y 8).

30 La reticulación de ADN y la fragmentación en ADN genómico desde muestras FFPE constituye un reto único especialmente para amplificación de secuencias teloméricas repetitivas largas, al mismo tiempo que la amplificación de un fragmento de 76 pb de fosfoproteína P ribosómica ácida de gen de copia única (designado 36B4 en el presente documento) en la misma muestra, generalmente queda sin afectar. Para resolver este problema, se alteraron varias condiciones de PCR, es decir, la selección de los cebadores de PCR, la reacción de PCR, las condiciones de tampón y las condiciones del ciclo térmico para conseguir la meta de acortar el tamaño del amplicón de telómero y mejorar la eficiencia de la amplificación de PCR.

35 Cawthon publicó cebadores de secuencia teloméricos, es decir, Telg/Telc (2009). El par de cebadores Telg/Telc generará teóricamente un amplicón de -79 nt. Sin embargo, en las condiciones de PCR anteriores utilizando un tampón de mezcla maestra ABI en la reacción de PCR, se generó un abanico de tamaños de producto de PCR con un enriquecimiento moderado de productos 100-150 nt. Esto se resolvió cuando se cambiaron las condiciones térmicas del ciclo de PCR. Se amplificó un producto telomérico de 79 nucleótidos uniforme (Fig. 9). En las nuevas condiciones, el producto telomérico y el producto de gen de copia única 36B4 presentaron un tamaño de amplicón similar (Fig. 10), lo que reduce el efecto diferencial en la reticulación y la fragmentación del ADN en la amplificación por PCR. La eficiencia de amplificación de PCR de una reacción de telómero típica y la amplificación de gen de copia única es 96-100 % (Fig. 11).

#### 45 LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> Geron Corporation  
Wang, Hui  
Go, Ning F.  
Pilot, Zhu Zhen

<120> Medición de la longitud de telómero en muestras embebidas en parafina, fijadas en formalina (FFPE) por PCR cuantitativa

55 <130> 178/200PCT

<140> PCT/US2012/  
<141> 23-03-2012

60 <150> US 61/535.291  
<151> 15-09-2011

65 <150> US 61/468.491  
<151> 28-03-2011

ES 2 656 958 T3

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

5 <210> 1  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 1  
acactaaggt ttgggttgg gttggggtt gggtagtgt 40

<210> 2  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 2  
tgtaggtat ccctatccct atccctatcc ctatccctaa  
ca 42

20 <210> 3  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 3  
cagcaagtgg gaagtgtaa tcc 23

30 <210> 4  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 4  
cccattctat catcaacggg taaa 25

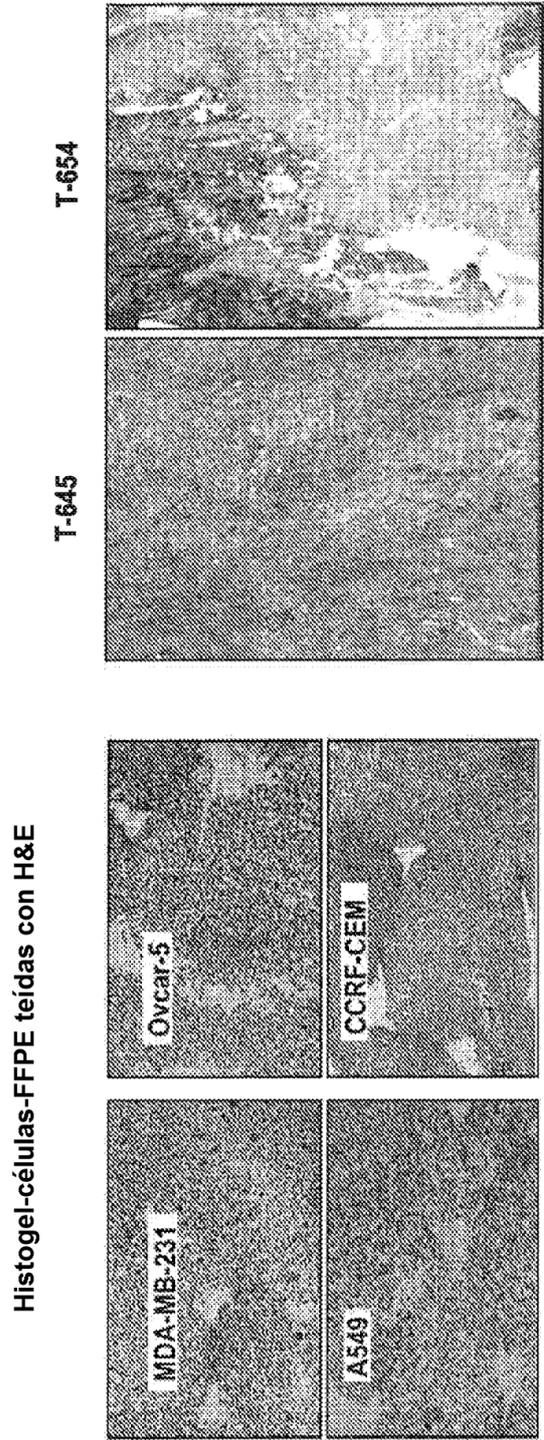
## REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la longitud de telómero en un tejido embebido en parafina fijado en formalina que comprende:
- 5 (a) extraer el ácido nucleico telomérico diana de un tejido embebido en parafina, fijado en formalina utilizando un método de extracción suave que no aísla los fragmentos de ADN en una columna y que retiene una mayoría de los fragmentos de ácido nucleico diana teloméricos que son de al menos 50 pb,
- 10 (b) combinar en una reacción en cadena de la polimerasa el ácido nucleico telomérico diana extraído de la etapa (a) que comprende sustancialmente una primera y una segunda cadena complementarias, un primer cebador telomérico en el que el primer cebador telomérico es capaz de hibridarse con la primera cadena del ácido nucleico telomérico diana y de ser extendido por ADN polimerasa para formar un cebador telomérico extendido, y un segundo cebador telomérico, en el que el segundo cebador telomérico es capaz de hibridarse con el primer cebador telomérico extendido y de ser extendido por ADN polimerasa pero no es capaz de hibridarse con el
- 15 ácido nucleico telomérico diana y que se extiende mediante ADN polimerasa;
- (c) calentar la reacción en cadena de la polimerasa a una temperatura suficiente para generar monocadenas de ácido nucleico y reducir la temperatura a una temperatura comprendida entre 49 °C y 60 °C para dejar que los cebadores se hibriden con sus dianas y se extiendan, y
- 20 (d) repetir la etapa (c) durante al menos 4 ciclos,
- (e) calentar la reacción en cadena de la polimerasa a una temperatura suficiente para generar una monocadena de ácidos nucleicos y reducir la temperatura de 55 °C a 65 °C para dar cabida a que se hibriden los cebadores con sus dianas y se extiendan durante otros 20 a 40 ciclos más,
- (f) identificar el ciclo de replicación en el que se pasa la señal de PCR umbral, y
- 25 (g) determinar la longitud de telómero media.
2. El método de la reivindicación 1 en el que la secuencia del primer cebador telomérico es Telg 5'-ACA CTA AGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTA GTG T (SEQ ID NO: 1) y la secuencia del segundo cebador telomérico es Telc 5'-TGT TAG GTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA ACA (SEQ ID NO: 2).
- 30 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que la etapa (c) se realiza durante 5 a 10 ciclos.
4. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que la etapa (c) se repite durante al menos 6 ciclos en la etapa (d).
- 35 5. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que la etapa (c) se repite durante al menos 5 ciclos en la etapa (d).
6. El método de la reivindicación 1 en el que se mide la longitud del telómero desde células de tumor fijadas en formalina.
- 40 7. Un método para medir la longitud de telómero en tejido embebido en parafina fijado en formalina según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que
- 45 en la etapa (b) el primer cebador telomérico es Telg 5'-ACA CTA AGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTA GTG T (SEQ ID NO: 1) y el segundo cebador telomérico es Telc 5'-TGT TAG GTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA ACA (SEQ ID NO: 2), en la etapa (c) la reacción de PCR comprende ADN polimerasa, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada desoxinucleosido trifosfato, 5 mM ditioneitol, 1 % sulfóxido de dimetilo y 15 mM Tris-HCl pH 8,0 y,
- 50 en la etapa (d), se repite la etapa (c) durante al menos 4 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 10 segundos a 50 °C y, en la etapa (e), se vuelve a repetir la etapa (c) durante 25 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 60 °C.
8. El método de la reivindicación 7 en el que se repite la etapa (c) durante al menos 5 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 10 segundos a 50 °C.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el amplicón telomérico generado por la extensión del primer y segundo cebador es de aproximadamente 50 a 100 nucleósidos.
- 55 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende además la combinación en una reacción en cadena de la polimerasa de un ácido nucleico de copia única diana obtenido desde un tejido embebido en parafina fijado en formalina que comprende una primera y una segunda cadena sustancialmente complementarias, un primer cebador de gen de copia única en el que el primer cebador de gen de copia única es capaz de hibridarse con la primera cadena del ácido nucleico del gen de copia única diana y de ser extendido por ADN polimerasa para formar un cebador de gen de copia única extendido, y un segundo cebador de gen de copia única en el que el segundo cebador de gen de copia única es capaz de hibridarse con el primer cebador de gen de copia única extendido y de ser extendido por ADN polimerasa, permitiendo que prosiga la reacción en cadena de la polimerasa en ciclos de desnaturalización y extensión, y la identificación del ciclo de replicación en el que se pasa la señal de PCR umbral y el uso de dicho valor y el valor en el que se pasa la señal de PCR umbral para la reacción en
- 60
- 65

