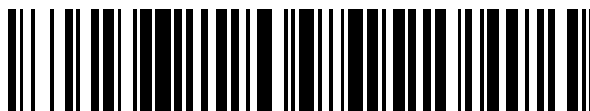


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 860**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/686 (2008.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2014** **PCT/US2014/039110**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014** **WO14190138**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2014** **E 14800611 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019** **EP 2999800**

54 Título: **Medidas de abundancia de telómeros cortos**

30 Prioridad:

22.05.2013 US 201361826484 P

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

26.05.2020

73 Titular/es:

TELOMERE DIAGNOSTICS INC. (100.0%)

**1455 Adams Drive
Menlo Park, CA 94025, US**

72 Inventor/es:

**HARLEY, CALVIN;
LIN, JUE y
HU, YAJING**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 762 860 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

Medidas de abundancia de telómeros cortos

5 Estado de la técnica

Las afirmaciones que se presentan en los antecedentes no pretenden necesariamente avalar las caracterizaciones de las referencias citadas.

- 10 Los telómeros, las puntas de los cromosomas eucariotas, protegen a los cromosomas contra la degradación de sus nucleótidos, la fusión entre los extremos y la recombinación. Los telómeros son estructuras en los extremos de los cromosomas que se caracterizan por la repetición de la secuencia de nucleótidos (5' TTAGGG-3')_n. Los telómeros se acortan a causa de la división celular normal y el acortamiento crítico de estos produce senescencia celular o apoptosis. Un nutrido cuerpo de estudios epidemiológicos y clínicos en seres humanos realizados durante la última década logró establecer una relación entre los telómeros cortos y los riesgos elevados de enfermedades relacionadas con la edad y la mortalidad por cualquier causa (Puterman, E. y E. Epel, Soc Personal Psychol Compass, 2012. 6(11) 807-825; Zhu, H., M. Belcher, y P. van der Harst, Clin Sci (Lond), 2011. 120(10) 427-40; y Fyhrquist, F. y O. Saijonmaa. Ann Med, 2012. 44, Sup. 1 S138-42). Factores genéticos, ambientales, de estilo de vida y de conducta afectan colectivamente la longitud de los telómeros. Así, la longitud de los telómeros se ha convertido en un indicador general del estado de salud o enfermedad y el riesgo de mortalidad.

- Aunque la longitud promedio de los telómeros se midió en casi todos los estudios clínicos publicados y ha demostrado ser útil para la estratificación del riesgo de mortalidad y enfermedad de los pacientes, estudios recientes en ratones también demuestran que la población de telómeros cortos es la señal que dispara la senescencia o apoptosis (Hemann, M.T., et al. Cell, 2001. 107(1) 67-77) y, por ende, el riesgo de enfermedad y mortalidad. En un estudio de Hemann et al, ratones de 6.^a generación con inactivación (knock-out) del ARN de telomerasa (mTR-/- G6) con telómeros cortos se cruzaron con ratones heterocigotos en el gen de la telomerasa (mTR+/-) con telómeros largos. El fenotipo de la descendencia con telomerasa inactivada reproduce el del padre mTR-/- a pesar de que la mitad de sus telómeros son largos, lo que parece indicar que la variable crítica para la viabilidad celular y la estabilidad cromosómica es la cantidad de telómeros cortos y no la longitud promedio de los telómeros. En un grupo de personas que tomaron un activador de la telomerasa derivado de productos naturales (TA-65®), se observó una reducción considerable en el porcentaje de telómeros cortos —menores a 3 o 4 kbp (medidos con una tecnología FISH cuantitativa; véase Canela, A., et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2007. 104(13) 5300-5)— en los leucocitos, pero no se observó ningún cambio en la longitud promedio de los telómeros (Harley, C.B., et al., Rejuvenation Res. 2011. 14(1) 45-56). Por ende, se espera que los cambios en el porcentaje de telómeros cortos provean una medición más sensible de los efectos de las intervenciones sobre los telómeros, sean farmacológicas o relacionadas con el estilo de vida. Otro estudio (Vera et al., "The Rate of Increase of Short Telomeres Predicts Longevity in Mammals", Cell Reports (2012), URL: [dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.023](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.023)) descubrió que "el ritmo de aumento en la abundancia de los telómeros cortos era un predictor de la longevidad".

- Se han desarrollado distintos métodos para la medición de la longitud de los telómeros en ADN genómico, incluidos los Southern blots (Kimura, M. et al., Nature Protocols, 2010, 5:1596 1607), la técnica Q-FISH (Rufer, N. et al., Nat. Biotechnol, 1998, 16:743-747), la técnica flow FISH (Baerlocher, G. M. et al., Cytometry, 2002, 47:89-99) y la qPCR (Cawthon, R. M., Nucleic. Acids Res., 2002, 30(10):e47). Todos estos métodos pueden usarse en entornos clínicos para supervisar el estado de salud y permitir a los médicos recetar intervención profiláctica o terapéutica a la medida de las necesidades de cada paciente.

- Para medir la población de telómeros cortos, la técnica de hibridación fluorescente in situ cuantitativa (Q-FISH) sobre dispersiones de células en metafase se ha usado para generar histogramas de la intensidad de señales teloméricas que representan la longitud de telómeros individuales (Poon, S.S., et al., Cytometry, 1999.36(4) 267-78). Este método tiene la limitación de que se requieren células vivas, los costos son elevados y el volumen de datos generados es bajo. Recientemente, la empresa Life Length (España) impulsó una modificación de la técnica Q-FISH que aumenta el volumen de datos generados (HTQ FISH, véase Canela, A., et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2007. 104(13) 5300-5) para medir el porcentaje de telómeros cortos. Por desgracia, a pesar de las afirmaciones, esta técnica no puede ser precisa con la tecnología actual debido a la agrupación de telómeros —particularmente los cortos— en puntos aislados (agrupación conocida como asociación telomérica; véase Paeschke, K., K.R. McDonald y V.A. Zakian. FEBS Lett, 2010. 584(17) 3760-72). Un hecho que torna más confuso este problema es que los telómeros cortos tienden a asociarse entre sí más frecuentemente que los telómeros largos. Además, las tecnologías FISH presentan el problema conocido de la hibridación inespecífica de la sonda a macromoléculas en células vivas o fijadas. Un método para medir el porcentaje de telómeros cortos que genere un gran volumen de datos, sea de bajo costo y no requiera células vivas sería mucho más fácil de emplear en el marco de estudios epidemiológicos y clínicos y tendría un desempeño analítico muy superior a la técnica Q-FISH.

La patente estadounidense n.º 5 741 677 (Kozlowski et al.) refiere a métodos para medir la longitud de los telómeros. Uno de estos métodos involucra poner al telómero en contacto con una secuencia de enlace en condiciones en las que dicha secuencia de enlace se liga o forma otros enlaces covalentes con el extremo 3' del telómero. Las secuencias teloméricas se amplifican mediante PCR de largo alcance con un primer cebador específico para la secuencia del enlace y un segundo cebador específico para una región subtelomérica del cromosoma. Otro método involucra preparar extractos de ADN de células, incubar el extracto con una sonda oligonucleotídica complementaria a una secuencia telomérica repetitiva y determinar la cantidad de sonda unida como medida de la longitud de los telómeros. Además, se describe un método para medir la longitud de los telómeros mediante la unión del ADN genómico a una fase sólida y la hibridación del ADN unido con una sonda marcada.

La patente estadounidense n.º 2004/0265815 (Baird et al.) refiere a un método para medir la longitud de los telómeros. El documento describe los siguientes pasos para detectar la longitud de una población de telómeros: a) aparear el extremo 3' de un oligonucleótido de hebra simple (en lo sucesivo, un telorette) a una saliente (overhang) del telómero que comprende la hebra con alto contenido de G del telómero (que comprende las secuencias repetitivas TTAGGG) y unir covalentemente el telorette al extremo 5' de la hebra telomérica con alto contenido de C (que tiene las secuencias repetitivas CCCTAA), b) amplificar el producto de ligación formado en el paso (a) para formar un producto de extensión del cebador; y (c) detectar la longitud de el/los producto(s) de extensión del cebador del paso (b) (véase también Baird, D.M., et al., *Nat Genet.*, 2003, 33(2):203-7; y Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D.; *Nat Genet.*, 2003, 33(2):203-7. Publicación en línea: 21 de enero de 2003. PMID: 12539050).

La patente estadounidense n.º 6 514 693 (Lansdorp) refiere a un método para detectar múltiples copias de una secuencia repetitiva en una molécula de ácidos nucleicos en cromosomas, células o secciones de tejido morfológicamente intactos, que comprende: (a) tratar la molécula de ácidos nucleicos con una sonda de APN que hibrida con una secuencia repetitiva de la molécula de ácidos nucleicos y que está marcada con una sustancia detectable, en condiciones desnaturalizantes usando un agente desnaturalizante, lo que permite que la sonda hibride in situ a la secuencia repetitiva de la molécula de ácidos nucleicos; y (b) identificar dicha sonda unida a la secuencia repetitiva de la molécula de ácidos nucleicos mediante la detección directa o indirecta de la sustancia detectable, detectando así las múltiples copias de la secuencia repetitiva en una molécula de ácidos nucleicos.

Los métodos para determinar la abundancia de los telómeros cortos incluyen los análisis de Southern blot, hibridación fluorescente in situ cuantitativa (Q-FISH) (Poon, S.S., et al., *Cytometry*, 1999, 36(4):267-78) y una versión modificada de la técnica Q-FISH que genera altos volúmenes de datos (HT-Q-FISH) (Canela, A., et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2007., 104(13):5300-5).

La patente estadounidense n.º 7 695 904 (Cawthon) describe métodos para amplificar ácidos nucleicos blanco usando cebadores de ácidos nucleicos diseñados para limitar los eventos de cebado no dependientes de los ácidos nucleicos blanco. El método permite amplificar y cuantificar la cantidad de unidades repetitivas en una región repetitiva, como la cantidad de unidades repetitivas teloméricas. La patente también refiere a la determinación de la longitud telomérica promedio de un organismo mediante un método de qPCR.

Así, a pesar de los avances en los materiales y métodos relativos a los telómeros, persiste la necesidad de contar con mejores materiales y métodos para determinar la abundancia de telómeros cortos en una población de cromosomas y para usar estas medidas para determinar medidas del estado de salud y del efecto de las intervenciones que aumenten o disminuyan la longitud de los telómeros y, por consiguiente, mejoren o empeoren el estado de salud, o bien disminuyan o aumenten el riesgo de enfermedades o muerte, respectivamente. La presente invención aborda estas necesidades, entre otras.

Objeto de la invención

En un aspecto, esta invención provee un método para crear un producto de extensión de ácidos nucleicos que comprende: i) hibridar un cebador de extensión a una secuencia repetitiva telomérica en una saliente 3' de ADN cromosómico de hebra doble, donde: (1) el ADN cromosómico de hebra doble tiene una región telomérica que comprende secuencias repetitivas teloméricas y una región subtelomérica que comprende secuencias subteloméricas; y (2) el cebador de extensión comprende: (A) una porción 3' que hibrida con una secuencia repetitiva telomérica en la saliente 3' en condiciones de apareamiento (B) una porción 5' que tiene una secuencia de anclaje que no hibrida con una secuencia repetitiva telomérica en la saliente 3' en las condiciones de apareamiento; y ii) realizar una reacción de extensión con desplazamiento de hebra de tiempo controlado para extender el cebador de extensión hacia la región subtelomérica del ADN cromosómico de hebra doble, donde el tiempo de la reacción de extensión se controla de manera de generar un producto de extensión que comprende tanto secuencias repetitivas teloméricas como secuencias subteloméricas solo del ADN cromosómico de hebra doble que tenga una región telomérica cuya longitud esté comprendida dentro de un rango predeterminado. En un aspecto, el ADN cromosómico de hebra doble comprende moléculas cromosómicas que tienen telómeros de diferentes longitudes. En otro aspecto, la secuencia de anclaje no hibrida en las condiciones de apareamiento a: (1) una secuencia en la región

subtelomérica del ADN cromosómico de hebra doble que tiene la saliente 3'; (2) una secuencia en la hebra G del ADN cromosómico a no más de 20 kb de la saliente 3'; (3) una secuencia en la hebra G del ADN cromosómico a no más de 50 kb o a no más de 20 kb de la saliente 3'; ni (4) una secuencia en el ADN cromosómico de hebra doble. En otro aspecto, el tiempo de la reacción de extensión se controla en no más de 30 minutos, no más de 10 minutos, no más de 5 minutos, no más de 4 minutos, no más de 3 minutos, no más de 2 minutos, no más de 1 minuto, no más de 30 segundos, no más de 20 segundos, no más de 10 segundos, no más de 5 segundos o no más de 2 segundos. Dado que el ritmo de la extensión del cebador puede variar entre alto (400 nucleótidos por segundo) y muy lento (p. ej., 50 nucleótidos por segundo), usar un rango amplio de tiempos de extensión permite evaluar una gran variedad de longitudes de telómeros (teóricamente entre aproximadamente 100 nucleótidos y varios miles de nucleótidos). En otro aspecto, el tiempo de la reacción de extensión se controla en al menos 30 minutos, al menos 10 minutos, al menos 5 minutos, al menos 4 minutos, al menos 3 minutos, al menos 2 minutos, al menos 1 minuto o al menos 30 segundos. En otro aspecto, el ADN cromosómico de hebra doble se provee a partir de una muestra sólida, fluida, semisólida o gaseosa. En otro aspecto, el ADN cromosómico se provee a partir de una muestra líquida seleccionada de entre sangre, saliva, orina, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo (LCR) o fluido de lavado bronqueoalveolar. En otro aspecto, el ADN cromosómico se provee a partir de una muestra sólida seleccionada de entre una muestra de pulmón, músculo o piel. En otro aspecto, el ADN cromosómico se provee a partir de una muestra semisólida que comprende médula ósea. En otro aspecto, el ADN cromosómico se provee a partir de una muestra gaseosa que comprende una muestra de aire espirado. En otro aspecto, el ADN cromosómico de hebra doble es ADN vertebrado, ADN mamífero o ADN humano. En otro aspecto, la porción 3' del cebador de extensión hibrida con una secuencia repetitiva telomérica humana. En otro aspecto, la porción 3' del cebador de extensión comprende la secuencia 5'-(CCCTAA)_n-3' o permutaciones de ella que mantienen el orden, donde n es al menos 1. En otro aspecto, n es al menos 2. En otro aspecto, la porción 5' del cebador de extensión comprende la secuencia: 5'-TGCTCGGCCGATCTGGCATC-3' [ID DE SEC. N.º 8]. En otro aspecto, el cebador de extensión comprende la secuencia: 5' TGCTCGGCCGATCTGGCATCCCTAAC-3' [ID DE SEC. N.º 7]. En otro aspecto, la reacción de extensión de tiempo controlado emplea una ADN polimerasa que posee actividad de desplazamiento de hebra, actividad exonucleasa o actividad de degradación de hebra. En otro aspecto, la ADN polimerasa se selecciona de entre la polimerasa T7 (p. ej., Sequenase), el fragmento de Klenow sin actividad exonucleasa de la ADN polimerasa I de E. coli, el fragmento grande de la ADN polimerasa Bst y la polimerasa Deep Vent® (exo-). En otro aspecto, la primera reacción se realiza con una helicasa, en combinación con una ADN polimerasa, o bien con una ADN polimerasa con actividad 5'-3' exonucleasa.

En otro aspecto, esta invención provee un método para amplificar secuencias repetitivas teloméricas y secuencias subteloméricas de un cromosoma que comprende: a) crear un producto de extensión de ácidos nucleicos mediante los pasos de: i) hibridar un cebador de extensión a una secuencia repetitiva telomérica en una saliente 3' de ADN cromosómico de hebra doble, donde: (1) el ADN cromosómico de hebra doble tiene una región telomérica que comprende secuencias repetitivas teloméricas y una región subtelomérica que comprende secuencias subteloméricas; y (2) el cebador de extensión comprende: (A) una porción 3' que hibrida con una secuencia repetitiva telomérica en la saliente 3' en condiciones de apareamiento (B) una porción 5' que tiene una secuencia de anclaje que no hibrida con una secuencia repetitiva telomérica en la saliente 3' en las condiciones de apareamiento; y ii) realizar una reacción de extensión con desplazamiento de hebra de tiempo controlado para extender el cebador de extensión hacia la región subtelomérica del ADN cromosómico de hebra doble, donde el tiempo de la reacción de extensión se controla de manera de generar un producto de extensión que comprende tanto secuencias repetitivas teloméricas como secuencias subteloméricas solo del ADN cromosómico de hebra doble que tenga una región telomérica cuya longitud esté comprendida dentro de un rango predeterminado; y b) amplificar mediante una reacción de PCR ulterior las secuencias del producto de extensión limitadas por una secuencia subtelomérica y la secuencia de anclaje, produciendo así un producto de amplificación de longitud limitada que comprende ácidos nucleicos con secuencias repetitivas teloméricas y secuencias subteloméricas. En un aspecto, las secuencias se amplifican con: (1) un primer cebador de amplificación que hibrida con una secuencia exclusiva de la región subtelomérica en el producto de extensión en condiciones de apareamiento; y (2) un segundo cebador de amplificación que hibrida con la secuencia de anclaje en las condiciones de apareamiento. En otro aspecto, el primer cebador de amplificación comprende una secuencia seleccionada de entre: 5' GATGGATCCTGAGGGTGAGGGTGAGGG-3' [ID DE SEC. N.º 2], 5' CGGGCCGGCTGAGGGTACCGCGA-3' [ID DE SEC. N.º 10] (cromosoma 1), 5' GCTAATGCACTCCCTCAATAC-3' [ID DE SEC. N.º 11] (cromosoma 5) y 5' CATTCTAATGCACACATGATACC-3' [ID DE SEC. N.º 12] (cromosoma 9). En otro aspecto, el primer cebador de amplificación comprende la secuencia 5' GATGGATCCTGAGGGTGAGGGTGAGGG-3' [ID DE SEC. N.º 2] y el segundo cebador comprende la secuencia 5'-TGCTCGGCCGATCTGGCATC-3' [ID DE SEC. N.º 8]. El rango de longitudes de los productos teloméricos amplificados puede determinarse mediante el control del tiempo de extensión en la reacción de PCR. En otro aspecto, el método comprende, además, coamplificar una secuencia de control. En otro aspecto, la secuencia de control comprende múltiples secuencias repetitivas no teloméricas. En otro aspecto, la secuencia de control se sintetiza in vitro o se produce in vivo (p. ej., en un clon bacteriano o fúngico).