cadena de la polimerasa de la secuencia del ácido nucleico telomérico diana para determinar la longitud promedio de telómero.

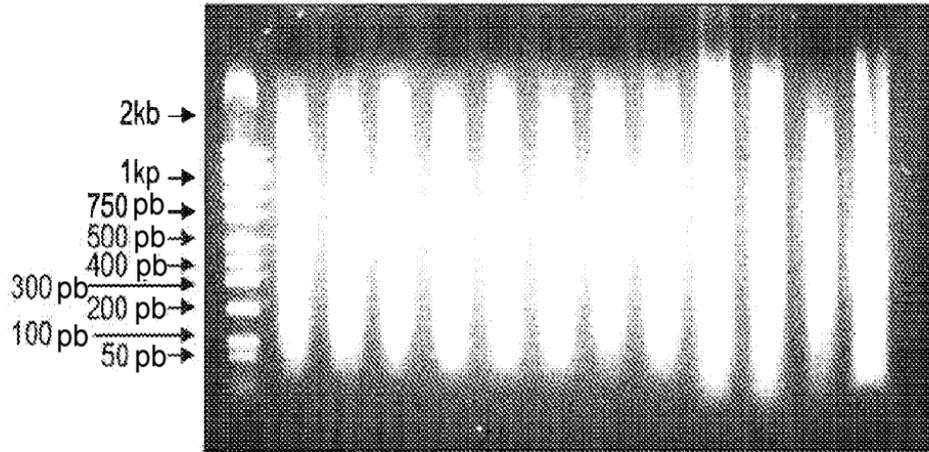
5 11. Un método para determinar la respuesta de un individuo a un tratamiento con inhibidor de telomerasa, un agente que daña el telómero o un activador de telomerasa, que comprende la medición de la longitud de telómero en un tejido embebido en parafina, fijado en formalina de acuerdo con un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

10 12. El método de la reivindicación 11 en el que el inhibidor de telomerasa es Imetelstat (GRN163L).



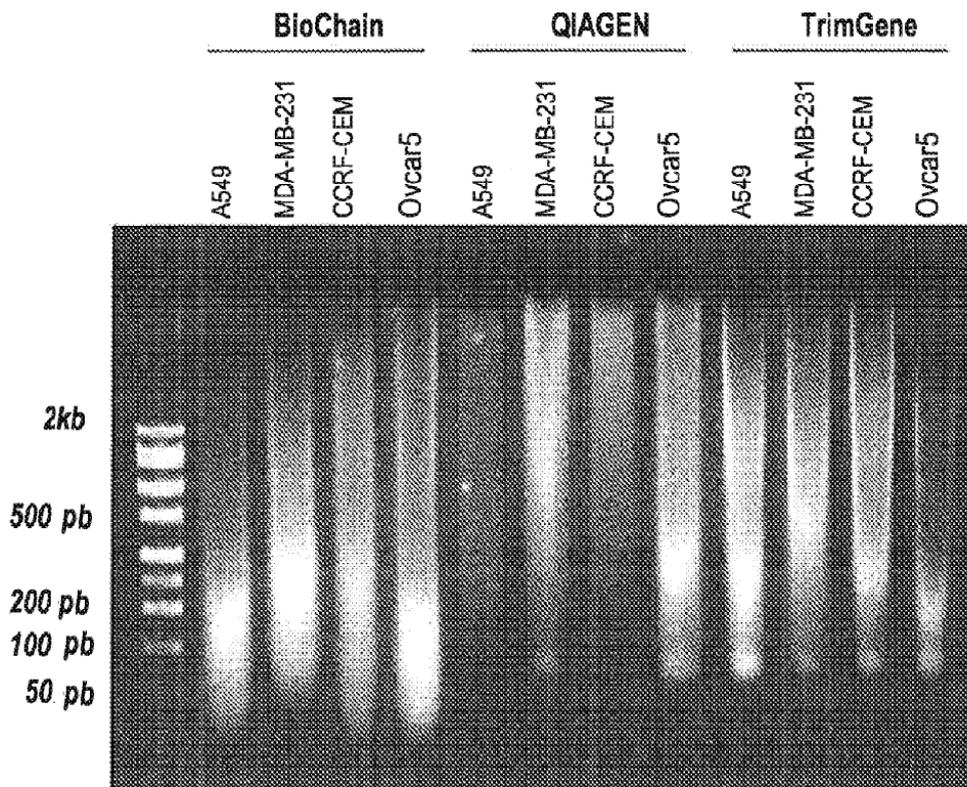
Tinción con hemolisina y eosina de cuatro líneas celulares de referencia y tumores de mama humanos (T645 y T-654)

**FIG. 1**



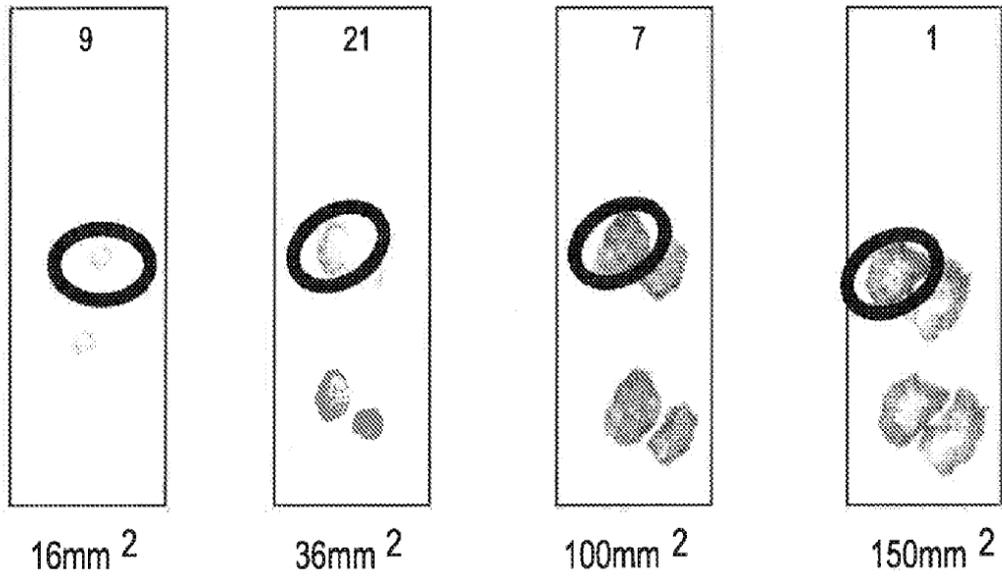
Gel de fragmentos de ADN tras la extracción de muestras de línea celular FFPE con kit BioChain. Intervalo de tamaño de fragmento de ADN de 50 pb a 2 kb.

**FIG. 2A**



Gel de fragmentos de ADN tras la extracción de muestras de línea celular FFPE con kit BioChain, kit Qiagen y kit TrimGene. El kit BioChain retiene los fragmentos de ADN de tamaño pequeño.