En otro aspecto, esta invención provee un método para determinar la abundancia de telómeros cortos que comprende: a) proveer una muestra que comprende ADN cromosómico de hebra doble que comprende una saliente

3' obtenida de un sujeto; b) producir un producto de amplificación de longitud limitada a partir del ADN cromosómico de hebra doble usando un método para amplificar las secuencias repetitivas teloméricas y las secuencias subteloméricas de un cromosoma que se describen en esta invención (p. ej., uno de los anteriores); y c) determinar la abundancia de telómeros cortos a partir del producto de amplificación de longitud limitada. En un aspecto, el método comprende, además: d) comparar la abundancia de telómeros cortos con la abundancia total de telómeros de la muestra. En otro aspecto, los telómeros cortos son aquellos que tienen una longitud no mayor a aproximadamente 0,5 kb, a aproximadamente 1 kb, a aproximadamente 2 kb, a aproximadamente 3 kb, a aproximadamente 4 kb o a aproximadamente 5 kb. En otro aspecto, comparar comprende determinar la abundancia de telómeros cortos en función de la abundancia total de telómeros, p. ej., un cociente entre la abundancia de telómeros cortos y la abundancia total de telómeros. En otro aspecto, la determinación de la abundancia de telómeros cortos se realiza mediante qPCR. En otro aspecto, la qPCR se realiza con un primer cebador y un segundo cebador, (i) donde dicho primer cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha primera hebra y dicho segundo cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha segunda hebra, (ii) donde dichos cebadores hibridados son susceptibles de extensión al hibridar con sus respectivas hebras, y donde al menos un nucleótido de dicho primer cebador produce un desapareamiento de un par de bases interno entre dicho primer cebador y un nucleótido de dicha unidad repetitiva, donde dicho primer cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha primera hebra, (iii) donde dicho primer cebador también produce un desapareamiento con el nucleótido terminal 3' de dicho segundo cebador cuando el primer cebador y el segundo cebador hibridan entre sí, (iv) donde al menos un nucleótido de dicho segundo cebador produce un desapareamiento de un par de bases interno entre dicho segundo cebador y un nucleótido de dicha unidad repetitiva cuando dicho segundo cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha segunda hebra. En otro aspecto, determinar la abundancia de telómeros cortos comprende medir la longitud promedio de telómeros en la muestra mediante Southern blot, dot blot, slot blot, inmunoquímica, secuenciación de ácidos nucleicos o PCR digital. En otro aspecto, la abundancia de telómeros cortos es una medida de abundancia relativa. En otro aspecto, la abundancia total de telómeros se mide en relación a la abundancia de una secuencia de referencia genómica. En otro aspecto, la secuencia de referencia genómica comprende una secuencia nucleotídica de copia única de referencia (p. ej., la secuencia de la beta globulina humana) o la abundancia de ADN repetitivo no telomérico (p. ej., las repeticiones Alu o las repeticiones centroméricas).

En otro aspecto, esta divulgación provee un método que comprende: a) determinar la abundancia de telómeros corto en una muestra de un sujeto; y b) correlacionar la abundancia de telómeros cortos con una afección o enfermedad. En un aspecto, la medición de la abundancia de telómeros cortos se determina comparando la abundancia de telómeros cortos con la abundancia total de telómeros de la muestra. En otro aspecto, la abundancia de telómeros cortos se determina usando uno de los métodos que se describen en la presente (p. ej., uno de los anteriores). En otro aspecto, la afección o enfermedad es un riesgo de mortalidad. En otro aspecto, la abundancia de telómeros es una abundancia absoluta. En otro aspecto, la abundancia absoluta se mide como la longitud de las secuencias teloméricas. En otro aspecto, determinar la abundancia de telómeros comprende medir la longitud promedio de telómeros en la muestra mediante qPCR, Southern blot, dot blot, slot blot, inmunoquímica, secuenciación de ácidos nucleicos o PCR digital. En otro aspecto, la correlación de la afección o enfermedad se asocia con el Puntaje de estrés percibido del Cuestionario de estado de salud (véase, por ejemplo, Cohen, S; Kamarck T, y Mermelstein R (1983) J. Health Social Behav. 24(4) 385-396). En otro aspecto, el riesgo de una afección patológica es un riesgo de padecer una enfermedad (p. ej., una enfermedad cardiovascular, diabetes, cáncer, fibrosis hepática o depresión). En otro aspecto, la enfermedad es una enfermedad asociada con el envejecimiento. En otro aspecto, la enfermedad asociada con el envejecimiento es una enfermedad cardiovascular y donde una medida menor al promedio en una población se correlaciona con un mayor riesgo de padecer dicha enfermedad cardiovascular. En otro aspecto, el método comprende correlacionar una medida de la abundancia de telómeros en los dos o tres terciles inferiores de una población con un riesgo considerablemente mayor de padecer una enfermedad cardiovascular en comparación con una medida en el tercil superior de la población. En otro aspecto, el método comprende correlacionar la medida con una enfermedad telomérica. Una enfermedad telomérica puede comprender, sin carácter taxativo, la disqueratosis congénita, la fibrosis pulmonar, la anemia aplásica y la neumonía intersticial. En otro aspecto, el método comprende correlacionar la medida con la respuesta a uno o más fármacos. Por ejemplo, el método puede comprender correlacionar la medida con la respuesta a una estatina (donde la longitud promedio reducida de los telómeros de los glóbulos blancos normales de un individuo muestra una correlación positiva con la respuesta al fármaco) o con la respuesta adversa al (GRN163L, un fármaco oncológico) (donde la longitud reducida de los telómeros en los glóbulos blancos normales muestra una correlación muestra con efectos adversos como la trombocitopenia o la neutropenia). En otro aspecto, el método comprende correlacionar la medida con el avance de la enfermedad y el resultado del tratamiento en infecciones crónicas como las de VIH, VHC, VHB y CMV. En otro aspecto, el método comprende, además, informar la correlación al sujeto. En otro aspecto, el método comprende, además, dar al sujeto un diagnóstico o un pronóstico basados en la correlación. En otro aspecto, el método comprende, además, tratar al sujeto en base a la correlación.

En otro aspecto, esta divulgación provee un método para supervisar el estado de un sujeto que comprende: determinar medidas de la abundancia de telómeros cortos a partir de células de cada una de múltiples muestras del

sujeto tomadas a lo largo de un período de tiempo; determinar las diferencias entre las medidas; y correlacionar las diferencias con el avance de una enfermedad telomérica, donde la disminución de las medidas indica un avance de la enfermedad. En un aspecto, la medición de la abundancia de telómeros cortos se determina comparando la medida de la abundancia de telómeros cortos con una medida de la abundancia total de telómeros de la muestra.

En otro aspecto, esta divulgación provee un método que comprende: determinar el ritmo de cambio de una medida de la abundancia de telómeros cortos en células de múltiples muestras del sujeto tomadas en diferentes instantes de tiempo y correlacionar el ritmo de cambio con: (1) una medida del estado de salud; (2) un riesgo de padecer una afección patológica; (3) una enfermedad telomérica; o (4) la respuesta a uno o más fármacos. En un aspecto, la medición de la abundancia de telómeros cortos se determina comparando la medida de la abundancia de telómeros cortos con una medida de la abundancia total de telómeros de la muestra.

En otro aspecto, esta divulgación provee un kit que comprende: (1) un primer cebador de amplificación que comprende: (A) una porción 3' que hibrida con una secuencia repetitiva telomérica en una saliente 3' de ADN cromosómico de hebra doble en condiciones de apareamiento, y (B) una porción 5' con una secuencia de anclaje que no hibrida en las condiciones de apareamiento con una secuencia en la región telomérica o con una secuencia en la región subtelomérica del ADN cromosómico; y (2) un segundo cebador de amplificación que hibrida con una secuencia subtelomérica en condiciones de apareamiento. En un aspecto, el kit comprende, además: (3) un tercer cebador de amplificación que hibrida con un complemento de la secuencia de anclaje en condiciones de apareamiento. En otro aspecto, el kit comprende: (3) reactivos para realizar los pasos de hibridación, extensión, amplificación y cuantificación de la medición de telómeros cortos. En otro aspecto, el kit comprende, además: (3) una muestra de control y una muestra de referencia que comprenden ADN cromosómico con longitudes teloméricas conocidas, o bien oligonucleótidos sintéticos con repeticiones teloméricas con una masa conocida.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el esquema general de una determinación de telómeros cortos (STA).

La Figura 2 muestra una confirmación de la amplificación de telómeros cortos durante el desplazamiento de hebra con TeloTest, una prueba para medir la longitud promedio de los telómeros que emplea cebadores con bases desapareadas que hibridan a secuencias repetitivas teloméricas en una determinación de qPCR. Una determinación de tipo similar se describe en la patente estadounidense n.º 7 695 904 (Cawthon).

La Figura 3 muestra un análisis de Southern blot de los productos de desplazamiento de hebra. M: marcadores de peso molecular; Calle 1: ADN genómico total de la línea celular de cáncer de vejiga, UM-UC3, amplificado mediante el protocolo modificado de Análisis de longitud de elongación de telómeros individuales (STELA) (Baird et al., 2003); Calles 2-5: productos de PCR usando SUS y TeloAnchor como cebadores y los productos de desplazamiento de hebra como molde. Se indican los tiempos de reacción del desplazamiento de hebra (30 segundos, 1 minuto, 3 minutos y 5 minutos). Las longitudes de las hebras son: 30 s \sim 1 kb; 1 minuto \sim 2 kb; 3 minutos \sim 5 kb; 5 minutos \sim 8 kb.

La Figura 4 muestra una prueba de concepto de la cuantificación de telómeros cortos en muestras de ADN con diferentes longitudes promedio de los telómeros. UM-UC3 es una población celular con telómeros cortos en promedio, en tanto que UM-UC3/hTER es una población celular que tiene telómeros extendidos (elongados) debido a la sobreexpresión de la telomerasa (con hTER) pero que, por lo demás, es idéntica. Como se muestra, la abundancia relativa de los telómeros cortos es mucho mayor en la línea UM-UC3 que en la línea UM-UC3/hTER.

La Figura 5 es una tabla que compara la abundancia relativa de telómeros cortos en las líneas UM-UC3 y UM-UC3/hTER mediante la técnica de Southern blot (donde se muestra la intensidad relativa de la señal de los fragmentos de restricción terminales en el rango de 0,2 a 5 kbp) y mediante una determinación de telómeros cortos de esta invención, donde el porcentaje de telómeros cortos es el cociente entre las mediciones de abundancia de telómeros cortos y de telómeros totales. En ambos casos, hay aproximadamente 3 veces más telómeros cortos en la línea UM-UC3 que en la línea UM-UC3/hTER.

La Figura 6 muestra los pasos de una determinación de telómeros cortos que involucran tecnologías de grandes volúmenes de datos.

La Figura 7A y la Figura 7B muestran la extensión de tiempo controlado de un cebador en los cromosomas A, B y C, los cuales tienen telómeros de diferente longitud. La cromatina se representa mediante una línea de trazos. La secuencia subtelomérica única se indica con la leyenda "SUS". Los telómeros se representan con una línea continua. El producto de extensión se representa con la línea de trazos. La Figura 7B muestra la síntesis de la segunda hebra en los tres productos de extensión del cebador. En la Figura 7A, el tiempo de extensión del cebador se selecciona de manera que el cebador se extienda más allá de la región subtelomérica (con lo cual contendrá una

secuencia subtelomérica única o "SUS") en los cromosomas A y B, pero no en el C. En la Figura 7B, un cebador "SUS" que contiene una secuencia subtelomérica única puede hibridar con los productos de extensión A y B, pero no con el producto de extensión C, en el cual, debido al telómero largo en el cromosoma original, la extensión no alcanzó la región subtelomérica. Así, la síntesis de la segunda hebra puede proceder a partir del cebador SUS unido a los productos de extensión A y B, pero no el C. La segunda hebra se representa con una línea continua. Este producto, entonces, representa una fracción de "telómeros cortos" del ADN cromosómico original.

Descripción detallada de la invención

10 Definiciones

Debe entenderse que la terminología usada en la presente es únicamente para describir aspectos particulares y no pretende limitar el alcance de la presente.

- 15 En la especificación y las reivindicaciones, el término "comprende" puede incluir los aspectos "consiste en" y "consiste esencialmente en".

En la presente, los compuestos, incluidos los compuestos orgánicos, pueden denotarse mediante nombres comunes o de acuerdo con las recomendaciones de nomenclatura IUPAC, IUBMB o CAS. A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el significado habitual que tendrían para una persona razonablemente versada en la rama de la técnica a la que pertenece esta invención. En esta especificación y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos que se describen aquí.

- 25 En la especificación y las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen a los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula", "un nucleótido" o "un cebador" incluyen las mezclas de dos o más de tales células, nucleótidos o cebadores, u otras similares.

30 En la presente, los rangos podrán expresarse como desde "aproximadamente" un valor particular y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa un rango de este modo, otro aspecto incluye el rango desde el primer valor particular y/o hasta el otro valor particular. Análogamente, cuando los valores se expresan como aproximaciones mediante el término "aproximadamente", se entenderá que el valor particular conforma otro aspecto. Asimismo, se entenderá que los extremos de cada uno de los rangos son significativos tanto en relación con el otro extremo como independientemente de él. También se entiende que en la presente se divulgan una serie de valores y que cada uno de los valores también se divulga como "aproximadamente" dicho valor particular además del valor en sí. Por ejemplo, si se divulga el valor "10", también se divulga "aproximadamente 10". También se entiende que se divulga cada unidad entre dos unidades particulares. Por ejemplo, si se divulgan los valores 10 y 15, también se divulgan 11, 12, 13 y 14.

40 En la presente, el término "aproximadamente" indica que la cantidad o el valor en cuestión pueden ser el valor designado u otro valor aproximadamente igual. En general, debe entenderse que, en la presente, esto corresponde al valor nominal indicado con un rango de variación de $\pm 10\%$, a menos que se indique o pueda inferirse lo contrario. El término pretende transmitir que valores similares promueven resultados o efectos equivalentes a los indicados en las reivindicaciones. Es decir, se entiende que las cantidades, los tamaños, las formulaciones, los parámetros y otras magnitudes o características no son ni precisan ser exactas, sino que pueden ser aproximadas y/o mayores o menores, según se desee, a causa de tolerancias, factores de conversión, redondeo, errores de medición y factores similares, y otros factores conocidos para la persona versada en la técnica. En general, una cantidad, un tamaño, una formulación, un parámetro u otra magnitud o característica es "aproximado" independientemente de que se identifique expresamente como tal o no. Se entiende que, cuando se antepone el término "aproximadamente" a un valor cuantitativo, el parámetro también incluye el valor cuantitativo específico, a menos que se indique expresamente lo contrario.

55 Las referencias en la especificación y las reivindicaciones a partes por peso de un elemento o componente particular en una composición denotan la relación de pesos entre el elemento o componente y cualquiera otros elementos o componentes en la composición o artículo de la que se expresa una parte por peso. Así, en un compuesto que contiene 2 partes por peso de un componente X y 5 partes por peso de un componente Y, X e Y están presentes en una proporción de pesos de 2:5, y están presentes en tal proporción independientemente de que el compuesto contenga otros componentes.

60 A menos que se especifique expresamente lo contrario, un porcentaje por peso (%p/p) se basa en el peso total de la formulación o composición en la que se incluye el componente.

En la presente, los términos “opcional” u “opcionalmente” indican que el evento o la circunstancia que se describe posteriormente puede o no ocurrir, y que la descripción incluye los casos en los que dicho evento o circunstancia ocurre y los casos en los que no ocurre.

- 5 En la presente, el término “cantidad efectiva” hace referencia a una cantidad que es suficiente para lograr la modificación que se pretende de una propiedad física, química o biológica de la composición o el método.

En la presente, el término “kit” significa una colección de al menos dos componentes que constituyen el kit. Juntos, los componentes constituyen una unidad funcional para un fin determinado. Los componentes individuales pueden
10 empacarse físicamente juntos o separados. Por ejemplo, un kit que comprende una instrucción para usar el kit puede o no incluir físicamente la instrucción con otros miembros componentes individuales. En su lugar, la instrucción podría suministrarse como un miembro componente por separado, sea en papel o en formato electrónico, que podría suministrarse en un dispositivo de memoria de lectura informática o descargarse de un sitio web en Internet, o como una presentación grabada.

15 En la presente, el término “instrucción(ones)” hace referencia a documentos que describen los materiales o las metodologías relevantes relativas a un kit. Estos materiales incluyen cualquier combinación de los siguientes: información general, lista de componentes e información sobre su disponibilidad (información de compra, etc.), protocolos abreviados o detallados para usar el kit, instrucciones de resolución de problemas, referencias, asistencia técnica y cualquier otro documento relacionado. Las instrucciones pueden suministrarse con el kit o como un
20 miembro componente por separado, sea en papel o en formato electrónico, que podría suministrarse en un dispositivo de memoria de lectura informática o descargarse de un sitio web en Internet, o como una presentación grabada. Las instrucciones pueden comprender uno o varios documentos y se pretende que incluyan las actualizaciones futuras.

25 En la presente, el término “sujeto” puede hacer referencia a un vertebrado, como un mamífero, un pez, un pájaro, un reptil o un anfibio. Así, el sujeto de los métodos divulgados en la presente puede ser un humano, un primate no humano, un caballo, un cerdo, un conejo, un perro, una oveja, una cabra, una vaca, un gato, un cobayo o un roedor. El término no denota una edad ni un sexo particulares. Así, se pretende cubrir a los sujetos adultos, los recién
30 nacidos y los fetos, sean de sexo masculino o femenino. En un aspecto, el sujeto es un mamífero. El término “paciente” hace referencia a un sujeto que padece una afección, una enfermedad o un trastorno. El término “paciente” incluye los sujetos humanos y veterinarios. En algunos aspectos de los métodos divulgados, el sujeto ha sido diagnosticado con una o más afecciones o enfermedades asociadas con una disfunción en la abundancia de telómeros cortos que requiere tratamiento.

35 En la presente, el término “tratamiento” hace referencia a la atención médica de un paciente con la intención de curar, atenuar, estabilizar o prevenir una enfermedad, una afección patológica o un trastorno. Este término incluye tanto el tratamiento activo (es decir, el tratamiento dirigido específicamente a mejorar una enfermedad, una afección patológica o un trastorno) como el tratamiento causal (es decir, el tratamiento que busca eliminar la causa de la
40 enfermedad, la afección patológica o el trastorno en cuestión). Además, el término incluye: el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para aliviar los síntomas en lugar de curar la enfermedad, la afección patológica o el trastorno en cuestión; el tratamiento preventivo, es decir, el tratamiento que busca minimizar o inhibir total o parcialmente el avance de la enfermedad, la afección patológica o el trastorno en cuestión; y el tratamiento de apoyo, es decir, el tratamiento que se emplea para complementar otro tratamiento específico que busca mejorar la
45 enfermedad, la afección patológica o el trastorno en cuestión. En varios aspectos, el término cubre cualquier tratamiento de un sujeto, incluido un mamífero (p. ej., un humano) e incluye: (i) prevenir que la enfermedad ocurra en un sujeto que puede tener predisposición a la enfermedad, pero todavía no tiene un diagnóstico que indique que la padece; (ii) inhibir la enfermedad, es decir, detener su avance; o (iii) combatir la enfermedad, es decir, provocar su remisión. En un aspecto, el sujeto es un mamífero como un primate y, en otro aspecto, el sujeto es un humano. El
50 término “sujeto” también incluye los animales domesticados (p. ej., perros, gatos, etc.), el ganado (p. ej., el ganado bovino, equino, porcino, ovino, caprino, etc.) y los animales de laboratorio (p. ej., ratones, conejos, ratas, cobayos, moscas de la fruta, etc.).

55 En la presente, los términos “prevenir” o “prevención” hacen referencia a impedir, evitar, obviar, frustrar, detener o dificultar algo, especialmente mediante acciones anticipadas. Se entiende que, siempre que se use uno de los términos “reducir”, “inhibir” o “prevenir”, también se divulga expresamente el uso de los otros dos términos, a menos que se indique específicamente lo contrario.

60 En la presente, los términos “administrar” o “administración” hacen referencia a cualquier método para proporcionar una preparación farmacéutica a un sujeto. Tales métodos son bien conocidos para la persona versada en la técnica e incluyen, sin carácter taxativo, la administración oral, la administración transdérmica, la administración por inhalación, la administración nasal, la administración tópica, la administración intravaginal, la administración oftálmica, la administración intraaural, la administración intracerebral, la administración rectal, la administración

sublingual, la administración bocal y la administración parenteral, incluidos los métodos por inyección, como la administración intravenosa, la administración intraarterial, la administración intramuscular y la administración subcutánea. La administración puede ser continua o intermitente. En varios aspectos, una preparación puede administrarse con fines terapéuticos, es decir, administrarse para tratar una enfermedad o afección existente. En
5 varios otros aspectos, una preparación puede administrarse con fines profilácticos, es decir, administrarse para prevenir una enfermedad o afección.

En la presente, el término “cantidad efectiva” hace referencia a una cantidad que es suficiente para lograr el resultado deseado o para tener un efecto sobre una afección no deseada. Por ejemplo, el término “cantidad
10 terapéuticamente efectiva” hace referencia a una cantidad que es suficiente para lograr el resultado terapéutico deseado o para tener un efecto sobre síntomas no deseados, pero, en general, no es suficiente para causar efectos secundarios adversos. La dosis terapéuticamente efectiva para un paciente en particular dependerá de una serie de factores, como: el trastorno tratado y la gravedad del trastorno; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento de administración; la vía de
15 administración; el ritmo de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidencia con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en la técnica médica. Por ejemplo, un enfoque bien conocido en la técnica es iniciar las dosis de un compuesto a valores menores que los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta alcanzar el efecto deseado. Si se desea, la dosis diaria efectiva puede dividirse en múltiples dosis a los fines
20 de su administración. Por consiguiente, las composiciones de dosis única pueden contener tales cantidades o submúltiplos de ellas para alcanzar la dosis diaria. La dosis puede ser ajustada por el médico individual en caso de contraindicaciones. La dosis puede variar y puede administrarse en una o más administraciones diarias durante uno o varios días. En la literatura hay orientación para la determinación de las dosis adecuadas para ciertas clases de productos farmacéuticos. En varios otros aspectos, una preparación puede administrarse en una “cantidad
25 profilácticamente efectiva”, es decir, una cantidad efectiva para prevenir una enfermedad o afección.

En la presente, el término “cebador de extensión” hace referencia a un oligonucleótido cebador que se usa para realizar el paso de la reacción de extensión de tiempo controlado, llevada a cabo por una ADN polimerasa. El
30 cebador de extensión puede comprender una porción 3' y una porción 5'. Por ejemplo, la porción 3' puede hibridar con una secuencia repetitiva telomérica en la saliente 3' en las condiciones de apareamiento, y una porción 5' puede tener una secuencia de anclaje que no hibrida con una secuencia repetitiva telomérica en la saliente 3' en las condiciones de apareamiento.

En la presente, el término “región telomérica” hace referencia al segmento de ADN en los extremos de un cromosoma que contiene secuencia repetitiva telomérica. En el caso de los vertebrados, puede tratarse de la
35 secuencia repetitiva (TTAGGG)_n en los extremos de los cromosomas.

En la presente, el término “región subtelomérica” hace referencia al segmento de ADN inmediatamente adyacente al telómero en los extremos centroméricos de los telómeros. Con frecuencia, la región subtelomérica contiene
40 repeticiones teloméricas degeneradas. En el caso de los humanos, puede hacer repeticiones de las secuencias TGAGGG y TCAGGG en la región subtelomérica.

En la presente, el término “reacción de extensión de tiempo controlado” hace referencia a una reacción enzimática llevada a cabo por una ADN polimerasa en la que el tamaño en nucleótidos del producto de la reacción —el producto
45 de extensión de tiempo controlado— es una función tanto de la tasa de extensión propia de la ADN polimerasa utilizada en la reacción como del tiempo de reacción.

En la presente, el término “secuencia de anclaje” hace referencia a un segmento de secuencia único dentro de un cebador que no está presente en el genoma molde que puede usarse en la reacción de PCR o no está presente a
50 menos de 20 kb del amplicón previsto. Por ejemplo, la porción 5' del cebador de extensión puede ser una secuencia de anclaje configurada para no hibridar en condiciones de apareamiento a una secuencia repetitiva telomérica en la hebra G a la que hibrida la porción 3' del cebador de extensión.

En la presente, el término “hebra G del ADN cromosómico” hace referencia a la hebra del telómero que tiene la saliente 3', e incluye la secuencia repetitiva telomérica 5'-TTAGGG-3'. Por ejemplo, el término “hebra G del ADN
55 cromosómico” puede hacer referencia a la hebra de ADN en un cromosoma que comprende la secuencia telomérica (TTAGGG)_n en humanos y otros vertebrados.

En la presente, el término “polimerasa” hace referencia a una enzima que cataliza la polimerización de nucleótidos. En general, la enzima inicia la síntesis en el extremo 3' del cebador unido a una secuencia molde de ácidos
60 nucleicos. El término “ADN polimerasa” hace referencia a la enzima que cataliza la polimerización de desoxirribonucleótidos. Las ADN polimerasas conocidas incluyen, a modo de ejemplo, la ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) (Lundberg et al., (1991) Gene 108:1), la ADN polimerasa I de *E. coli* (Lecomte y

Doubleday (1983) *Nucleic Acids Res.* 11:7505), la ADN polimerasa T7 (Nordstrom et al. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:3112), la ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth) (Myers y Gelfand (1991) *Biochemistry* 30:7661), la ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Stenesh y McGowan (1977) *Biochim Biophys Acta* 475:32), la ADN polimerasa de *Thermococcus litoralis* (Tli) (también conocida como ADN polimerasa Vent, Cariello et al. (1991) *Nucleic Acids Res* 19:4193), la ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma) (Díaz y Sabino (1998) *Braz J. Med. Res* 31:1239), y la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) (Chien et al., (1976) *J. Bacteriol* 127:1550). La actividad polimerasa de cualquiera de las enzimas anteriores puede determinarse con métodos bien conocidos en la técnica.

En la presente, la actividad ADN polimerasa "termoestable" hace referencia a la actividad ADN polimerasa que es relativamente estable ante el calor y funciona a altas temperaturas, por ejemplo, entre 45 y 100 °C, preferentemente entre 55 y 100 °C, entre 65 y 100 °C, entre 75 y 100 °C, entre 85 y 100 °C o entre 95 y 100 °C, en comparación, por ejemplo, con una forma no termoestable de ADN polimerasa.

La actividad de desplazamiento de hebra de una ADN polimerasa describe su capacidad para desplazar el ADN encontrado aguas abajo durante la síntesis. Por ejemplo, la actividad de desplazamiento de hebra de una ADN polimerasa puede hacer referencia a la capacidad de la polimerasa para separar una hebra doble de ADN en dos hebras simples. Algunos ejemplos de ADN polimerasas con actividad de desplazamiento de hebra son las holoenzimas o partes de replicasas de virus, procariotas, eucariotas o arqueas, las ADN polimerasas $\Phi 29$, la ADN polimerasa de Klenow exo- y la ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* designada como Bst exo-. "Exo-" indica que la enzima correspondiente no tiene actividad exonucleasa 5'-3'. Un ejemplo conocido de una ADN polimerasa $\Phi 29$ es la ADN polimerasa del bacteriófago $\Phi 29$. Otras ADN polimerasas adecuadas con actividad de desplazamiento de hebra útiles en los métodos de la presente invención son bien conocidas para la persona versada en la técnica, como una polimerasa T7 modificada (p. ej., Sequenase), el fragmento de Klenow sin actividad exonucleasa de la ADN polimerasa I de *E. coli*, el fragmento grande de la ADN polimerasa Bst y la polimerasa Deep Vent® (exo-).

Alternativamente, también se entenderán como ADN polimerasas con actividad de desplazamiento de hebra las ADN polimerasas sin actividad de desplazamiento de hebra, siempre que acompañen de un catalizador (p. ej., una proteína o una enzima) que permita separar una hebra doble de ADN o estabilizar una hebra simple de ADN. Estas proteínas incluyen, a modo de ejemplo, las helicasas, las proteínas SSB y las proteínas recombinantes, que pueden estar presentes como componentes de complejos enzimáticos mayores, como las replicasas. En este caso, una polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra se produce con componentes adicionales a la propia polimerasa. Las polimerasas con actividad de desplazamiento de hebra pueden ser termoestables o no termoestables.

En la presente, el término "primer" hace referencia a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador complementario a una hebra de ácidos nucleicos, por ejemplo, en presencia de cuatro nucleósidos trifosfato y un agente de extensión (p. ej., una ADN polimerasa o una transcriptasa inversa) en una solución tampón (buffer) adecuada y a una temperatura adecuada. Un cebador no necesariamente debe corresponder exactamente a la secuencia del ácido nucleico molde, pero debe ser suficientemente complementaria para hibridar con el molde. El diseño de cebadores adecuados para la amplificación de una secuencia blanco dada es bien conocido en la técnica y se describe en la literatura citada en la presente.

En la presente los términos "blanco", "secuencia blanco", "región blanco" y "ácido nucleico blanco" son sinónimos y hacen referencia a una región o subsecuencia de un ácido nucleico que debe amplificarse o detectarse.

En la presente, el término "hibridación" hace referencia a la formación de una estructura de hebra doble a partir de dos ácidos nucleicos de hebra simple por apareamiento de bases complementarias. La hibridación puede ocurrir entre hebras de ácidos nucleicos perfectamente complementarias o entre hebras de ácidos nucleicos "sustancialmente complementarias" que contienen regiones pequeñas con bases desapareadas. Las condiciones en las que solo hibridan las hebras de ácidos nucleicos perfectamente complementarias se denotan como "condiciones de hibridación estrictas" o "condiciones de hibridación con especificidad de secuencia". La formación de complejos de hebra doble de secuencias sustancialmente complementarias puede lograrse en condiciones de hibridación menos estrictas; el nivel de desapareamiento tolerado puede controlarse mediante un ajuste adecuado de las condiciones de hibridación. La persona versada en la técnica de las tecnologías de ácidos nucleicos puede determinar la estabilidad de un complejo de hebra doble empíricamente considerando una serie de variables, incluidas, por ejemplo, la longitud y composición de bases de los oligonucleótidos, la fuerza iónica y la incidencia de los pares de bases desapareados, todo ello de acuerdo con la orientación disponible en la técnica (véase, p. ej., Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning—A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.); y Wetmur (1991) *Critical Review in Biochem. and Mol. Biol.* 26 (3/4):227-259).

El término “reacción de amplificación” hace referencia a cualquier reacción química, incluida una reacción enzimática, que resulta en un aumento de la cantidad de copias de una secuencia molde de ácidos nucleicos o resulta en la transcripción de un ácido nucleico molde.

5 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que permite la amplificación exponencial de secuencias de ADN dentro de una molécula de ADN de hebra doble de mayor tamaño. La PCR involucra el uso de un par de cebadores complementarios a una secuencia definida en cada una de las hebras de ADN. Una ADN polimerasa extiende estos cebadores de manera que se realiza una copia de la secuencia designada. Luego de que se cree esta copia, los mismos cebadores se pueden usar nuevamente, no solo para hacer otra copia del ADN de
10 partida sino también para copiar la copia corta hecha en la primera ronda de síntesis. Esto da lugar a una amplificación logarítmica. Dado que es necesario aumentar la temperatura para separar las dos hebras del ADN de hebra doble en cada ronda del proceso de amplificación, un avance importante fue el descubrimiento de una ADN polimerasa termoestable (la polimerasa Taq) que se aisló de *Thermus aquaticus*, una bacteria que crece en estanques calientes. Gracias a ello, no es necesario agregar más polimerasa en cada ronda de amplificación. Luego
15 de varias rondas de amplificación (a menudo, aproximadamente 40), el producto de PCR se analiza en un gel de agarosa y es suficientemente abundante para detectarse mediante una tinción con bromuro de etidio.

Se entiende que la PCR en tiempo real, también conocida como PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), PCR cuantitativa (qPCR) o reacción en cadena de la polimerasa cinética, es una técnica de laboratorio basada en la PCR
20 que se emplea para amplificar y cuantificar simultáneamente una molécula de ADN blanco. La qPCR permite tanto la detección como la cuantificación (como un número absoluto de copias o como una cantidad relativa normalizada respecto al ADN de entrada u otros genes de normalización) de una secuencia específica en una muestra de ADN.

En la presente, se dice que un cebador es “específico” para una secuencia blanco si, al usarse en condiciones
25 suficientemente estrictas, el cebador hibrida principalmente solo con el ácido nucleico blanco. En general, el cebador es específico para la secuencia blanco si la estabilidad del complejo de hebra doble entre el cebador y el blanco es mayor a la estabilidad de los complejos de hebra doble formados entre el cebador y cualquier otra secuencia presente en la muestra. La persona versada en la técnica reconocerá que distintos factores, como las condiciones de sal, la composición nucleotídica del cebador y la ubicación de las bases desapareadas, afectan la especificidad
30 del cebador y que, en la mayoría de los casos, se requerirá una confirmación experimental de rutina de la especificidad del cebador. Pueden escogerse condiciones de hibridación en las que el cebador pueda formar complejos de hebra doble estables únicamente con la secuencia blanco. Así, el uso de cebadores específicos para el blanco en condiciones de amplificación suficientemente estrictas permite la amplificación específica de las secuencias blanco que contienen los sitios de unión al cebador. El uso de las condiciones de amplificación con
35 especificidad de secuencia permite la amplificación específica de las secuencias blanco que contienen los sitios de unión al cebador perfectamente complementarios.

En la presente, el término “complementaria” hace referencia a una molécula de ácidos nucleicos que puede formar uno o más puentes de hidrógeno con otra molécula de ácidos nucleicos mediante apareamiento de bases tradicional
40 de Crick y Watson o mediante tipos no tradicionales de apareamiento (p. ej. los puentes de hidrógeno de Hoogsteen o de Hoogsteen inversos) entre nucleósidos o nucleótidos complementarios.

Se entiende en la técnica que una molécula de ácidos nucleicos no debe ser necesariamente 100 % complementaria a una secuencia de nucleótidos blanco para hibridar con ella de forma específica. Es decir, dos moléculas de ácidos
45 nucleicos pueden no ser perfectamente complementarias, lo que se indica como un porcentaje de los residuos contiguos en una molécula de ácidos nucleicos que pueden formar puentes de hidrógeno con una segunda molécula de ácidos nucleicos. Por ejemplo, si una primera molécula de ácidos nucleicos tiene 10 nucleótidos y una segunda molécula de ácidos nucleicos tiene 10 nucleótidos, el apareamiento de 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos entre la primera molécula de ácidos nucleicos y la segunda representa una complementariedad de 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y
50 100 %, respectivamente. Las moléculas de ácidos nucleicos “perfectamente complementarias” son aquellas en las que todos los residuos contiguos de una primera molécula de ácidos nucleicos forman puentes de hidrógeno con la misma cantidad de residuos contiguos en una segunda molécula de ácidos nucleicos, donde las moléculas de ácidos nucleicos tienen la misma cantidad de nucleótidos (es decir, la misma longitud) o bien longitudes distintas.

55 En la presente, el término “amplificación no específica” hace referencia a la amplificación de secuencias de nucleótidos que no sean la secuencia blanco, lo que ocurre cuando los cebadores hibridan con secuencias distintas de la secuencia blanco, que luego sirven como sustrato para la extensión del cebador. La hibridación de un cebador a una secuencia distinta de la secuencia blanco se conoce como “hibridación no específica” y tiende a ocurrir especialmente antes condiciones de preamplificación con bajas temperaturas y condiciones menos estrictas.

60 En la presente, el término “dímero de cebadores” hace referencia a un producto de amplificación no específico e independiente del molde que presuntamente se debe a la extensión de un cebador donde otro cebador actúa como molde. Aunque los dímeros de cebadores generalmente parecen ser concatémicos de dos cebadores (es decir,

dímeros), también son posibles los concatémeros de más de dos cebadores. En la presente, el término “dímero de cebadores” se usa en forma general y pretende abarcar un producto de amplificación no específico independiente del molde.

- 5 En la presente, el término “mezcla de reacción” hace referencia a una solución que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción determinada. El término “mezcla de reacción de amplificación” hace referencia a una solución que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación. En general, esta mezcla contiene oligonucleótidos cebadores y una ADN polimerasa o ligasa en una solución tampón adecuada. Una “mezcla de reacción de PCR” generalmente contiene oligonucleótidos cebadores, una ADN polimerasa (en la mayoría de los casos, una ADN polimerasa termoestable), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) y un catión metálico divalente en una solución tampón adecuada. Una mezcla de reacción se dice completa si contiene todos los reactivos necesarios para permitir la reacción y se dice incompleta si contiene solo un subconjunto de los reactivos necesarios. La persona versada en la técnica entenderá que los componentes de la reacción se almacenan habitualmente como soluciones separadas, cada una de las cuales contiene un subconjunto de los componentes totales, por motivos de practicidad, para mejorar la estabilidad de almacenamiento o para permitir el ajuste específico en cada amplificación de las concentraciones de los componentes, y que los componentes de la reacción se combinan antes de la reacción para crear una mezcla de reacción completa. Asimismo, la persona versada en la técnica comprenderá que los componentes de la reacción se empaquetan por separado para la comercialización y que los kits comerciales útiles pueden contener cualquier subconjunto de los componentes de la reacción, lo que incluye los cebadores bloqueados de la divulgación.

1. Introducción

- Esta divulgación provee materiales y métodos para determinar medidas de abundancia de telómeros cortos en una población de cromosomas y para usar estas medidas para determinar medidas del estado de salud y del efecto de las intervenciones que aumenten o disminuyan la longitud de los telómeros y, por consiguiente, mejoren o empeoren el estado de salud, o bien disminuyan o aumenten el riesgo de enfermedades o muerte, respectivamente. Los métodos involucran producir una población de copias de fragmentos cromosómicos únicamente de los cromosomas con telómeros dentro de un rango de longitudes predefinido (p. ej., todos los telómeros hasta cierta longitud, p. ej., menores a aproximadamente 5 kbp). Esta determinación puede usarse para representar la abundancia relativa de telómeros cortos en un conjunto de muestras, o bien usarse conjuntamente con una medida de la abundancia total de telómeros para generar un porcentaje absoluto de telómeros cortos.

- En un aspecto, el método para medir la abundancia de productos teloméricos cortos incluye dos pasos. Un primer paso involucra generar productos de extensión a partir de un molde de ADN de hebra doble usando un cebador de extensión. El cebador de extensión tiene en su extremo 3' una secuencia complementaria a secuencias repetitivas teloméricas en la hebra G del telómero, y una secuencia “de anclaje” en su extremo 5'. De este modo, el cebador de extensión está adaptado para hibridar con una secuencia repetitiva telomérica en la saliente 3' de los cromosomas de una muestra, y utiliza una secuencia de anclaje 5' para cebar una reacción de PCR ulterior. Los productos de extensión se generan en una reacción de extensión de tiempo controlado. Debido a que es de tiempo controlado, la reacción de extensión puede configurarse para producir productos de extensión cuya longitud sea no mayor a cierto valor. Dado que los productos de extensión tienen longitud limitada, se extenderán hasta la región subtelomérica únicamente en los cromosomas que sean suficientemente cortos. Un segundo paso involucra amplificar, a partir de los productos de extensión, secuencias limitadas por una secuencia subtelomérica y la secuencia de anclaje.

- La longitud de los productos de extensión generados empleando tiempos de reacción definidos puede estimarse mediante, al menos, tres métodos diferentes: (a) la tasa de polimerización (R) de la enzima de desplazamiento de hebra multiplicada por el tiempo de extensión; (b) el análisis del tamaño de los productos de PCR en un gel Southern; y (c) el análisis del tamaño de la región TTAGGG pura por secuenciación. El método de secuenciación se ve limitado por la capacidad de secuenciar con precisión regiones extensas de ADN repetitivo.