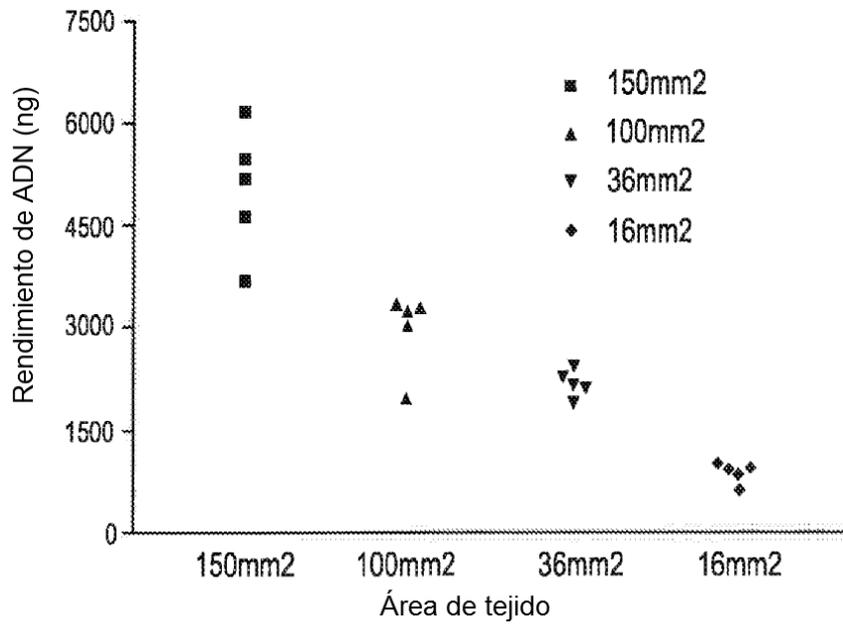
**FIG. 2B**



**FIG. 3A**

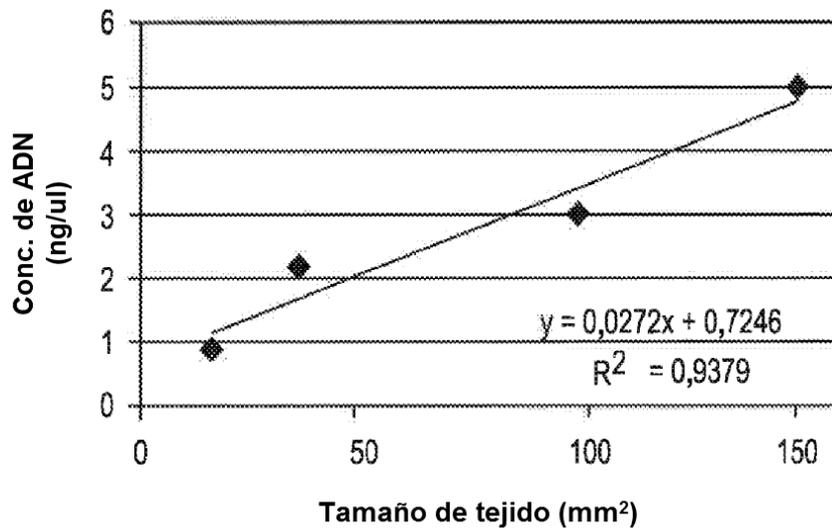
Amplificación Longitud de Telómero				
Portaobjetos	Ct1	Ct2	Ct3	Ave.
Portaobjetos-9	9,5	9,5	9,8	9,6
Portaobjetos-21	9,4	9,7	9,8	9,7
Portaobjetos-7	9,5	9,8	9,7	9,7
Portaobjetos-1	10,3	10,4	10,5	10,4
Amplificación de Gen de Célula Única				
Portaobjetos	Ct1	Ct2	Ct3	Ave.
Portaobjetos-9	23,3	23,3	23,4	23,3
Portaobjetos-21	22,4	22,4	22,6	22,4
Portaobjetos-7	22,8	22,9	22,9	22,8
Portaobjetos-1	22,4	22,3	22,4	22,4