- Dado que la reacción de extensión es de tiempo controlado, las secuencias subteloméricas solo estarán presentes en los productos de extensión de aquellos cromosomas en los que la distancia entre la ubicación en la saliente 3' con la que el cebador de extensión hibridó y la región subtelomérica esté dentro de un rango de longitud de extensión predeterminado. El rango de longitud de extensión predeterminado puede ser hasta una longitud cualquiera seleccionada por el especialista. Por ejemplo, el rango de longitudes puede ser una longitud no mayor a una longitud predeterminada. En ciertos aspectos, el rango de longitudes abarca la longitud de los telómeros cortos (p. ej., hasta 5 kb). En otros aspectos, el rango de longitudes es una longitud menor a una distancia predeterminada. Así, por ejemplo, en los cromosomas en los que la longitud del telómero no es mayor a la longitud de extensión definida (p. ej., en los cromosomas con telómeros cortos), la reacción de extensión de tiempo controlado extenderá el cebador hasta la región subtelomérica del cromosoma. En los cromosomas en los que la longitud del telómero es mayor que la longitud de extensión predeterminada (p. ej., en los cromosomas con telómeros largos la reacción de extensión de tiempo controlado no extenderá el cebador hasta la región subtelomérica del cromosoma y el producto

de extensión no tendrá las secuencias subteloméricas necesarias para el segundo paso de amplificación. Así, la población de productos de extensión puede controlarse para que incluya únicamente las secuencias teloméricas de los cromosomas con telómeros menores a cierto tamaño. Si el rango de longitudes es, por ejemplo, de 4 kb, los productos de extensión incluyen, por ejemplo, productos en los que los telómeros tienen 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, etc.

Cuando los productos de extensión se amplifican con un par de cebadores de amplificación adaptados para amplificar secuencias limitadas por una secuencia subtelomérica y la secuencia de anclaje, únicamente se amplifican los productos de extensión que contienen secuencias subteloméricas. Estos son los productos de extensión generados a partir de los cromosomas que tienen telómeros menores a la longitud de extensión definida, p. ej., los cromosomas con telómeros cortos. Así, el producto extendido no se amplifica a partir del total de las secuencias teloméricas de los cromosomas de la muestra, sino únicamente a partir de las secuencias teloméricas de aquellos cromosomas con telómeros de longitud no mayor a la longitud predefinida. En la presente, a veces se denota tal producto de amplificación como "producto de amplificación telomérico de longitud limitada" o, en función del contexto, "producto de amplificación telomérico corto". Al usar un tiempo de extensión limitado en este paso de amplificación por PCR, se enriquecen aún más los telómeros cortos. Así, este paso de PCR con tiempo de extensión limitado aumentará la especificidad de la determinación, es decir, su capacidad de amplificar únicamente la población de telómeros cortos.

En la presente, a veces se denota la cantidad o abundancia de secuencias teloméricas en un producto de amplificación telomérico de longitud limitada como "abundancia de telómeros de longitud limitada" o, en función del contexto, "abundancia de telómeros cortos". La abundancia de secuencias teloméricas en un producto de amplificación telomérico de longitud limitada puede medirse con cualquier método usado para determinar la abundancia de secuencias teloméricas en un producto de secuencias teloméricas totales.

Los métodos de esta divulgación parten de ADN de hebra doble (p. ej., cromosomas en su estado nativo). En cambio, los métodos que miden las secuencias teloméricas, particularmente los que emplean qPCR, pueden requerir una muestra de ácidos nucleicos de hebra simple o desnaturalizados.

2. Producto de amplificación telomérico de longitud limitada

2.1 Muestra

El ADN cromosómico en su estado nativo de hebra doble puede obtenerse a partir de una muestra sólida, líquida, semisólida o gaseosa que contenga ácidos nucleicos, por ejemplo: a partir de tejidos líquidos como sangre, saliva, orina, plasma, suero, LCR, fluido de lavado bronqueoalveolar; a partir de tejidos sólidos como pulmón, músculo o piel; a partir de tejidos semisólidos como médula ósea; y a partir de muestras gaseosas como el aire espirado. El organismo del que se obtiene el ADN cromosómico puede ser cualquier organismo con cromosomas lineales que tengan salientes 3'. El ADN cromosómico de hebra doble usado como molde puede obtenerse mediante cualquier método de purificación de ADN que dé como resultado ADN genómico de alto peso molecular (mayor a 20 kb), incluidos la extracción con fenol/cloroformo, el método del gradiente de cloruro de cesio y los kits comerciales que usan tecnología de unión a membranas de silicona, así como los métodos de precipitación de ADN mediada por detergentes. Algunos ejemplos de kits comerciales de purificación de ADN son los siguientes: Agencourt DNAdvance y Agencourt Genfind (Beckman Coulter), QIAamp kit (QIAGEN, Valencia, California), QIAamp blood kit (QIAGEN), QIAamp FFPE tissue kit (QIAGEN), AHPrep kit (QIAGEN), Puregene kit (QIAGEN), PureLink y GeneCatcher (Invitrogen), y Wizard (Promega).

Una muestra para usar en los métodos de esta divulgación puede ser cualquier muestra de ADN genómico con una saliente 3' de hebra simple. En ciertos aspectos, la muestra comprende ADN genómico de alto peso molecular (p. ej., mayor a 20 kb). Puede usarse cualquier método que dé como resultado ADN genómico de alto peso molecular.

En los cromosomas de hebra doble que poseen telómeros, la hebra simple de ADN que contiene un extremo 3' con la secuencia repetitiva telomérica (la "saliente 3'") se extiende más allá del extremo de la hebra simple apareada que tiene el extremo 5'. La hebra del telómero que tiene la saliente 3' se denota "hebra G" e incluye la secuencia repetitiva telomérica 5'-TTAGGG-3'. Las permutaciones que mantienen el orden son aquellas en las que no se altera el orden relativo de las letras, sino que se trata de la misma secuencia que comienza en otro punto, como las inversiones (p. ej., XYZ, YZX y ZXY en lugar de YXZ). Las permutaciones que mantienen el orden de la secuencia anterior incluyen las siguientes: 5'-TAGGGT-3', 5'-AGGGTT-3', 5'-GGGTTA-3', 5'-GGTTAG-3' y 5'-GTTAGG-3'. La hebra que tiene el extremo 5' se denota "hebra C" e incluye la secuencia repetitiva telomérica 5'-CCCTAA-3'.

La longitud de un telómero puede ser la distancia (p. ej., en kilobases) entre el extremo del cromosoma y la región subtelomérica. En las células de adultos humanos normales, los telómeros pueden variar desde menos de 1 kb hasta 12 kb o, en algunos casos, hasta más de 20 kb de longitud. Se sabe que la longitud de los telómeros varía entre un tipo celular y otro (Lin et al., J Immunol Methods, 2010, 31:352(1-2):71 -80). Por este motivo, los rangos de

longitudes útiles de la población de telómeros cortos pueden ser amplios en función de la utilidad clínica. Así, en algunos aspectos un telómero corto tiene una longitud de no más de aproximadamente 5 kb, no más de 4 kb, no más de 3 kb, no más de 2 kb, no más de 1 kb o no más de aproximadamente 0,5 kb. Los métodos de la divulgación pueden configurarse para detectar telómeros de hasta cada una de estas longitudes.

Los productos de telómeros cortos pueden generarse a partir de un único telómero, un único cromosoma, una población de cromosomas de una única célula o una población de cromosomas de múltiples células.

2.2 Creación del producto de extensión

En la reacción de extensión, un cebador se aparea con la saliente 3' del ADN cromosómico de hebra doble en condiciones de apareamiento. Las condiciones de apareamiento adecuadas son conocidas para la persona versada en la técnica, como las que se usan habitualmente para hibridar hebras de ácidos nucleicos para reacciones de extensión o PCR. Tales condiciones incluyen, sin carácter taxativo, incubar a 65 °C durante 10 min en un bloque calentador y, luego, enfriar hasta temperatura ambiente a lo largo de una hora. Otras condiciones pueden incluir incubar a una temperatura entre 37 °C y 65 °C durante 5 a 30 minutos y, luego, enfriar hasta temperatura ambiente a lo largo de una a tres horas.

2.2.1 Cebador de extensión

El cebador de extensión comprende una porción 3' y una porción 5'.

2.2.1.1 Porción 3'

La porción 3' tiene una secuencia adaptada para hibridar con una secuencia repetitiva telomérica en la hebra G de un telómero. La secuencia en la porción 3' puede ser complementaria a la repetición telomérica, o puede tener ciertas bases desapareadas como se explicó anteriormente, siempre que las bases desapareadas permitan la hibridación en las condiciones de apareamiento para la extensión del cebador. Por ejemplo, la porción 3' puede tener al menos 8 nucleótidos consecutivos de una secuencia repetitiva telomérica (la secuencia de la hebra C del telómero). Los nucleótidos consecutivos pueden estar en cualquier permutación de la secuencia repetitiva telomérica. En otros aspectos, la secuencia de la porción 3' puede tener al menos 9 nucleótidos consecutivos, al menos 10 nucleótidos consecutivos, al menos 11 nucleótidos consecutivos o al menos 12 nucleótidos consecutivos de una secuencia repetitiva telomérica. En otros aspectos, la secuencia de la porción 3' puede tener dos o más, tres o más, o cuatro o más unidades repetitivas teloméricas en cualquier permutación que mantenga el orden.

2.2.1.1 Porción 5'

La porción 5' del cebador de extensión (también conocido como "secuencia de anclaje") está configurada para no hibridar en condiciones de apareamiento a una secuencia repetitiva telomérica en la hebra G a la que hibrida la porción 3'. Preferentemente, la secuencia de anclaje no hibrida en condiciones de apareamiento con una secuencia en la región subtelomérica de la hebra G. La secuencia de anclaje también puede configurarse para no hibridar con ninguna secuencia de la hebra G blanco a menos de 10 kb, menos de 20 kb o menos de 50 kb del extremo de la saliente 3' de la hebra G, o con ninguna secuencia única del cromosoma blanco. La secuencia de anclaje puede configurarse de manera que su complemento no hibride con ninguna secuencia en la hebra C del cromosoma en la región telomérica o subtelomérica, o a menos de 10 kb, menos de 20 kb o menos de 50 kb del extremo de la hebra C del telómero. Por ejemplo, la secuencia de anclaje puede ser una secuencia única que no se encuentre en los cromosomas bajo estudio.

2.2.2 Reacción de extensión

Luego de aparear el cebador de extensión al ADN cromosómico, se realiza una reacción de extensión con una polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra y/o actividad exonucleasa. Las polimerasas con actividad de desplazamiento de hebra incluyen, sin carácter taxativo, la polimerasa T7 (p. ej., Sequenase), el fragmento de Klenow sin actividad exonucleasa de la ADN polimerasa I de E. coli, el fragmento grande de la ADN polimerasa Bst y la polimerasa Deep Vent® (exo-). También pueden usarse polimerasas con actividad exonucleasa 5'-3'.

La reacción de extensión es de tiempo controlado. Esto significa que la reacción de extensión se deja continuar durante un período de tiempo determinado. El tiempo se calibra para generar productos de extensión que tengan una longitud promedio no mayor a una longitud predeterminada. El tiempo usado para producir el producto de extensión con la enzima de desplazamiento de hebra puede determinarse empíricamente para las condiciones y los reactivos seleccionados de manera de generar productos de extensión de la longitud predeterminada. Las tasas de extensión de distintas polimerasas útiles en la presente invención se han determinado con anterior y las tasas de extensión pueden usarse para calcular el tiempo aproximado necesario para lograr el producto de extensión

deseado. En la siguiente tabla se indican las tasas de extensión de algunos ejemplos de polimerasas.

ADN polimerasa	Tasa de extensión*	Referencia
Klenow	13,5 nucleótidos/s	Maier B, Bensimon D y Croquette V. Proc Natl Acad Sci US A. (2000) 2497(22): 12002-7.
T7	75,9 nucleótidos/s	Tanner, N. A. et al. Nuc. Acids Res. (2009) 37, e27.
Taq	35 a 100 nucleótidos/s (75 °C) 0,9 a 2,55 nucleótidos/s (37 °C)	Wittwer, C.T. y Garling, D.J., BioTechniques (1991) 10(1), 76-83.
Phi29	25 nucleótidos/s	Blanco, L., et al. J Biol Chem (1989) 264, 8935-8940
Bst	50 a 100 nucleótidos/s	New England Biolabs
* En las condiciones especificadas en la referencia asociada o en condiciones de reacción estándar a menos que se indique lo contrario.		

El inicio de la reacción de extensión se logra añadiendo la enzima de desplazamiento de hebra al tubo de reacción. La reacción puede detenerse llevando el tubo de reacción a 80 °C durante 20 minutos o agregando EDTA. Además, la reacción puede controlarse (ralentizarse o acelerarse) incubándola a una temperatura menor o mayor (p. ej., 25 °C o 30 °C). Por ejemplo, la tasa de desplazamiento de la polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra Sequenase a 37 °C es de aproximadamente 28 bp por segundo. A 30 °C, es aproximadamente 3 veces más lenta en base a análisis mediante Southern blot. A 37 °C la enzima Sequenase puede generar un producto de extensión de aproximadamente 1 kb en 30 s; de aproximadamente 2 kb en 1 minuto; de aproximadamente 5 kb en 3 minutos; y de aproximadamente 8 kb en 5 minutos. El tiempo necesario para generar productos de extensión de longitudes predeterminadas con distintos sistemas de polimerasa y muestras de distintos orígenes puede determinarse empíricamente, es decir, puede realizarse un experimento similar de evolución temporal seguido por un análisis mediante Southern blot para calibrar el tiempo de extensión. En base a ello, la reacción de extensión puede limitarse a no más de 30 minutos, no más de 10 minutos, no más de 5 minutos, no más de 4 minutos, no más de 3 minutos, no más de 2 minutos, no más de 1 minuto o no más de 30 segundos.

2.3 Reacción de amplificación

A continuación, las secuencias del producto de extensión de tiempo controlado se amplifican, por ejemplo, por PCR. Más específicamente, se amplifican las secuencias limitadas por la secuencia de anclaje de un lado y una secuencia subtelomérica del otro. El cebador puede ser exactamente complementario o tener una secuencia con bases desapareadas, siempre que pueda aparearse a su blanco (secuencia de anclaje o secuencia subtelomérica) e iniciar la extensión.

Las secuencias de anclaje pueden variar. En ciertos aspectos, la secuencia de anclaje es una secuencia específica que no está presente en el genoma del organismo del que se pretende medir la cantidad de telómeros. Si está presente en otra parte del genoma, la secuencia de anclaje podría ser útil de todas formas siempre que se encuentre a una distancia considerable de la secuencia de SUS, de manera que no ocurra amplificación durante el paso de PCR excepto entre la secuencia de anclaje telomérica y la secuencia de SUS telomérica.

Las condiciones se optimizan para obtener el mejor rendimiento analítico posible. Dentro de las condiciones de PCR, el tiempo de extensión se predetermina examinando el perfil de productos en Southern blots para asegurarse de que se enriquezca el rango de tamaños deseado de telómeros cortos.

El cebador subtelomérico usado en el método de la divulgación puede contener secuencias en la hebra G que se encuentren en todos los cromosomas o la mayoría de ellos, por ejemplo, variantes de la secuencia telomérica (TGAGGG)3-6 (Xu y Blackburn, Mol. Cell, 28:315-327, 2007) o (TTGGGG)3-6 (Allshire et al., Nucleic Acid Research, 17:4611-4627, 1989), o (TCAGGG)3-6 (Baird et al., EMBO J., 14(21):5433-5443, 1995). Alternativamente, el cebador subtelomérico puede ser un segmento que se encuentre en uno o más cromosomas específicos, por ejemplo, el cebador XpYpE2 que se describe en Xu et al (5'-GTTGTCTCAGGGTCCTAGTG-3' [ID DE SEC. N.º 1]) (Xu y Blackburn, Mol Cell, 28:315-327, 2007). En un aspecto, el cebador de la secuencia subtelomérica comprende, consiste esencialmente de o consiste de:

5'-GATGGATCCTGAGGGTGAGGGTGAGGG-3' [ID DE SEC. N.º 2]
 5'-CGGGCCGGCTGAGGGTACCGCA-3' [ID DE SEC. N.º 10] (cromosoma 1)
 5'-GCTAATGCACTCCCTCAATAC-3' [ID DE SEC. N.º 11] (cromosoma 5)
 5'-CATTCTAATGCACACATGATACC-3' [ID DE SEC. N.º 12] (cromosoma 9)

Cuando una determinación de telómeros cortos se aplica en organismos que no sean humanos empleando los métodos de la divulgación, la secuencia específica del cebador subtelomérico puede diseñarse en base a la secuencia genómica del organismo. La secuencia del cebador subtelomérico debe coincidir con la hembra que tiene

la saliente 3'.

El producto de amplificación comprende una población de ácidos nucleicos que tienen secuencias repetitivas teloméricas dentro de cierto rango de longitudes y excluye a aquellas secuencias de longitud mayor a este rango. Así, la población se puede configurar para que incluya únicamente las secuencias de los cromosomas con telómeros menores a cierto umbral de longitud.

En el paso de la reacción de extensión se puede incluir una secuencia de control interna para controlar la eficiencia de la reacción de extensión. Esta secuencia de control interna puede ser ADN de hebra doble con una secuencia de cebador subtelomérico y una saliente 3' con la hebra G de la secuencia telomérica. Entre la secuencia del cebador subtelomérico y la secuencia telomérica puede haber un tramo de secuencia no telomérica única. Una secuencia tal puede ser, por ejemplo, el gen hTERT o el gen de la ARNasa P. La eficiencia de la reacción de extensión de este control interno se puede medir mediante una determinación basada en sondas Taqman para cuantificar, por ejemplo, el gen hTERT o el gen de la ARNasa P.

3. Métodos para la medición de la abundancia de telómeros

Cualquier método empleado para medir la abundancia de telómeros en una muestra con secuencias teloméricas se puede usar para medir la abundancia de los telómeros en una muestra telomérica de longitud limitada.

Las medidas de abundancia de telómeros pueden ser absolutas o relativas. Las medidas absolutas de abundancia de telómeros incluyen, por ejemplo, la longitud total de secuencias teloméricas en un genoma medida, por ejemplo, por cantidad de nucleótidos. Más frecuentemente, la abundancia de telómeros se mide en forma relativa a una referencia. La detección de secuencias teloméricas puede medirse en términos de la intensidad de la señal producida en una determinación. La intensidad de esta señal puede compararse con la intensidad de la señal producida por una secuencia de referencia en la determinación. La intensidad relativa de las señales puede servir como método de normalización. Los métodos normalizados pueden compararse más fácilmente entre una determinación y otra. Por ejemplo, la señal producida por la detección de secuencias teloméricas puede compararse con la señal producida por la medición de una secuencia de control. La secuencia de control puede ser, por ejemplo, una porción del gen de la beta globulina. Independientemente del método de determinación empleado, las señales relativas de las secuencias teloméricas respecto de las secuencias de referencia pueden expresarse, por ejemplo, como un cociente. Este cociente puede usarse para comparar resultados de mediciones de abundancia de secuencias teloméricas.

En otros aspectos, las medidas de la abundancia de telómeros cortos se comparan con una abundancia total de telómeros. La abundancia total de telómeros puede medirse usando un tiempo de extensión prolongado en la reacción de desplazamiento de hebra y en la reacción de amplificación, seguido por un método de qPCR como se describe en la patente estadounidense n.º 7 695 904 (Cawthon) y en Lin et al. (Lin et al., 2010, 352(1-2):71-80). Para determinar el porcentaje de telómeros cortos, puede determinarse el cociente entre los telómeros cortos y el total de telómeros. Por ejemplo, la intensidad de la señal de la medición de los telómeros cortos puede dividirse entre la intensidad de la señal de la medición del total de telómeros.

3.1 Qpcr

Un método para cuantificar la abundancia de telómeros cortos es la PCR cuantitativa o qPCR, como describió Cawthon (Nucleic Acids Res., 2002, 30(10):e47; patente estadounidense n.º 7 695 904; Lin et al., J. Immunol. Methods, 2010, 352(1-2):71-80); o Cawthon 2009 (Nucleic Acids Res. 2009 37(3):e21).