**FIG. 3B**

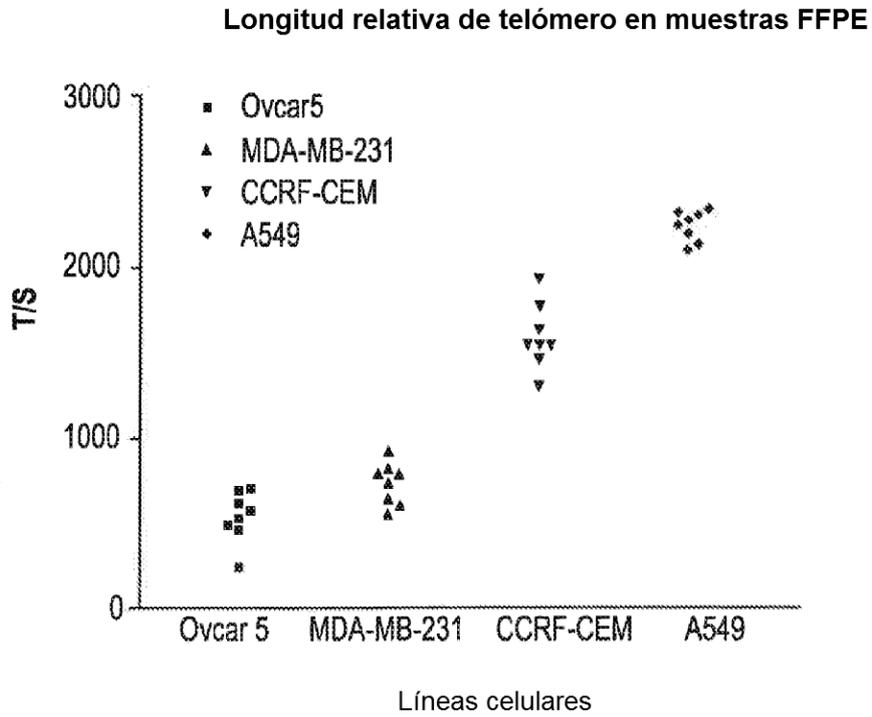


**FIG. 4A**

Tamaño de tejido frente a concentración de ADN

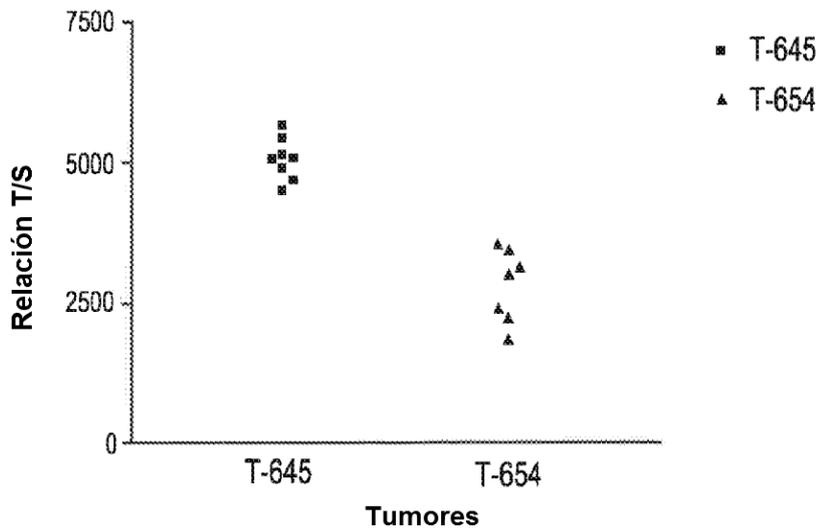


**FIG. 4B**

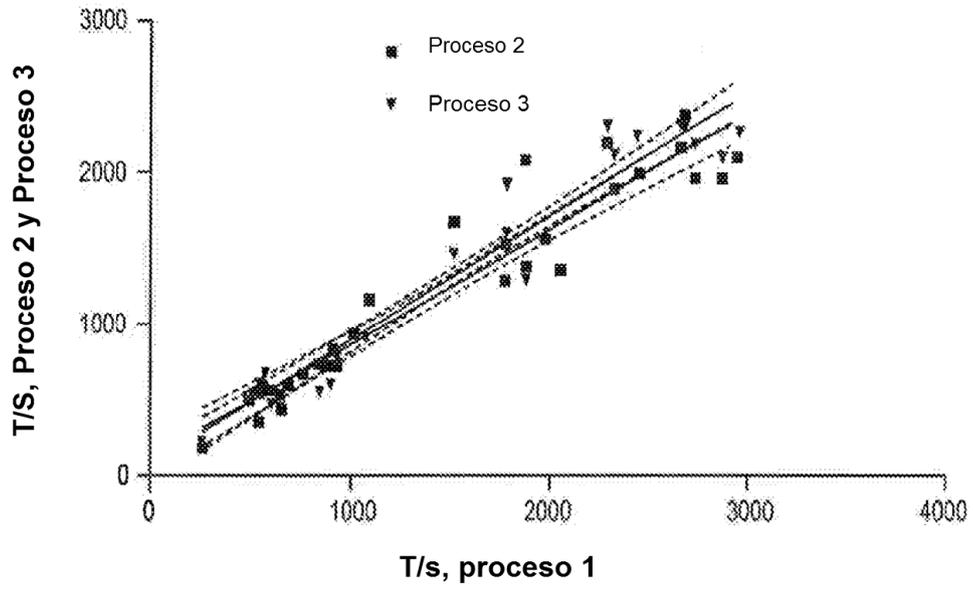


**FIG. 5A**

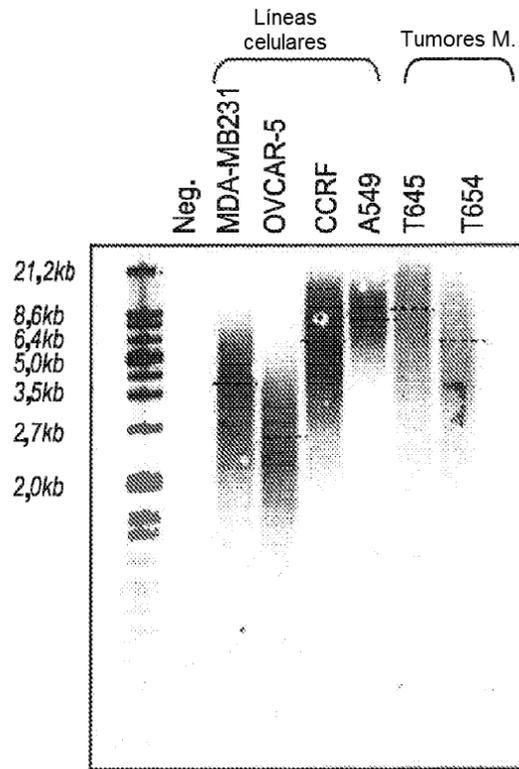
Longitud relativa de telómero en tumores humanos



**FIG. 5B**

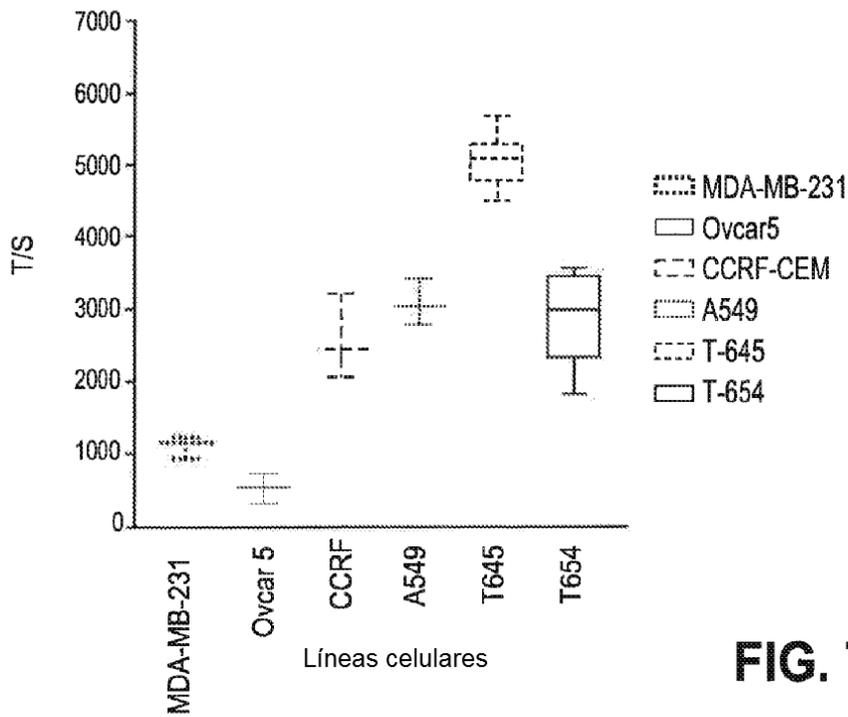


**FIG. 6**



**FIG. 7A**

Longitudes relativas de telómero en líneas celulares y tumores humanos



**FIG. 7B**

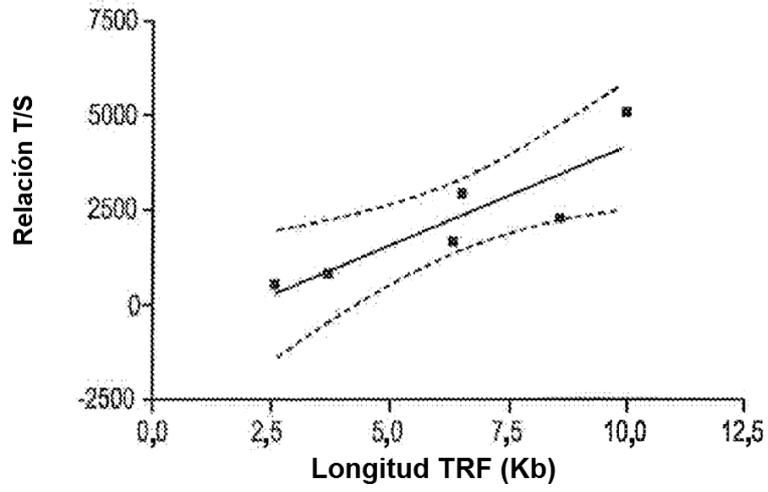


FIG. 8A

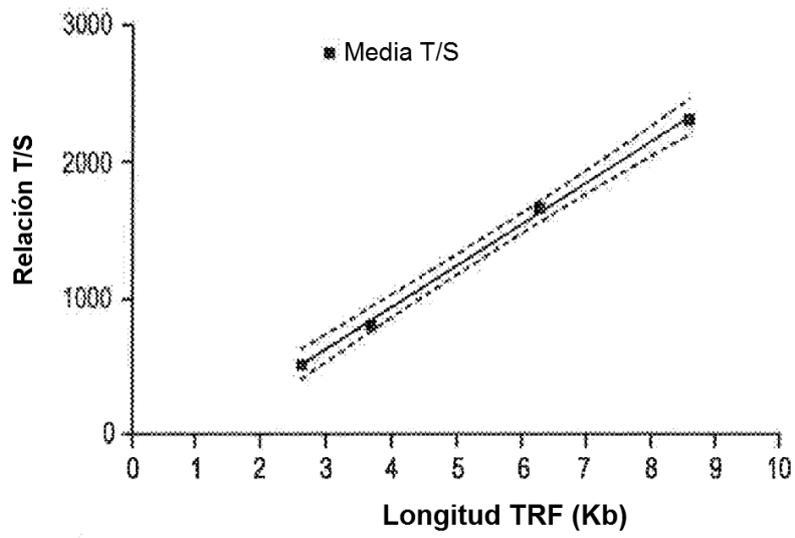


FIG. 8B

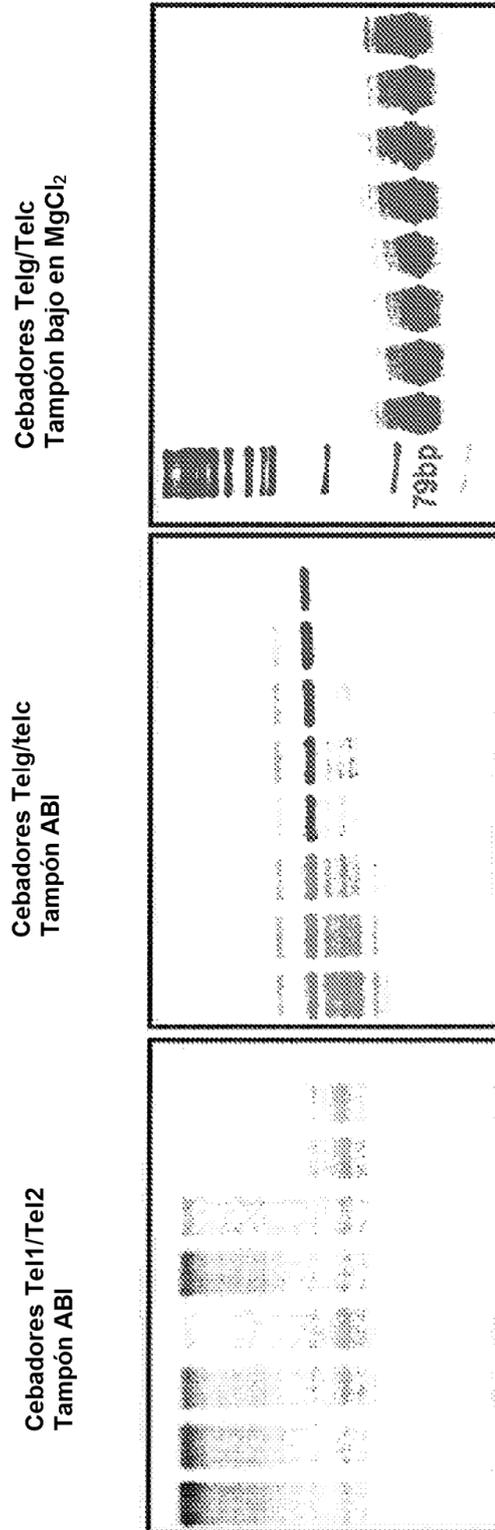
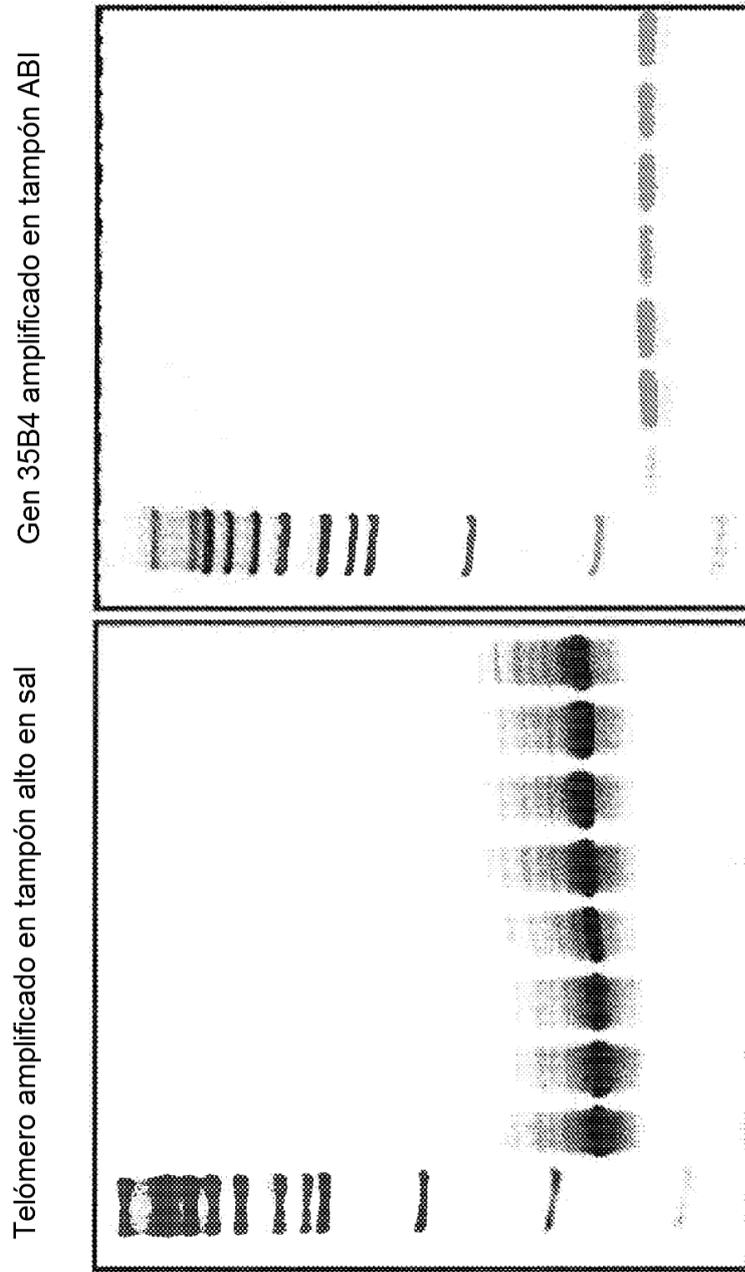