Diversos métodos conocidos en la técnica pueden usarse en la presente divulgación para determinar la longitud promedio de los telómeros o la abundancia de telómeros. Preferentemente, se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cinética cuantitativa en tiempo real, con las modificaciones específicas para la detección de longitud de telómeros introducidas por Cawthon (Nucleic Acids Res., 2002, 30(10):e47; patente estadounidense n.º 7 695 904). El método es simple y permite un procesamiento rápido de grandes cantidades de muestra de ADN que genera grandes volúmenes de datos. El método de qPCR se basa en la detección de la fluorescencia producida por una molécula indicadora cuya abundancia aumenta a medida que avanza la reacción en cadena de la polimerasa. Este aumento de la fluorescencia ocurre debido a la acumulación de producto de PCR con cada ciclo de amplificación. Estas moléculas indicadoras fluorescentes incluyen los colorantes que se unen al ADN de hebra doble (por ejemplo, SYBR Green o el bromuro de etidio) y las sondas con especificidad de secuencia (por ejemplo, las sondas moleculares o las sondas TaqMan). Como alternativa, puede usarse el método descrito por Cawthon (Nucleic Acids Res. 2009, 37(3):e21). El método permite la determinación de los cocientes T/S en una única muestra mediante multiplexación, en particular en contextos experimentales en los que las repeticiones teloméricas son la especie de alta abundancia y un gen de copia única es la especie de baja abundancia.

En el método de la presente divulgación, se usan sondas cebadoras específicas para la secuencia repetitiva telomérica (TTAGGG)_n. La longitud del cebador puede variar, en general, entre 5 y 500 nucleótidos, entre 10 y 100 nucleótidos, entre 12 y 75 nucleótidos, o entre 15 y 50 nucleótidos, en función del uso, la especificidad que se requiera y la técnica de amplificación. En la presente divulgación, un aspecto utiliza un primer cebador que hibrida con una primera hebra simple de la secuencia telomérica blanco y un segundo cebador que hibrida con una segunda hebra simple de la secuencia telomérica blanco, donde la primera hebra y la segunda hebra son sustancialmente complementarias. En este aspecto, puede usarse, por ejemplo, el conjunto de cebadores apareados consistente en tel1 (5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3') [ID DE SEC. N.º 3] y tel2 (5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3') [ID DE SEC. N.º 4]. En un aspecto, al menos uno de los cebadores comprende al menos un residuo nucleotídico alterado o mutado, que produce un desapareamiento entre el residuo alterado y el nucleótido del extremo 3' del otro cebador cuando los cebadores hibridan entre sí. Un desapareamiento en el nucleótido del extremo 3' bloquea la extensión por parte de la polimerasa, lo que limita las reacciones de extensión no dependientes de los ácidos nucleicos blanco. En este aspecto, puede usarse, por ejemplo, el conjunto de cebadores apareados consistente en tel 1b 5'-CGGTTTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3' [ID DE SEC. N.º 5]; y tel 2b 5'-GGCTTGCCCTACCCTACCCTACCCTACCCTACCCTACCCT-3' [ID DE SEC. N.º 6]. En otro aspecto, puede usarse, por ejemplo, el conjunto de cebadores apareados consistente en telg 5'-ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT-3' [ID DE SEC. N.º 13]; y tele 5'-TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACCA-3' [ID DE SEC. N.º 14]. La persona versada en la técnica comprenderá que pueden usarse otros conjuntos de cebadores sustancialmente complementarios o con bases desapareadas en esta divulgación. Tales cebadores se describen en la patente estadounidense n.º 7 695 904 (Cawthon et al.).

Las reacciones de amplificación se realizan de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos de PCR se emplean y se han descrito ampliamente (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 4 683 195 y 4 683 202). Brevemente, el ácido nucleico blanco de hebra doble se desnaturaliza (generalmente, incubándolo a una temperatura suficientemente alta) y, luego, se incuba en presencia de cebadores en exceso molar, que hibridan con los ácidos nucleicos blanco de hebra simple (es decir, se aparean con ellos). Una ADN polimerasa extiende el cebador apareado y genera una nueva copia del ácido nucleico blanco. Luego, el complejo de hebra doble resultante se desnaturaliza y los pasos de extensión se repiten. Al repetir los pasos de desnaturalización hibridación y extensión en presencia de un segundo cebador para la hebra blanco complementaria, el ácido nucleico blanco abarcado por los dos cebadores se amplifica exponencialmente. El tiempo y la temperatura del paso de extensión del cebador dependerá de la polimerasa, la longitud del ácido nucleico blanco amplificado y la secuencia del cebador empleado para la amplificación. La cantidad de repeticiones de los pasos necesaria para amplificar suficientemente el ácido nucleico blanco dependerá de la eficiencia de la amplificación. La persona versada en la técnica comprenderá que la presente divulgación no se ve limitada por variaciones en los tiempos, las temperaturas, las condiciones de la solución tampón ni la cantidad de ciclos del proceso de amplificación.

Los productos de la amplificación se detectan y analizan mediante métodos bien conocidos en la técnica. Los productos amplificados pueden analizarse luego de la separación y/o purificación de los productos, o por medición directa del producto formado en la reacción de amplificación. Para la detección, el producto puede identificarse indirectamente con compuestos fluorescentes (por ejemplo, con bromuro de etidio o SYBR Green), o mediante hibridación con sondas de ácidos nucleicos marcadas). Alternativamente, pueden usarse cebadores o nucleótidos marcados en la reacción de amplificación para marcar el producto de amplificación. La marca comprende cualquier fracción detectable, incluidas las marcas fluorescentes, las marcas radiactivas, las marcas electrónicas y las marcas indirectas como la biotina o la digoxigenina.

Los instrumentos adecuados para realizar las reacciones de qPCR de la presente divulgación pueden obtenerse de distintas fuentes comerciales (ABI Prism 7700, Applied Biosystems, Carlsbad, California; LIGHTCYCLER 480, Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana; Eco Real-Time PCR System, Illumina, Inc., San Diego, California; RoboCycler 40, Stratagene, Cedar Creek, Texas).

Cuando se emplea PCR cuantitativa en tiempo real para detectar y medir los productos de amplificación, se usan distintos algoritmos para calcular la cantidad de telómeros blanco en las muestras (por ejemplo, véase el software del ABI Prism 7700, versión 1.7 o el software de Lightcycler versión 3). La cuantificación puede involucrar el uso de muestras patrón con una cantidad conocida de copias de los ácidos nucleicos teloméricos y la generación de curvas patrón para los logaritmos de los patrones y el ciclo umbral (Ct). En general, Ct es el ciclo de PCR o el ciclo de PCR fraccional en el que la fluorescencia generada por el producto de amplificación está varias desviaciones estándar por encima de la fluorescencia basal.

3.2 Otros métodos

La abundancia de telómeros cortos de la reacción de amplificación puede medirse por medio de otros métodos conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, sin carácter taxativo, la secuenciación directa de ácidos nucleicos, la las técnicas de hibridación Southern blot, dot blot y slot blot, y la PCR digital.

5 En la presente divulgación, pueden emplearse técnicas convencionales para la determinación directa de las secuencias de nucleótidos en el ADN aislado. Por ejemplo, véase: "DNA Sequencing", The Encyclopedia of Molecular Biology, J. Kendrew, ed., Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, 1995, pp. 283-286. En la actualidad, la secuenciación automática con colorantes y terminadores se utiliza generalmente para la secuenciación de ácidos nucleicos ("DNA Sequencing", Lab Manager, URL labmanager.com/?articles.view/articleNo/3364/article/DNA-Sequencing). Los equipos de secuenciación automáticos son prácticos de usar y pueden compararse a empresas como Applied Biosystems, Roche Applied Science e Illumina Inc. Una vez que se determina la secuencia de una muestra de ADN, puede contarse la cantidad de copias de la secuencia de nucleótidos telomérica (TTAGGG) a cada extremo. El método de la presente divulgación provee una medida de la abundancia absoluta de telómeros mediante la medición directa de las secuencias teloméricas.

15 También puede usarse la técnica de Southern blot (Southern, E. M., J. Mol. Biol., 1975,98(3): 503-517) en la presente divulgación para determinar la abundancia de telómeros mediante la detección de la presencia específica de la secuencia de nucleótidos telomérica humana (TTAGGG)_n. En la presente divulgación, la técnica de Southern blot de fragmentos con restricciones terminales (TFR) combina la transferencia de fragmentos de ADN separados por electroforesis a una membrana de filtro con la detección de los fragmentos por hibridación con sondas específicas para la secuencia (TTAGGG) (Allshire, R. C. et al., Nucleic Acids Res., 1989, 17, 4611-4627). Tales sondas tienen secuencias complementarias a la secuencia telomérica. Para facilitar la detección, las sondas se marcan de forma fluorescente o con un colorante fluorescente o cromogénico. Luego, la cantidad de radiactividad o fluorescencia presentes puede cuantificarse para obtener la abundancia de telómeros en la muestra. M. Kimura et al. (Nature Protocols, 2010, 5:1596 1607) describe un procedimiento de Southern blot adecuado para determinar la longitud de los telómeros.

Las variantes del método de Southern blot incluyen un dot blot o slot blot, en el que el ADN se dispone en forma de puntos o ranuras en una membrana de filtro y, luego, los fragmentos se detectan por hibridación con sondas específicas para la secuencia (TTAGGG) (Kimura M, Aviv A, Nucleic Acids Res., 2011, 39(12):e84. doi: 10.1093/nar/gkr235. Publicación en línea: 27 de abril de 2011).

En los aspectos anteriores de la presente invención, la fluorescencia puede medirse en unidades de fluorescencia relativa (RFU). La fluorescencia se detecta mediante un arreglo de dispositivos de carga acoplada (CCD) cuando los fragmentos marcados, que se separan por electroforesis en un capilar, se energizan con luz láser y pasan por la ventana de detección. Un programa informático mide los resultados y determina la cantidad o el tamaño de los fragmentos que contienen telómeros en cada punto a partir de la intensidad de la fluorescencia ("Relative fluorescence unit (RFU)", DNA.gov: Glossary, abril de 2011, URL: dna.gov/glossary/).

40 La medición de la abundancia de telómeros puede hacerse mediante métodos de secuenciación de ADN. Tales métodos pueden involucrar secuenciar moléculas en una muestra que comprenden repeticiones teloméricas y determinar la abundancia de secuencias repetitivas teloméricas. Los métodos de secuenciación de ADN pueden incluir cualquier método conocido de secuenciación, incluidos, por ejemplo, los métodos de secuenciación clásicos —como la secuenciación de Sanger o la secuenciación de Maxam Gilbert— y los métodos de secuenciación de nueva generación —como la secuenciación por ligación, la secuenciación con nanoporos, la pirosecuenciación, la superpirosecuenciación, la secuenciación por detección de protones, la secuenciación por síntesis y la secuenciación de moléculas individuales. La abundancia de telómeros cortos también se puede medir mediante PCR digital. Las plataformas para esta técnica incluyen, sin carácter taxativo: la PCR digital, incluidos, por ejemplo, el sistema RAINDROP Digital PCR System (Raindance Technologies, Billerica, Massachusetts) o el sistema QX200 DROPLET DIGITAL PCR System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California); la PCR microfluídica digital (Fluidigm Corporation, South San Francisco, California); o el sistema OPENARRAY Real-Time PCR System (APPLIED BIOSYSTEMS, división de Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts). En varios otros aspectos, la abundancia de telómeros cortos puede medirse mediante una tecnología de hibridación adecuada, por ejemplo, los métodos de códigos de barras con códigos de colores digitales como el Sistema de análisis NCOUNTER (Nanostring Technologies, Seattle, Washington).

4. Kits

La divulgación también provee kits útiles para los métodos de la divulgación. Tales kits pueden incluir un cebador de extensión de esta divulgación y un cebador de amplificación que hibride con una secuencia subtelomérica o con el complemento de una secuencia de anclaje del cebador de extensión. Alternativamente, el kit puede incluir un cebador de extensión de esta divulgación y un par de cebadores de amplificación adaptados para amplificar una secuencia en un ácido nucleico limitado por una secuencia subtelomérica y una secuencia de anclaje en el cebador

de extensión. El kit puede incluir un contenedor que contenga el cebador de extensión y otro contenedor que contenga uno de los cebadores de amplificación o ambos. El kit también puede incluir reactivos para la extensión del cebador y reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos (p. ej., para la PCR). El kit también puede incluir muestras de control y de referencia con valores conocidos. En ciertos aspectos, el kit incluye un cebador de extensión y un par de cebadores de amplificación. En ciertos aspectos, el cebador de extensión comprende una porción 3' que hibrida con una secuencia repetitiva telomérica en una saliente 3' de ADN cromosómico de hebra doble en condiciones de apareamiento, y una porción de anclaje 5' que no hibrida con secuencias en las regiones teloméricas ni subteloméricas.

5. Afecciones correlacionadas con la abundancia de telómeros, la abundancia de telómeros cortos y el ritmo de cambio de la abundancia de telómeros o el ritmo de cambio de la abundancia de telómeros cortos

En general, las afecciones asociadas con la abundancia de telómeros se han derivado empleando una medida de la longitud promedio de los telómeros, como se describió en la presente. Sin embargo, como se explicó, nuevos datos parecen indicar que medir la abundancia de telómeros cortos y/o el ritmo de cambio en la abundancia de telómeros cortos puede ser un predictor más sensible y potencialmente más preciso de los resultados clínicamente significativos (p. ej., el riesgo de enfermedad o mortalidad) que la medición de la longitud promedio de los telómeros o el ritmo de cambio en la longitud promedio de los telómeros. Por ello, es importante contar con mediciones sensibles y precisas de la abundancia de telómeros cortos. Se ha informado que la presencia de telómeros críticamente cortos provoca una pérdida de la viabilidad celular y la función tisular, lo que indica que existe una relación causal entre los telómeros muy cortos y la senescencia celular (Hemann, M.T., et al. *Cell*, 2001. 107(1)67-77).

Aunque la longitud promedio reducida de los telómeros (como se explica más abajo) es un predictor bueno y aceptado de los resultados clínicos, se espera que la medición de la abundancia de telómeros cortos sea más sensible a los efectos de la intervención sobre la dinámica de los telómeros (Canela, A., et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007. 104(13) 5300-5). Harley et al. (*Rejuvenation Res.* 2011. 14(1) 45-56) informaron que un grupo de humanos que tomaba TA-65®, un activador de la telomerasa relativamente débil, mostró una reducción en el porcentaje de telómeros cortos sin que hubiera un cambio significativo en la longitud promedio de los telómeros. En Vera et al. supra., el ritmo de aumento en la abundancia de telómeros cortos predijo un aumento de la longevidad en dos cohortes independientes de ratones ("The Rate of Increase of Short Telomeres Predicts Longevity in Mammals, *Cell Reports* (2012), URL: [dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.023](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.023)). Debido a la falta de un método preciso, económico y que genere grandes volúmenes de datos para medir la abundancia de telómeros cortos, no ha habido hasta el momento estudios clínicos a gran escala sobre humanos que empleen la abundancia de telómeros cortos o el ritmo de cambio en la abundancia de telómeros cortos para determinar la utilidad clínica de medir la abundancia de telómeros cortos.

Estudios de prueba de concepto en animales de Vera et al., supra también indican que los ratones con un alto ritmo de aumento en el porcentaje de telómeros cortos tienen menor supervivencia que los ratones con bajo ritmo de aumento en el porcentaje de telómeros cortos. En ratones silvestres, la diferencia en la supervivencia de los ratones con baja tasa de aumento (p. ej., 0,4 %/mes) en comparación con los ratones con mayor ritmo de aumento (p. ej., 1 %/mes) fue de aproximadamente 100 semanas, equivalente a casi dos tercios de la supervivencia máxima entre los ratones silvestres.

Así, los humanos con un mayor porcentaje de telómeros cortos —medido de acuerdo con una determinación precisa y exacta como la que se describe aquí— tendrán mayor predisposición a la enfermedad o riesgo de mortalidad que los humanos con un menor porcentaje de telómeros cortos. La evaluación cuantitativa del porcentaje de telómeros cortos tendrá una utilidad diagnóstica considerable no solo en la vigilancia del estado de salud sino también en el diagnóstico, pronóstico y diagnóstico complementario de enfermedades.

Medir la abundancia de telómeros cortos tiene utilidad inmediata para la vigilancia del estado de salud porque se sabe que los telómeros cortos (en general, menores a 1 kbp, menores a 2 kbp o menores a 3 kbp) disparan la senescencia celular (Hemann, M.T., et al. *Cell*, 2001. 107(1) 67-77) y se sabe que, a su vez, la senescencia celular lleva a la pérdida de función tisular y, en última instancia, a la enfermedad y la mortalidad. Por ello, un individuo con una abundancia de telómeros cortos superior al promedio en una población de referencia de individuos normales de edad comparable corre mayor riesgo de morbilidad o mortalidad. Tal persona se vería motivada a cambiar su comportamiento hacia un mejor estilo de vida y disminuir la abundancia de telómeros cortos, en tanto que un individuo con una abundancia de telómeros cortos inferior al promedio de la población de referencia sabría que su salud celular probablemente sería mejor al promedio y, por ende, se vería motivado a mantener o mejorar aún más los hábitos de su estilo de vida para mantenerse en buena salud.

La longitud promedio de los telómeros por cada extremo de cromosoma determinada a partir de ADN genómico es una medida de la abundancia general de telómeros y se ha demostrado que muestra correlación con varios índices

biológicos importantes. Estos índices incluyen, por ejemplo, el riesgo de distintas enfermedades y afecciones (p. ej., el riesgo de enfermedades cardiovasculares, el riesgo de cáncer, el riesgo de fibrosis pulmonar, el riesgo de enfermedades infecciosas y el riesgo de mortalidad). La abundancia de telómeros también muestra correlación con la edad cronológica, el índice de masa corporal, el cociente entre el tamaño de las caderas y el peso, y el estrés percibido. Una medición de la longitud de los telómeros es el cociente entre telómeros y genes de copia única ("T/S"). Los valores de estos cocientes en una población dada pueden dividirse en cuantiles, por ejemplo, en terciles. Se ha descubierto que los individuos con abundancias de telómeros —cuantificada mediante el cociente T/S— en los dos terciles inferiores tienen un riesgo considerablemente mayor de padecer enfermedades cardiovasculares que las personas en el tercil superior.

En general, un valor percentil de una medida de abundancia de telómeros, p. ej., cocientes T/S representados como un porcentaje de la población de referencia (por lo general, el tercil o cuartil superior de longitudes de telómeros) en una población muestra una correlación negativa con el riesgo de enfermedad, es decir, una menor longitud promedio de los telómeros se asocia con mejores medidas del estado de salud, en tanto que menores percentiles se asocian con menores medidas del estado de salud, mayor riesgo de padecer enfermedades o presencia de enfermedad telomérica.

En una población, la longitud de los telómeros disminuye con la edad. Así, las medidas de la longitud de los telómeros de un individuo pueden compararse con las medidas correspondientes a personas en el mismo rango etario de la población, es decir, con una población de edad comparable. Por ejemplo, una persona de 30 años de edad podría tener una medida de abundancia de telómeros aproximadamente igual al promedio de la población de 30 años, o bien igual al promedio de la población de 20 años o de 40 años. Las correlaciones de una medida de la abundancia de telómeros con medidas del estado de salud son más precisas cuando se comparan con una población de edad comparable. El rango de una población de edad comparable puede ser, por ejemplo, un año, dos años, tres años, cuatro años, 5 años, 7 años o 10 años.