FIG. 9



**FIG. 10**

Telg/Telc-tampón alto contenido en sal (TL)

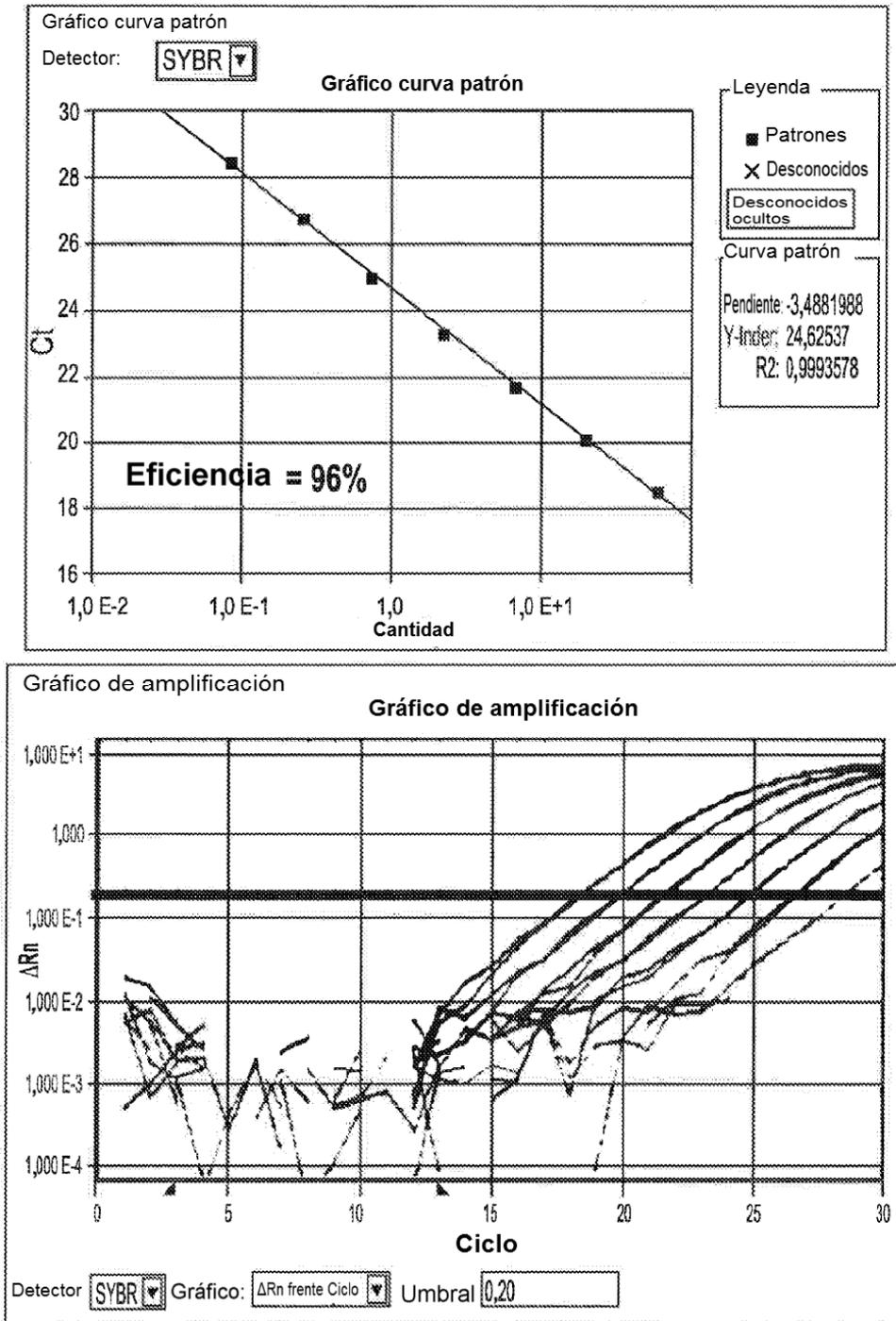
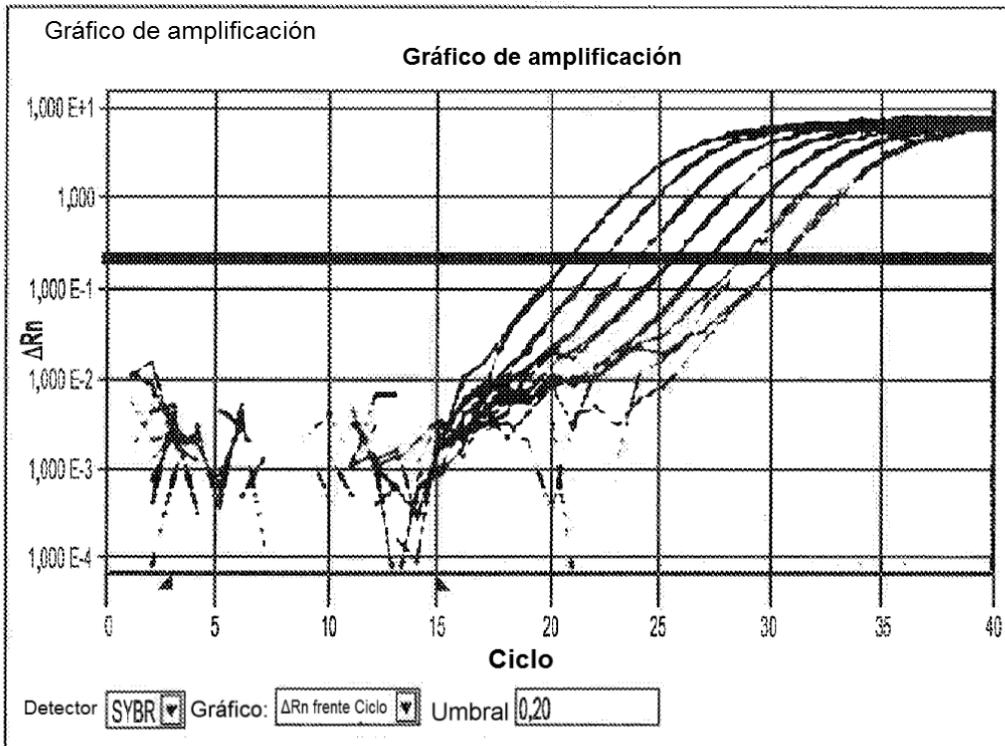
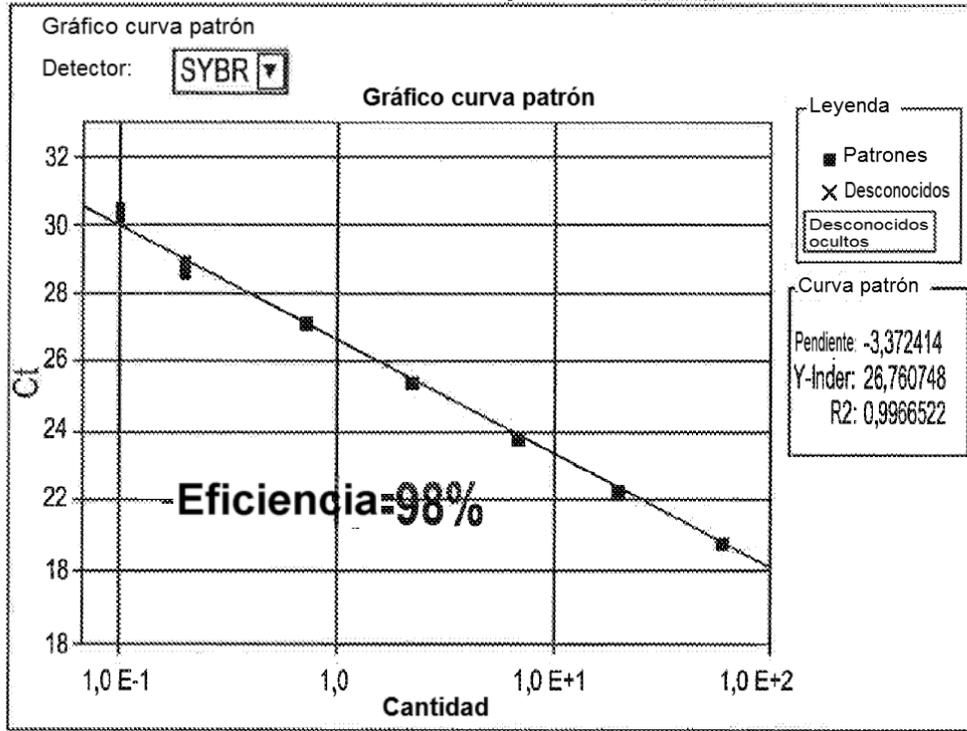