5.1 Medidas del estado de salud

La abundancia de telómeros cortos determinada a partir de muestras de sujetos mediante el método de la presente divulgación puede correlacionarse con medidas del estado de salud. De particular interés son las medidas de salud que involucran el estrés percibido. El acortamiento de los telómeros puede verse acelerado por factores genéticos y ambientales que incluyen distintas formas de estrés, como el daño oxidativo, los estresantes bioquímicos, la inflamación crónica y las infecciones virales (Epel, E.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 49:17312-15). Una medida práctica del estado de salud general es el Cuestionario de salud SF-36® desarrollado por John Ware (véase, por ejemplo, la URL sf-36.org/tools/SF36.shtml). El SF-36 es un cuestionario de salud multipropósito corto con solo 36 preguntas que la persona que toma el cuestionario —preferentemente un individuo capacitado— debe hacer al paciente. Provee un perfil de 8 niveles de la salud funcional y puntajes de bienestar, así como medidas resumidas del estado de salud física y mental de base psicométrica y un índice de utilidad de salud basado en las preferencias. El cuestionario SF-36 se usa para estimar la carga de enfermedad y comparar parámetros de referencia de enfermedades específicas con los valores normales en la población. Las enfermedades y afecciones más comúnmente estudiadas incluyen la artritis, el dolor de espalda, el cáncer, la enfermedad cardiovascular, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la depresión, la diabetes, la enfermedad gastrointestinal, las migrañas, el VIH/SIDA, la hipertensión, el síndrome del intestino irritable, la nefropatía, los dolores lumbares, la esclerosis múltiple, las afecciones musculoesqueléticas, las condiciones neuromusculares, la osteoartritis, los diagnósticos psiquiátricos, la artritis reumatoide, los trastornos del sueño, las lesiones de la columna vertebral, los accidentes cerebrovasculares, el abuso de sustancias, las intervenciones quirúrgicas, los trasplantes y el trauma (Turner-Bowker et al., SF-36® Health Survey & "SF" Bibliography: Third Edition (1988 000), Quality Metric Incorporated, Lincoln, RI, 2002). La persona versada en la técnica comprenderá que otros métodos de evaluación del estado de salud general (por ejemplo, el cuestionario RAND-36) también pueden ser útiles en la presente divulgación.

En un aspecto de la presente divulgación, se recopilan muestras de sujetos a lo largo del tiempo y se determinan mediciones de la abundancia de telómeros cortos en las muestras. Los períodos de tiempo adecuados para recolectar múltiples muestras incluyen, sin carácter taxativo, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años y 10 años (por ejemplo, el período de tiempo entre la primera muestra y la última puede ser aproximadamente igual a los períodos anteriores). Este método permite monitorizar los esfuerzos del paciente por mejorar su estado de salud general y/o monitorizar su estado de salud y/o su riesgo de padecer enfermedades. Dado que los telómeros cortos disparan la muerte celular, identificar que el porcentaje de telómeros cortos disminuye o se mantiene a lo largo del tiempo en un individuo indica una mejora del estado de salud, en tanto que un aumento del porcentaje de telómeros cortos a lo largo del tiempo representa una disminución o empeoramiento del estado de salud.

5.2 Riesgo de una afección patológica

5.2.1 Enfermedad

La medición de la cantidad de unidades repetitivas en los telómeros tiene una gran variedad de aplicaciones en el diagnóstico médico, por ejemplo, para determinar el riesgo de padecer enfermedades, el pronóstico de una enfermedad y los posibles tratamientos. En particular, la medición de la longitud de los telómeros sirve para evaluar afecciones patológicas que puedan aumentar el riesgo de padecer enfermedades. En un aspecto de la divulgación, la enfermedad es una asociada con el envejecimiento, por ejemplo, sin carácter taxativo, la enfermedad cardiovascular, la diabetes, el cáncer, la fibrosis hepática y la depresión.

En un aspecto, la presente divulgación tiene utilidad para la evaluación y monitorización de la enfermedad cardiovascular. Se ha demostrado que los telómeros de los glóbulos blancos son más cortos entre los pacientes con enfermedad coronaria de tres vasos determinada por angiografía (Samani, N. J. et al., *Lancet*, 2001, 358:472-73), y también entre los pacientes que experimentan un infarto de miocardio prematuro antes de los 50 años en comparación con individuos del mismo sexo y de edad comparable sin tales antecedentes (Brouillette S. et al., *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.*, 2003, 23:842-46). Brouillette et al. (*Lancet*, 2007, 369:107-14) sugirieron que los telómeros leucocitarios más cortos en las personas susceptibles a la enfermedad coronaria podrían indicar el efecto acumulativo de otros factores de riesgo cardiovasculares sobre la longitud de los telómeros. El aumento del estrés oxidativo también contribuye con la aterosclerosis, y se ha demostrado que el aumento del estrés oxidativo aumenta el ritmo de deterioro de los telómeros in vitro (Harrison, D., *Can. J. Cardiol.*, 1998, 14(suppl D):30D-32D; von Zglinicki, T., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, 908:99-110). En estudios transversales, también se ha informado que el consumo de tabaco, el índice de masa corporal y la diabetes mellitus tipo 1 muestran asociación con los telómeros más cortos (Valdes, A., et al., *Lancet*, 2005, 366:662-64; Jeanclos, E. et al., *Diabetes*, 1998, 47:482-86). Se ha demostrado que el aumento del estrés de vida, un factor que aumenta el riesgo de padecer enfermedad coronaria, también muestra asociación con los telómeros cortos, posiblemente a causa del aumento del estrés oxidativo (Epel, 2004, *ibid.*). Así, la determinación y monitorización continua de la longitud de los telómeros de acuerdo con el método de la divulgación sería de utilidad para los fumadores y los pacientes con altos índices de masa corporal, diabetes y/o mayor estrés de vida.

La diabetes tipo 2 se caracteriza por la presencia de telómeros más cortos (Salpea, K. y Humphries, S. E., *Atherosclerosis*, 2010, 209(1):35-38). También se han observado telómeros más cortos en pacientes con diabetes tipo 1 (Uziel O. et al., *Exper. Gerontology*, 2007, 42:971-978). La etiología de la diabetes tipo 1 es algo diferente a la de la diabetes tipo 2 pero, en ambos casos, la insuficiencia de las células beta es el desencadenante final de la enfermedad en su máxima expresión. Entonces, la longitud de los telómeros es un marcador útil para la diabetes, dado que se asocia con el avance de la enfermedad. Adaikalakoteswari et al. (*Atherosclerosis*, 2001, 195:83-89) demostraron que los telómeros son más cortos en los pacientes con tolerancia alterada a la glucosa prediabética en comparación con los individuos de control. Además, el acortamiento de los telómeros se ha vinculado con complicaciones diabéticas, como la nefropatía diabética (Verzola D. et al., *Am. J. Physiol.*, 2008, 295:F1563-1573), la microalbuminuria (Tentolouris, N. et al., *Diabetes Care*, 2007, 30:2909-2915) y los cánceres epiteliales (Sampson, M. J. et al., *Diabetologia*, 2006, 49:1726-1731), en tanto que el acortamiento de los telómeros parece verse atenuado en los pacientes con diabetes bien controlada (Uziel, 2007, *ibid.*). El método de la presente divulgación es particularmente útil para monitorizar el estado de los pacientes diabéticos y prediabéticos para proporcionar una advertencia temprana de estas y otras complicaciones.

La presente divulgación es útil para determinar la longitud de los telómeros de distintos tipos de células cancerosas, dado que la activación de la actividad de la telomerasa está asociada con la inmortalización de las células. Mientras que las células somáticas humanas normales no expresan la telomerasa o lo hacen solo transitoriamente (y, por ende, acortan sus telómeros en cada división celular), la mayoría de las células cancerosas humanas expresan altos niveles de telomerasa y muestran una proliferación celular ilimitada. La expresión elevada de la telomerasa permite a las células proliferar y expandirse a largo plazo y, por ende, promueve el crecimiento tumoral (Roth, A. et al., en *Small Molecules in Oncology, Recent Results in Cancer Research*, U. M. Martens (ed.), Springer Verlag, 2010, pp. 221-234). Los telómeros más cortos muestran una asociación significativa con el riesgo de cáncer, especialmente los cánceres de vejiga y de pulmón, relacionados con el consumo de tabaco, del sistema digestivo y del sistema urogenital. El acortamiento excesivo de los telómeros probablemente desempeña un papel en el inicio y al avance tumoral (Ma H. et al., *PLOS ONE*, 2011, 6(6): e20466. doi:10.1371/journal.pone.0020466). Ciertos estudios también han mostrado que el efecto de los telómeros cortos sobre el riesgo de cáncer de mama es considerable en ciertos subgrupos poblacionales, como las mujeres premenopáusicas y las mujeres con poca capacidad antioxidante (Shen J., et al., *Int. J. Cancer*, 2009, 124:1637-1643). Además de evaluar y monitorizar los cánceres en general, la presente divulgación es particularmente útil para monitorizar cánceres orales si se emplea ADN genómico derivado de muestras de saliva.

La cirrosis hepática se caracteriza por un aumento de la fibrosis del órgano, a menudo asociada con una infiltración inflamatoria considerable. Wiemann et al. (*FASEB Journal*, 2002, 16(9):935-982) mostraron que el acortamiento de los telómeros es un signo de la cirrosis hepática independiente de la enfermedad y de la edad en humanos. El acortamiento de los telómeros se observa en la cirrosis inducida por hepatitis viral (hepatitis crónica A y B), daño

hepático tóxico (alcoholismo), respuestas autoinmunes y colestasis (PBC y PSC); los telómeros son uniformemente cortos en la cirrosis independientemente de la edad de los pacientes. El acortamiento de los telómeros y la senescencia afectan específicamente a los hepatocitos en el hígado cirrótico y ambos parámetros muestran una correlación marcada con el avance de la fibrosis durante la cirrosis. Así, el método de la presente divulgación tiene utilidad para el diagnóstico y la monitorización de la fibrosis hepática.

La depresión se ha comparado con un estado de “envejecimiento acelerado” y los individuos que sufren depresión tienen mayor incidencia de distintas enfermedades propias del envejecimiento, como las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, el síndrome metabólico y la demencia. Las personas con depresión recurrente o que están expuestas a estrés crónico tienen glóbulos blancos con telómeros más cortos. Los telómeros cortos están asociados tanto con la depresión recurrente como con los niveles de cortisol indicativos de la exposición a estrés crónico (Wikgren, M. et al., *Biol. Psych.*, 2011, DOI: 10.1016/j.biopsych.2011.09.015). Sin embargo, no todos los individuos deprimidos muestran telómeros igualmente acortados debido a una gran variabilidad en los episodios depresivos a lo largo de la vida. Quienes han sufrido depresión durante largos períodos tienen telómeros considerablemente más cortos debido a la mayor exposición al estrés oxidativo y a la inflamación inducida por el estrés psicológico en comparación con las poblaciones de control (Wolkowitz et al., *PLoS One*, 2011, 6(3):e17837). Así, el método de la presente divulgación puede ser útil para la monitorización de la depresión.

Infección crónica

La longitud anormal de los telómeros está asociada con la infección crónica, incluida la infección con VIH (Effros RB et al., *AIDS*. Jul 1996; 10(8):F17-22, Pommier et al. *Virology*. 1997, 231(1):148-54), VHB, VHC y CMV (Effros RB, *Telomere/telomerase dynamics within the human immune system: effect of chronic infection and stress*. *Exp Gerontol*. Feb-Mar 2011; 46(2-3):135-40. *Rejuvenation Res*. Feb 2011;14(1):45-56. doi: 10.1089rej.2010.1085. Publicación en línea: 7 de septiembre de 2010).

Harley et al. (“A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program”, Harley CB, Liu W, Blasco M, Vera E, Andrews WH, Briggs LA, Raffaele JM, *Rejuvenation Res*. Feb 2011;14(1):45-56) descubrieron que los individuos seropositivos para CMV tenían telómeros más cortos que los negativos y, además, los sujetos positivos para CMV tenían mayores probabilidades de responder a un programa de suplemento nutricional con TA-65, un activador de la telomerasa derivado de productos naturales junto con otros suplementos, para reducir la abundancia de células senescentes CD8+/CD28-, lo que parece sugerir una aplicación en el diagnóstico complementario de la medición de la longitud promedio de los telómeros o la abundancia de telómeros cortos, conjuntamente con la administración de activadores de la telomerasa.

La medición de la población de telómeros cortos puede usarse como indicador de pronóstico del avance de una enfermedad y del resultado del tratamiento.

Un estudio informó que la longitud de los telómeros en células CD4+ está relacionada con el grado de inflamación, la etapa de la fibrosis, los índices de laboratorio de la gravedad, la descompensación hepática ulterior y el resultado del tratamiento en pacientes con infección crónica con VHC (Hoare et al, *J. Hepatol*, 2010, 53(2):252-260).

En otro estudio, la mayor longitud de los telómeros leucocitarios predice un mayor riesgo de carcinoma hepatocelular relacionado con el virus de la hepatitis B (Liu et al, 2011, 117(18):4247-56.)

En el caso del VIH, la infección viral causa acortamiento de los telómeros. Además, los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos son inhibidores de la telomerasa (Strahl y Blackburn, *Mol Cell Biol*, 1996, 16(1):53-65; Hukezalie et al., *PLoS One*, 2012, 7(1 1):e47505). La medición de la abundancia de telómeros cortos podría ayudar a determinar los efectos laterales y la eficacia de la terapia antirretroviral de gran actividad (HAART).

5.2.2 Otras afecciones patológicas

La presente divulgación también tiene utilidad para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el inicio temprano del envejecimiento. Por ejemplo, los individuos que padecen progeria de Hutchinson-Gilford muestran envejecimiento prematuro y una reducción en el potencial de proliferación de los fibroblastos asociados con la reducción de la longitud telomérica (Allsopp, R. C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89:10114-10118). La amplificación y cuantificación de la cantidad de repeticiones teloméricas de acuerdo con el método de esta divulgación es útil para determinar el riesgo de padecer una enfermedad o su pronóstico y tomar medidas adecuadas como las descritas anteriormente.

5.3 Enfermedades teloméricas

En un aspecto de la presente divulgación, tanto la presencia como el avance de enfermedades específicas de los telómeros puede determinarse a partir de muestra. Las enfermedades teloméricas están asociadas con un acortamiento anormal o prematuro de los telómeros que puede deberse, por ejemplo, a defectos en la actividad de la telomerasa. La telomerasa es un complejo de ribonucleoproteínas necesario para la replicación y protección del ADN telomérico en eucariotas. Las células sin telomerasa sufren una pérdida progresiva de ADN telomérico que da lugar a una pérdida de la viabilidad y un aumento concomitante en la inestabilidad genómica. Estas enfermedades pueden heredarse e incluyen ciertas formas de anemia aplásica congénita, en la que la división insuficiente de las células madre de la médula ósea provocan una anemia grave. Ciertas enfermedades hereditarias de la piel y de los pulmones también se deben a defectos de la telomerasa. En relación con las enfermedades teloméricas, un umbral de T/S menor de 0,5 es adecuado para ciertas afecciones. Otra métrica de uso habitual es un puntaje de percentil telomérico ajustado por la edad menor de 10 % o preferentemente menor de 1 % respecto de la población normal.

La disqueratosis congénita (DKC), también conocida como síndrome de Zinsser-Engman-Cole, es un síndrome progresivo poco frecuente de insuficiencia de la médula ósea que se caracteriza por anomalías mucocutáneas: hiperpigmentación de piel reticulada, distrofia ungular y leucoplasia oral (Jyonouchi S. et al., *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2011, 22(3):313-9; Bessler M., et al., *Haematologica*, 2001, 92(8):1009-12). Hay evidencia de disfunción de la telomerasa, deficiencia ribosomal y disfunción de la síntesis proteica en este trastorno. La mortalidad temprana viene asociada generalmente a la insuficiencia de la médula ósea, las infecciones, las complicaciones pulmonares fatales o las neoplasias. La enfermedad se hereda en uno de tres tipos: autosómica dominante, autosómica recesiva o recesiva vinculada al cromosoma X (la forma más común), en la que el gen responsable de la DKC se encuentra en el cromosoma X. El diagnóstico y la medición tempranos del avance de la enfermedad mediante el método de esta divulgación es muy beneficioso para las familias con estas características genéticas porque el tratamiento temprano con esteroides anabólicos o fármacos estimulantes de la médula ósea puede ayudar a prevenir la insuficiencia de la médula ósea. El método de análisis de saliva de la presente divulgación, que no es invasivo y es simple para el paciente, es particularmente útil para la DKC porque suele requerirse el análisis y la monitorización de bebés y niños pequeños.

Las neumonías intersticiales idiopáticas se caracterizan por daños al parénquima pulmonar causados por una combinación de fibrosis e inflamación. La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es un ejemplo de estas enfermedades que causa fibrosis progresiva de los pulmones. Con el tiempo, se acumula tejido cicatricial fibroso en los pulmones, lo que afecta su capacidad de suministrar suficiente oxígeno al organismo. Se han detectado mutaciones heterocigotas en las regiones codificantes de los genes de la telomerasa, TERT y TERC en casos familiares y esporádicos de neumonía intersticial idiopática. Todos los pacientes afectados con mutaciones tienen telómeros cortos. Una fracción considerable de los individuos con FPI tienen telómeros cortos que no pueden ser explicados por mutaciones codificantes en la telomerasa (Cronkhite, J. T., et al., *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 2008, 178:729-737). Así, el acortamiento de los telómeros puede usarse como marcador de una mayor predisposición hacia esta enfermedad relacionada con la edad (Alder, J. K., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105(35):13051-13056). Además, el desarrollo de la FPI varía de un individuo a otro. En algunos casos, la enfermedad avanza de forma lenta y gradual a lo largo de los años, mientras que, para otros, avanza rápidamente. El método de la presente divulgación puede usarse de forma práctica para monitorizar el desarrollo de la fibrosis pulmonar y tomar medidas de intervención adecuadas como las descritas anteriormente.

La anemia aplásica es una enfermedad en la que la médula ósea deja de producir suficientes glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas para el organismo. Los glóbulos que la médula produce son normales, pero no hay cantidad suficiente de ellos. La anemia aplásica puede ser moderada, grave o muy grave. Las personas con anemia aplásica grave o muy grave corren riesgo de infecciones o hemorragias que puedan poner en riesgo la vida. Los pacientes que padecen anemia aplásica y tienen mutaciones de la telomerasa presentan mayor riesgo de desarrollar mielodisplasia. La deficiencia de telomerasa puede causar distintos niveles de acortamiento de los telómeros en células madre hematopoyéticas y dar lugar a inestabilidad cromosómica y transformación maligna (Calado, R. T. y Young, N. S., *The Hematologist*, 2010. URL: hematology.org/Publications/Hematologist/2010/4849.aspx). Los pacientes que padecen anemia aplásica y tienen telómeros más cortos tienen menor tasa de supervivencia y tienen una probabilidad mucho mayor de recaer luego de una inmunoterapia que quienes tienen telómeros más largos. Scheinberg et al. (*JAMA*, 2010, 304(12):1358-1364) descubrieron que las tasas de recaída disminuían a medida que aumentaba la longitud de los telómeros. El grupo de pacientes con los telómeros más cortos también tenía mayor riesgo de conversión en cáncer de médula ósea y tenía la menor tasa de supervivencia general. El método de la presente divulgación puede usarse en pacientes que padecen anemia aplásica para monitorizar el riesgo de desarrollar complicaciones importantes de manera que se pueda adaptar en forma acorde el cuidado clínico de un individuo.

5.4 Respuesta a fármacos

En otro aspecto, la presente divulgación es útil para monitorizar la efectividad de tratamientos o evaluar fármacos candidatos que afecten la longitud de los telómeros o la actividad de la telomerasa. La capacidad de monitorizar las

características de los telómeros puede dar visibilidad para examinar la efectividad de tratamientos y agentes farmacológicos específicos. El método de la presente divulgación permite determinar la respuesta de un estado de enfermedad a uno o más fármacos como parte de un tratamiento particular. Por ejemplo, la presente divulgación puede ser útil para monitorizar la efectividad del tratamiento contra el cáncer, dado que el potencial de proliferación de las células se relaciona con el mantenimiento de la integridad de los telómeros. Como se explicó anteriormente, mientras que las células somáticas humanas normales no expresan la telomerasa o lo hacen solo transitoriamente (y, por ende, acortan sus telómeros en cada división celular), la mayoría de las células cancerosas humanas expresan altos niveles de telomerasa y muestran una proliferación celular ilimitada. Roth et al., (ibid., 2010) han propuesto que los fármacos contra el cáncer inhibidores de la telomerasa podrían ser más efectivos entre los individuos con cáncer que tienen telómeros muy cortos en sus tumores (en los que los telómeros más cortos de la mayoría de las células están cerca de la disfunción telomérica) y alta actividad de la telomerasa. Dado que la telomerasa no se expresa o se expresa únicamente de forma transitoria y en niveles muy bajos en la mayoría de las células normales, los tratamientos de inhibición de la telomerasa podrían ser menos tóxicos para las células normales que la quimioterapia convencional. Un ejemplo de dichos fármacos es el inhibidor de la telomerasa basado en oligonucleótidos imetelstat (conocido anteriormente como GRN163L). El imetelstat es un nuevo conjugado de base lipídica del oligonucleótido de primera generación GRN163 (Asai, A. et al., Cancer Res., 2003, 63:3931-3939). Sin embargo, los pacientes con cáncer que tienen telómeros muy cortos en los glóbulos normales (particularmente los granulocitos) tienen mayor riesgo de sufrir efectos adversos del imetelstat en los tejidos proliferativos como la médula ósea. Rattain et al. (2008) descubrieron que los sujetos cuyos granulocitos tenían telómeros cortos tenían mayores probabilidades de mostrar síntomas de insuficiencia de la médula ósea, como neutropenia o trombocitopenia. En esta situación, un médico puede recetar una dosis menor de imetelstat, un fármaco diferente o monitorización más frecuente en busca de posibles problemas asociados con la médula ósea.

En otros aspectos, el método de la presente divulgación permite evaluar la eficacia de uno o más fármacos como parte del tratamiento de las enfermedades asociadas con el envejecimiento, incluidas, sin carácter taxativo, la enfermedad cardiovascular, la diabetes, la fibrosis pulmonar, la fibrosis hepática, la neumonía intersticial y la depresión. En el caso de la enfermedad cardiovascular, Brouillette et al. informaron que los hombres de mediana edad con telómeros más cortos que los grupos de control son los que más responden al tratamiento de reducción de lípidos con pravastatina (Brouillette, S. W. et al., Lancet, 2007, 369:107-114). Satoh et al. (Clin. Sci, 2009, 116:827-835), lo que indica que el tratamiento intensivo de reducción de lípidos protegía mejor los telómeros contra la erosión en los pacientes tratados con atorvastatina en comparación con los pacientes sometidos a un tratamiento moderado con pravastatina. El método de la presente divulgación puede usarse para monitorizar la eficacia de las estatinas en los pacientes tratados, donde una menor longitud de los telómeros se correlaciona con una mayor eficacia del fármaco. Dado que los sujetos con los telómeros más largos no respondían positivamente, en promedio, a las estatinas profilácticas, un médico podría indicar al paciente que cumpla de forma especialmente estricta con los hábitos propios de un buen estilo de vida como parte de su programa de tratamiento. Por el contrario, los pacientes con telómeros cortos que temen los efectos secundarios del uso crónico de estatinas podrían verse persuadidos a tomarlas sobre la base de su mayor probabilidad de responder positivamente a ellas. Algunos ejemplos de estatinas que pueden usarse son la niacina (ADVICOR, SIMCOR), la lovastatina (ALTOPREV, MEVACOR), la amolopidina (CADUET), la rosuvastatina (CRESTOR), la sitagliptina/simvastatina (JUVISYNC), la fluvastatina (LESCOL), la pravastatina (PRAVACHOL), la atorvastatina (LIPITOR), la pitavastatina (LIVALO) y la ezetimiba/simvastatina (VYTORTN).

En otros aspectos, puede medirse la efectividad de uno o más fármacos como parte del tratamiento de enfermedades teloméricas, por ejemplo, sin carácter taxativo, la disqueratosis congénita, la fibrosis pulmonar y la anemia aplásica. Por ejemplo, la disqueratosis congénita y la fibrosis pulmonar se tratan con dosis altas de esteroides, que tienen múltiples efectos secundarios adversos bien conocidos. Por ello, es altamente deseable el uso de la menor dosis posible de esteroides, lo que convierte al método de la presente divulgación en una herramienta valiosa para monitorizar a estos pacientes.

5.5 Evaluación de fármacos candidatos

En otro aspecto, la presente divulgación tiene utilidad como método general para la evaluación de candidatos de fármacos, suplementos dietarios y otras intervenciones, incluidos los cambios en el estilo de vida que afectan las vías biológicas que regulan la longitud de los telómeros, como la actividad de la telomerasa. La capacidad de amplificar de forma rápida y específica las repeticiones teloméricas en forma cuantitativa ofrece un método de evaluación de alta capacidad para identificar moléculas pequeñas, ácidos nucleicos candidatos, agentes peptídicos y otros productos o intervenciones que afecten la dinámica de los telómeros en una célula. A igualdad de otros factores, se preferirían para el tratamiento de afecciones degenerativas o relacionadas con la senescencia celular los fármacos u otros productos candidatos que tuvieran un efecto positivo (de alargamiento) sobre las células normales frente a aquellos con efectos de acortamiento de los telómeros (o de inhibición de la telomerasa). En el caso del tratamiento contra el cáncer, se preferirían los fármacos que tengan un efecto negativo (de acortamiento) sobre los telómeros, especialmente los de las células cancerosas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: amplificación de secuencias de telómeros cortos

Aquí describimos un método basado en la PCR cuantitativa que usa ADN genómico purificado para medir el porcentaje de telómeros cortos. Este método incorpora la unión no covalente de un cebador no humano denominado "cebador TeloPrimer" a la saliente 3' de ADN genómico vertebrado, la extensión de tiempo controlado del cebador TeloPrimer hacia una secuencia subtelomérica única (SUS) con una enzima que desplaza o degrada la hebra C del telómero durante la reacción de extensión, y una posterior reacción de amplificación empleando la SUS y la porción de secuencia no humana del cebador TeloPrimer. Únicamente se amplifican los telómeros que son suficientemente cortos para que el producto de extensión del cebador TeloPrimer alcance la SUS. Así, el tiempo controlado de la reacción de desplazamiento de hebra permite la detección de los telómeros de longitud menor a un umbral especificado. Además, al controlar el tiempo de extensión en el paso de PCR con los cebadores SUS y TeloPrimer, se amplifica selectivamente la población de telómeros cortos, lo que aumenta aún más la especificidad de esta determinación para medir los telómeros cortos. La abundancia de telómeros cortos se cuantifica en el análisis T de la prueba TeloTest.

Materiales y métodos

Cebadores

Todos los cebadores se compraron a Integrated DNA Technologies en formato estándar desalado o purificados por HPLC. Las secuencias de los cebadores se enumeran a continuación:

TeloPrimer: 5'-TGCTCGGCCGATCTGGCATCCCTAACC- 3' [ID DE SEC. N.º 7]
 TeloAnchor: 5'-TGCTCGGCCGATCTGGCATC-3' [ID DE SEC. N.º 8]
 SUS (purificado por HPLC): 5'-GATGGATCCTGAGGGTGAGGGTGAGGG-3' [ID DE SEC. N.º 2]
 TeloProbe (purificado por HPLC): 5'-CCCTAACCCTAACCCTAACCCTAA-3' [ID DE SEC. N.º 9]

Apareamiento del cebador TeloPrimer a ADN genómico

Se mezcló ADN genómico con cebador TeloPrimer a una concentración final de 20 ng/μl de ADN y 1 μM de TeloPrimer en una reacción de 50 μl. La mezcla se incubó a 65 °C durante 10 minutos en un bloque calentador y, luego, se enfrió hasta temperatura ambiente a lo largo de un período de una hora. Las muestras con los cebadores apareados se conservaron en hielo hasta la reacción de desplazamiento de hebra.

Desplazamiento de hebra

La reacción de desplazamiento de hebra se realizó en un volumen de 5 μl con 50 ng de ADN con cebadores apareados, Tris-HCl 40 mM, pH 8,0, 10 mM MgCl₂, NaCl 50 mM, DTT 5 mM (NP 70726, Affymetrix, Santa Clara, California, EE. UU.), 100 μg/ml de BSA (n.º de cat. B90015, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts), dNTP 500 μM (n.º de cat. 1708874, Bio-Rad, Hercules, California), proteína de unión a hebra simple (SSB) 5 μM (SSB, n.º de cat. 70032Y 100 UG, Affymetrix, Santa Clara, California) y Sequenase 2.0 400 nM (n.º de cat. 70775Y 200 UN, Affymetrix, Santa Clara, California) (la concentración de Sequenase es de 13 U/μl). La mezcla sin Sequenase 2.0 se precalienta a 37 °C durante un minuto, se agrega Sequenase 2.0 y, luego, la mezcla se incuba a 37 °C durante 30 s a 10 min. La reacción se detiene por inactivación térmica de la enzima a 80 °C durante 20 min.

Amplificación por PCR del producto de desplazamiento de hebra

El producto de la reacción de desplazamiento de hebra se diluyó 50 veces en solución tampón de suspensión de ADN (n.º de cat. T0227, Teknova, Hollister, California). La PCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 40 μl que contiene MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 300 μM (n.º de cat. 1708874, Bio-Rad, Hercules, California), cebador SUS 0,5 μM, cebador TeloAnchor 0,5 μM, 2 μl de ADN diluido, 5 unidades de polimerasa Taq PLATINUM (n.º de cat. 10966-083, Life Technologies, Grand Island, Nueva York).

El programa de ciclado es el siguiente: 2 min a 94 °C; 35 ciclos de 15 s a 94 °C, 30 s a 65 °C y entre 30 segundos y 10 min a 72 °C, seguidos por 10 min de extensión a 72 °C. La reacción de PCR se realiza en un termociclador Bio-Rad C1000 (Bio-Rad, Hercules, California).

Cuantificación del producto de PCR amplificado mediante la prueba TeloTest

Los productos de PCR se diluyeron entre 10 y 1000 veces en una solución tampón de suspensión de ADN. Se usó el

análisis T de la prueba TeloTest para cuantificar los productos de PCR. Fragmentos de PCR que contienen entre 60 y 600 bp de repeticiones teloméricas perfectas se usan como patrón para calcular la concentración de ADN de cada muestra. Se incluirá un patrón interno consistente en un fragmento de ADN de aproximadamente 2 kb con la saliente 3' TTAGGG y una secuencia SUS cerca del extremo 5' en cada muestra desde la reacción de desplazamiento hasta los pasos de qPCR. La eficiencia de reacción de cada muestra se estima por qPCR de una secuencia no humana dentro del patrón interno. Se generará un factor de normalización para cada muestra en base a la eficiencia de la reacción.

Southern blot

Se usó un análisis de Southern blot para confirmar el tamaño del ADN telomérico desplazado. Los productos de desplazamiento de hebra amplificados con los cebadores SUS y TeloAnchor se separaron en un gel de agarosa al 0,5 %, se transfirieron a una membrana de nailon cargada positivamente y se dejaron a 37 °C de un día para el otro para hibridar a una sonda oligonucleotídica marcada con cuatro repeticiones de TTAGGG. Se usó quimioluminiscencia para la detección de la señal.

Resultados

Esquema general

La determinación de telómeros cortos (STA) descrita en la presente cuantifica la cantidad de telómeros cortos en muestras de ADN genómico humano mediante una reacción de desplazamiento de hebra o de degradación de hebra seguida por un análisis por PCR cuantitativa. El esquema general de la determinación se ilustra en la Figura 1.

Para llevar a cabo la determinación, primero se aparea el cebador TeloPrimer a ADN genómico humano. El cebador TeloPrimer contiene 19 nucleótidos de secuencia no humana en el extremo 5' y 8 nucleótidos de secuencia telomérica en el extremo 3'. El uso de ADN genómico nativo garantiza que el cebador TeloPrimer hibride únicamente con la cola de hebra simple 3' (saliente 3') de los telómeros, no con la región de hebra doble. La extensión del cebador TeloPrimer se logra mediante una reacción de desplazamiento de hebra o de degradación de hebra. Dado que es de tiempo limitado, la reacción solo podrá llegar a la región variable de los telómeros en aquellos cromosomas que tengan telómeros cortos. En cambio, en los cromosomas con telómeros largos, los productos de la reacción de desplazamiento de hebra se detendrán dentro de la región de repeticiones teloméricas perfectas. Luego, los telómeros cortos desplazados se enriquecen mediante una reacción de PCR con los cebadores SUS y TeloAnchor. El cebador SUS contiene 3 repeticiones de la secuencia TGAGGG que se encuentran en la mayoría de los cromosomas en la región variable de los telómeros, en la unión entre la región subtelomérica y las verdaderas repeticiones teloméricas, o bien cerca de esta unión. El cebador TeloAnchor comparte la secuencia no humana del cebador TeloPrimer, pero no contiene secuencia telomérica. El par de cebadores SUS y TeloAnchor está diseñado para amplificar específicamente los telómeros cortos sujetos a la reacción de desplazamiento de hebra. Por último, se usa el análisis T de la prueba TeloTest para cuantificar la cantidad de telómeros cortos.

Cuantificación de los productos de desplazamiento de hebra

La amplificación con desplazamiento de hebra es una reacción de síntesis de ADN en la que la polimerasa desplaza el ADN encontrado aguas abajo durante la síntesis. Muchos protocolos, incluidos protocolos de amplificación de genomas completos y análisis forense, usan reacciones de desplazamiento de hebra para amplificar cantidades diminutas de ADN molde. Gracias a la actividad de desplazamiento de hebra de la ADN polimerasa, el ADN con muescas (nicks) o colas de hebra simple puede usarse como molde sin un paso de desnaturalización. Seleccionamos una enzima con desplazamiento de hebra en nuestro diseño experimental porque la cola de hebra simple de los telómeros sirve como molde natural para las enzimas de desplazamiento de hebra y es menos probable que una exonucleasa 5'-3' (enzima degradante) cree huecos en el genoma que podrían causar una amplificación no específica de secuencias intersticiales similares a las teloméricas. El apareamiento del cebador TeloPrimer a las colas de hebra simple de los telómeros en el ADN genómico nativo ubica al cebador TeloPrimer adyacente al extremo 5' de la hebra C (Figura 1). En este diseño, la longitud de los productos de desplazamiento de hebra reflejará con precisión la longitud de los telómeros. Como el tiempo de desplazamiento de hebra se controla, la reacción solo llegará a la región variable de los telómeros en aquellos cromosomas que tengan telómeros cortos. Optamos por usar la enzima Sequenase 2.0, una versión genéticamente diseñada de la ADN polimerasa T7 sin actividad exonucleasa, porque se ha informado que es capaz de sintetizar ADN en un molde lineal con alta especificidad y procesividad (Joneja, A. y X. Huang, Anal Biochem, 2011. 414(1) 58-69). Realizamos un experimento de evolución temporal en el que la reacción de desplazamiento de hebra continuó durante un tiempo variable entre 30 segundos y 5 minutos. ADN genómico de la línea celular de cáncer de vejiga UM-UC3 se apareó con el cebador TeloPrimer y se realizó una reacción de desplazamiento de hebra como se indica en la sección Materiales y métodos.

La Figura 2 muestra que la cantidad de productos teloméricos medidos con el análisis T de la prueba de qPCR TeloTest aumenta al aumentar el tiempo de la reacción de desplazamiento de hebra. Un análisis de regresión lineal muestra una relación estrecha entre el tiempo de la reacción y la abundancia del amplicón ($R^2 = 0,99$). Además, en el control negativo, al que no se agregó enzima Sequenase 2.0, no se detectó producto de PCR en el análisis T de la prueba TeloTest (punto de cruce $[C_p] = 25$, concentración calculada $1,85E-07$, que es 159 veces menor que la mínima concentración medida en las reacciones que contenían la enzima Sequenase 2.0). Una reacción paralela usando los cebadores del gen de copia única (beta globulina) en el análisis S de la prueba TeloTest tampoco mostró producto de amplificación, lo que confirma nuevamente que los productos teloméricos medidos en el análisis T derivan de la reacción de desplazamiento de hebra y no del ADN genómico total.

El diseño experimental propuesto predice que, cuando el tiempo de la reacción de desplazamiento de hebra es corto, únicamente los productos de los telómeros cortos se amplifican con los cebadores SUS y TeloAnchor. Buscamos confirmar esto mediante un análisis de Southern blot. Los productos de desplazamiento de hebra amplificados con los cebadores SUS y TeloAnchor se separaron en un gel de agarosa al 0,5 %, se transfirieron a una membrana de nailon cargada positivamente y se hibridaron a una sonda oligonucleotídica marcada con cuatro repeticiones de TTAGGG. La Figura 3 muestra que la longitud de los productos de PCR amplificados aumenta al aumentar el tiempo de desplazamiento de hebra. Las modas (picos de intensidad) estimadas de los productos de PCR son aproximadamente 0,6 kb, 0,9 kb, 1,2 y 1,4 kb con un tiempo de desplazamiento de 0,5 minutos, 1 minuto, 3 minutos y 5 minutos, respectivamente. Con un tiempo de desplazamiento de 1 minuto, la mayoría de los productos tienen menos de 2 kb. En un ensayo de comparación independiente, usamos un protocolo de análisis de longitud de extensión de telómeros individuales (STELA) modificado (Baird, D.M., et al., Nat Genet., 2003. 33(2) 203-7) para analizar el perfil de longitudes de telómeros del ADN genómico total de la misma línea celular de cáncer, UM-UC3. El cebador TeloPrimer se ligó al extremo 5' de la hebra C y los cebadores XpYpE2 y TeloAnchor se usaron para amplificar los telómeros. El producto de PCR se separó en el gel (calle 1 en la Figura 3). Esto reveló que la moda de los telómeros en las células UM-UC3 es de aproximadamente 1,8 kb, consistente con valores informados anteriormente (Xu, L. y E.H. Blackburn, Mol Cell, 2007. 28(2) 315-27).

Para validar más la determinación de telómeros cortos, realizamos esta determinación con dos muestras de ADN genómico. Además del ADN de células UM-UC3, usamos ADN genómico de células UM-UC3 infectadas con un vector lentiviral que expresa el gen de ARN de la telomerasa hTER, lo que produce una extensión de los telómeros (Xu, L. y E.H. Blackburn, Mol Cell, 2007. 28(2) 315-27). La longitud promedio de los telómeros medida por qPCR en células UM-UC3/hTER es de 2,1, frente a 0,56 en el caso de las células UM-UC3 (datos de Telomere Health Inc.). Las células UM-UC3/hTER tienen un porcentaje menor de telómeros cortos de acuerdo con un análisis por Southern blot (Figura 5). En consistencia con ello, la cantidad calculada de telómeros cortos en las células UM-UC3 es 3 veces mayor que en las células UM-UC3/hTER (Figura 4).

Concluimos que la determinación de telómeros cortos mide de forma específica el porcentaje relativo de telómeros cortos. Además, al controlar el tiempo de la reacción de desplazamiento de hebra, puede variarse y predeterminarse el umbral de longitud de los telómeros que se medirán con la determinación

La determinación de telómeros cortos descrita anteriormente puede adaptarse fácilmente a un formato automatizado que genere grandes volúmenes de datos. La Figura 6 muestra los pasos individuales en este formato.