FIG. 11A

36Bd/36Bu - Tampón ABI (SCG)



**FIG. 11B**

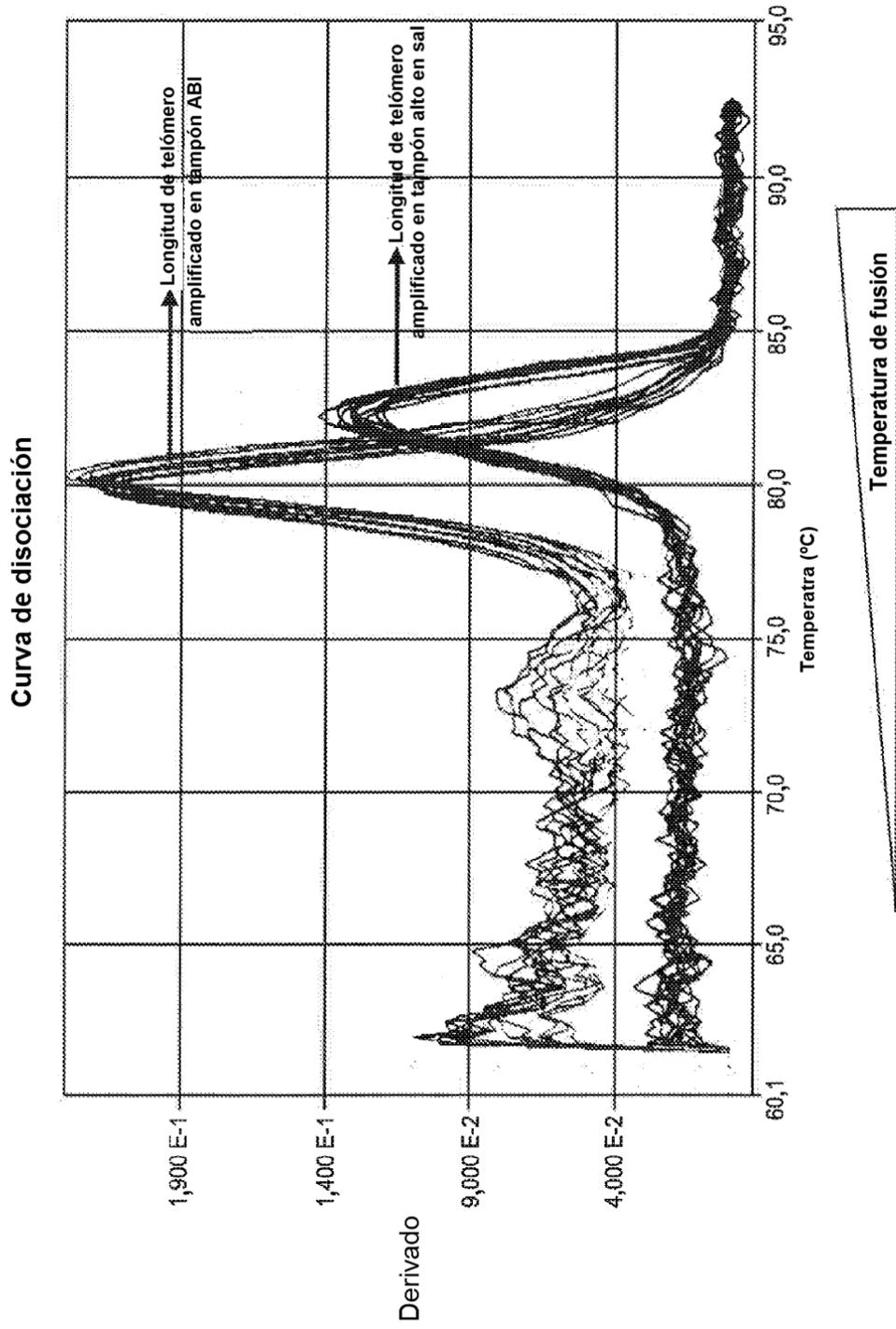


FIG. 12