Aunque aquí se han mostrado y descrito aspectos preferentes de la presente invención, será evidente para la persona versada en la técnica que tales aspectos se proveen únicamente a modo de ejemplos. La persona versada en la técnica podría idear múltiples variantes, cambios y sustituciones sin apartarse de la divulgación. Debe entenderse que, al poner en práctica la invención, podrían emplearse distintas variantes de los aspectos de la invención descritos en la presente. Se pretende que las reivindicaciones siguientes definan el alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Telome Health, Inc. Harley, Calvin Lin, Jue Hu, Yajing

<120> MEDIDAS DE ABUNDANCIA DE TELÓMEROS CORTOS

<130> 37502.0001P1-

<160> 14

<170> PatentIn, versión 3.5

5 <210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> constructo sintético; cebador

15 <400> 1
gttgtctcag ggtcctagtg 20

20 <210> 2
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> constructo sintético; cebador

25 <400> 2
gatggatcct gagggtaggg gtagggg 27

30 <210> 3
<211> 37
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> constructo sintético; cebador

35 <400> 3
ggtttttgag ggtgagggtg agggtagggg tgagggt 37

40 <210> 4
<211> 39
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> constructo sintético; cebador

45 <400> 4
tcccgactat ccctatccct atccctatcc ctatcccta 39

50 <210> 5
<211> 39
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> constructo sintético; cebador

55 <400> 5
cggtttgggt gggttgggt ttgggttgg gttgggtt 39

60 <210> 6
<211> 39
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético; cebador
 <400> 6
 ggcttgccctt acccttacc ttaccctac ccttaccct 39
 5
 <210> 7
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> constructo sintético; cebador
 <400> 7
 15 tgctcggccg atctggcatc cctaacc 27
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> constructo sintético; cebador
 <400> 8
 25 tgctcggccg atctggcatc 20
 <210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> constructo sintético; cebador
 <400> 9
 35 ccctaaccct aaccctaacc ctaa 24
 <210> 10
 <211> 23
 40 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> constructo sintético; cebador
 45 <400> 10
 cgggccggct gaggtaccg cga 23
 <210> 11
 50 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> constructo sintético; cebador
 <400> 11
 gctaatacac tccctaata c 21
 60 <210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

ES 2 762 860 T3

<220>
 <223> constructo sintético; cebador
 5 <400> 12
 cattcctaatt gcacacatga tacc 24
 <210> 13
 <211> 40
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> constructo sintético; cebador
 15 <400> 13
 acactaagggt ttgggtttgg gttgggttt gggtagtgt 40
 <210> 14
 <211> 42
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> constructo sintético; cebador
 25 <400> 14
 tgtaggtat ccctatccct atccctatcc ctatccctaa ca 42
 30

REIVINDICACIONES

1. Un método para amplificar secuencias repetitivas teloméricas y secuencias subteloméricas de un cromosoma que comprende:

a) crear un producto de extensión de ácidos nucleicos mediante los pasos de:

i) hibridar un cebador de extensión con una secuencia repetitiva telomérica en una saliente 3' de ADN cromosómico de hebra doble, donde:

(1) el ADN cromosómico de hebra doble tiene una región telomérica que comprende secuencias repetitivas teloméricas y una región subtelomérica que comprende secuencias subteloméricas; y

(2) el cebador de extensión comprende:

(A) una porción 3' que hibrida con una secuencia repetitiva telomérica en la saliente 3' en condiciones de apareamiento, y

(B) una porción 5' que tiene una secuencia de anclaje que no hibrida con una secuencia repetitiva telomérica en la saliente 3' en las condiciones de apareamiento; y

ii) realizar una reacción de extensión con desplazamiento de hebra de tiempo controlado para extender el cebador de extensión hacia la región subtelomérica del ADN cromosómico de hebra doble, donde el tiempo de la reacción de extensión se controla de manera de generar un producto de extensión que comprende tanto secuencias repetitivas teloméricas como secuencias subteloméricas solo en el caso del ADN cromosómico de hebra doble que tenga una región telomérica cuya longitud esté comprendida dentro de un rango predeterminado; y

b) amplificar mediante una reacción de PCR ulterior las secuencias del producto de extensión, produciendo así un producto de amplificación de longitud limitada que comprende ácidos nucleicos con secuencias repetitivas teloméricas y secuencias subteloméricas,

donde el tiempo de dicha reacción de extensión de tiempo controlado se controla de manera de generar un producto de extensión cuya longitud esté dentro de un rango predeterminado, donde el tiempo de la reacción de extensión se controla en 0,1 a 30 minutos, 0,1 a 10 minutos, 0,1 a 5 minutos, 0,1 a 4 minutos, 0,1 a 3 minutos, 0,1 a 2 minutos, no más de 0,1 a 1 minuto, o 0,1 a 0,5 minutos.

2. El método de la reivindicación 1, donde las secuencias se amplifican mediante:

(1) un primer cebador de amplificación que hibrida con una secuencia exclusiva de la región subtelomérica en el producto de extensión en condiciones de apareamiento; y

(2) un segundo cebador de amplificación que hibrida con la secuencia de anclaje en las condiciones de apareamiento.

3. El método de la reivindicación 2, donde el primer cebador de amplificación comprende la secuencia

5'-GATGGATCCTGAGGGTGAGGGTGAGGG-3' [ID DE SEC. N.º 2],
5'-CGGGCCGGCTGAGGGTACCGCGA-3' [ID DE SEC. N.º 10] (cromosoma 1),
5'-GCTAATGCACTCCCTCAATAC-3' [ID DE SEC. N.º 11] (cromosoma 5), o
5'-CATTCCTAATGCACACATGATACC-3' [ID DE SEC. N.º 12] (cromosoma 9).

4. El método de la reivindicación 2, donde el primer cebador de amplificación comprende la secuencia 5' GATGGATCCTGAGGGTGAGGGTGAGGG-3' [ID DE SEC. N.º 2] y el segundo cebador comprende la secuencia 5'-TGCTCGGCCGATCTGGCATC-3' [ID DE SEC. N.º 8].

5. El método de la reivindicación 1, donde el rango de longitudes de los productos teloméricos amplificados puede determinarse mediante el control del tiempo de extensión en la reacción de PCR.

6. El método de la reivindicación 1, que comprende, además, coamplificar una secuencia de control.

7. El método de la reivindicación 6, donde la secuencia de control comprende múltiples secuencias repetitivas no teloméricas.

8. Un método para determinar la abundancia de telómeros cortos que comprende:
 - a) proveer una muestra obtenida de un sujeto que comprende ADN cromosómico de hebra doble que comprende una saliente 3';
 - b) producir un producto de amplificación de longitud limitada a partir del ADN cromosómico de hebra doble usando un método de acuerdo con la reivindicación 1; y
 - c) determinar la abundancia de telómeros cortos a partir del producto de amplificación de longitud limitada.
9. El método de la reivindicación 8, que comprende, además:
 - d) comparar la medida de la abundancia de telómeros cortos con una medida de la abundancia total de telómeros de la muestra.
10. El método de la reivindicación 9, donde el paso d) comprende determinar la abundancia de telómeros cortos en función de la abundancia total de telómeros.
11. El método de la reivindicación 8, donde el paso de determinar la abundancia de telómeros cortos se realiza mediante qPCR.
12. El método de la reivindicación 11, donde la qPCR se realiza empleando un primer cebador y un segundo cebador,
 - i) donde dicho primer cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha primera hebra y dicho segundo cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha segunda hebra,
 - ii) donde dichos cebadores hibridados son susceptibles de extensión al hibridar con sus hebras respectivas, y donde al menos un nucleótido de dicho primer cebador produce un desapareamiento de un par de bases interno entre dicho primer cebador y un nucleótido de dicha unidad repetitiva, donde dicho primer cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha primera hebra,
 - iii) donde dicho primer cebador también produce un desapareamiento con el nucleótido terminal 3' de dicho segundo cebador cuando el primer cebador y el segundo cebador hibridan entre sí,
 - iv) donde al menos un nucleótido de dicho segundo cebador produce un desapareamiento de un par de bases interno entre dicho segundo cebador y un nucleótido de dicha unidad repetitiva cuando dicho segundo cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha segunda hebra.
13. El método de la reivindicación 8, donde el paso de determinar la abundancia de telómeros cortos comprende medir la longitud promedio de telómeros en la muestra mediante Southern blot, dot blot, slot blot, inmunoquímica, secuenciación de ácidos nucleicos o PCR digital.
14. El método de la reivindicación 8, donde la abundancia de telómeros cortos es una medida de abundancia relativa.
15. El método de la reivindicación 9, donde la abundancia total de telómeros se mide en relación a la abundancia de una secuencia de referencia genómica.
16. El método de la reivindicación 15, donde la secuencia de referencia genómica comprende una secuencia de nucleótidos de referencia de copia única o una secuencia de ADN repetitiva no telomérica.
17. El método de la reivindicación 16, donde la secuencia de nucleótidos de referencia de copia única es la beta globulina humana.
18. Un método que comprende:
 - a) proveer una muestra obtenida de un sujeto;
 - b) determinar la abundancia de telómeros cortos usando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16; y
 - c) correlacionar la abundancia de telómeros cortos con una afección o enfermedad.
19. El método de la reivindicación 18, donde la medición de la abundancia de telómeros cortos se determina comparando la abundancia de telómeros cortos con la abundancia total de telómeros de la muestra.
20. El método de la reivindicación 18, donde la afección o enfermedad es el riesgo de mortalidad.

21. El método de la reivindicación 18, donde la abundancia de telómeros es una abundancia absoluta.
- 5 22. El método de la reivindicación 21, donde la abundancia absoluta se mide como la longitud de las secuencias teloméricas.
23. El método de la reivindicación 18, donde la afección es el riesgo de padecer una enfermedad.
- 10 24. El método de la reivindicación 23, donde el riesgo de padecer una enfermedad es el riesgo de padecer una enfermedad relacionada con la edad.
25. El método de la reivindicación 24, donde la enfermedad relacionada con la edad es una enfermedad cardiovascular y donde una medida menor al promedio en una población se correlaciona con un mayor riesgo de padecer dicha enfermedad cardiovascular.
- 15 26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25 que comprende, además, dar al sujeto un diagnóstico o un pronóstico en base a la correlación.
- 20 27. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 26 que comprende, además, tratar al sujeto en base a la correlación.
28. Un método que comprende:
 - 25 a) proveer múltiples muestras obtenidas de un sujeto; donde las muestras se toman a lo largo de un período de tiempo; y donde cada muestra se obtiene en un momento diferente;
 - b) determinar la abundancia de telómeros cortos en cada una de las múltiples muestras usando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16;
 - c) determinar un ritmo de cambio en las medidas de abundancia de telómeros cortos; y
 - 30 d) correlacionar el ritmo de cambio con: (1) una medida del estado de salud; (2) un riesgo de padecer una afección patológica; (3) una enfermedad telomérica; o (4) la respuesta a uno o más fármacos.
29. El método de la reivindicación 28, donde la abundancia de telómeros cortos se determina comparando la abundancia de telómeros cortos con la abundancia total de telómeros de la muestra.

35

FIG. 1

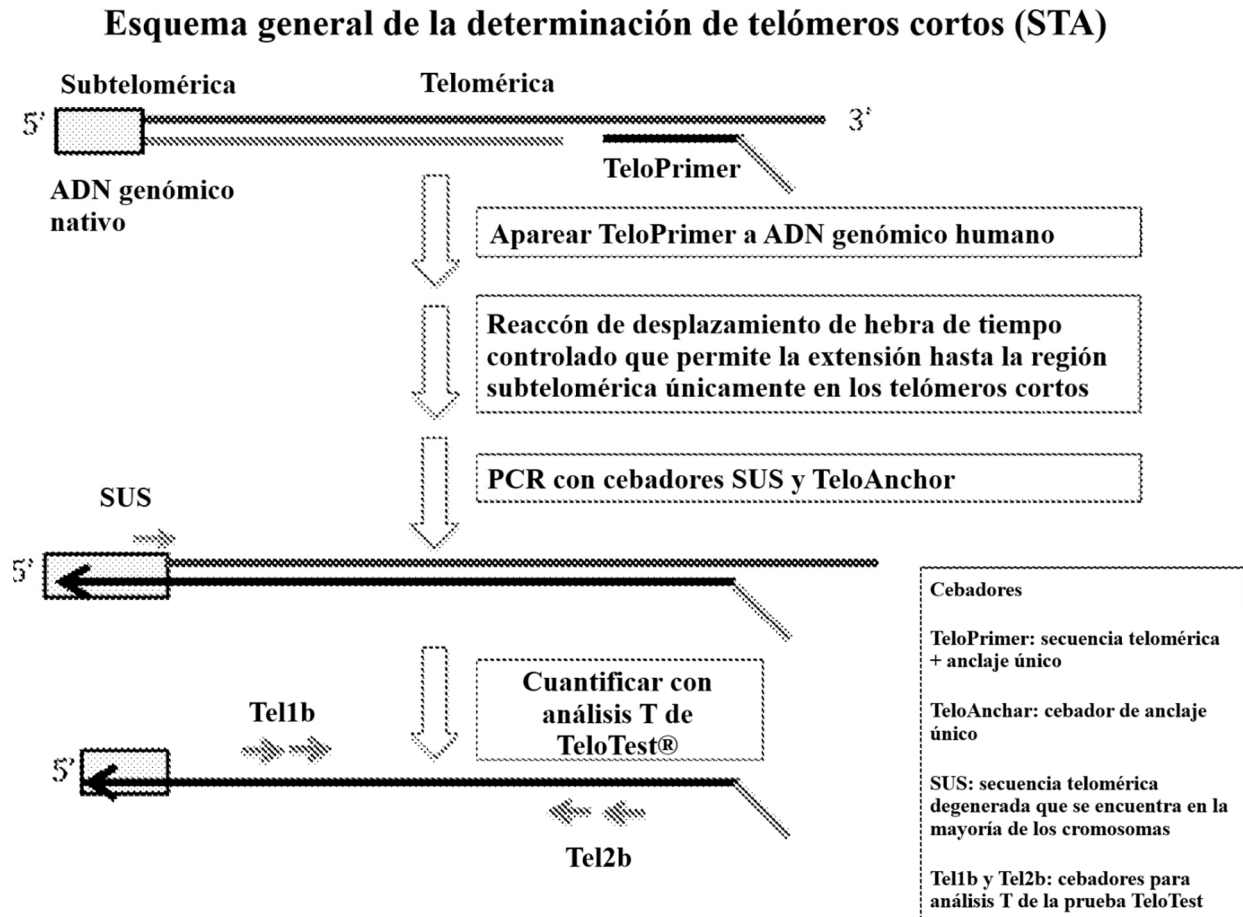


FIG. 2

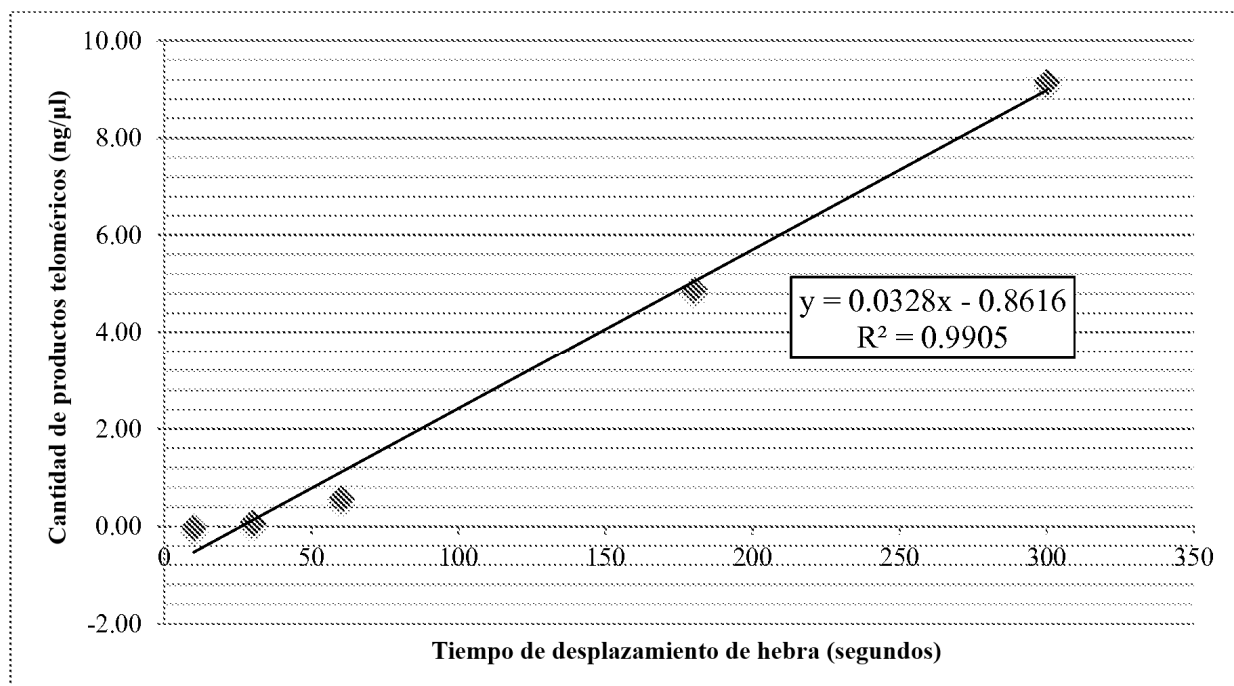


FIG. 3

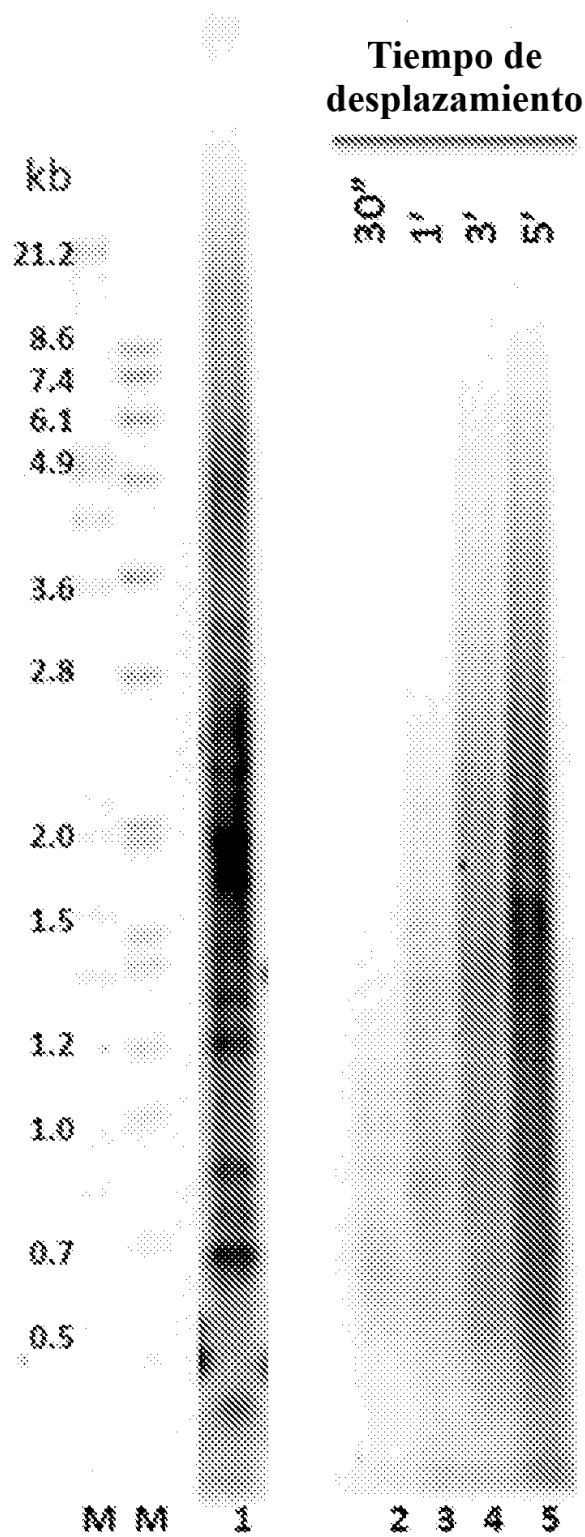


FIG. 4

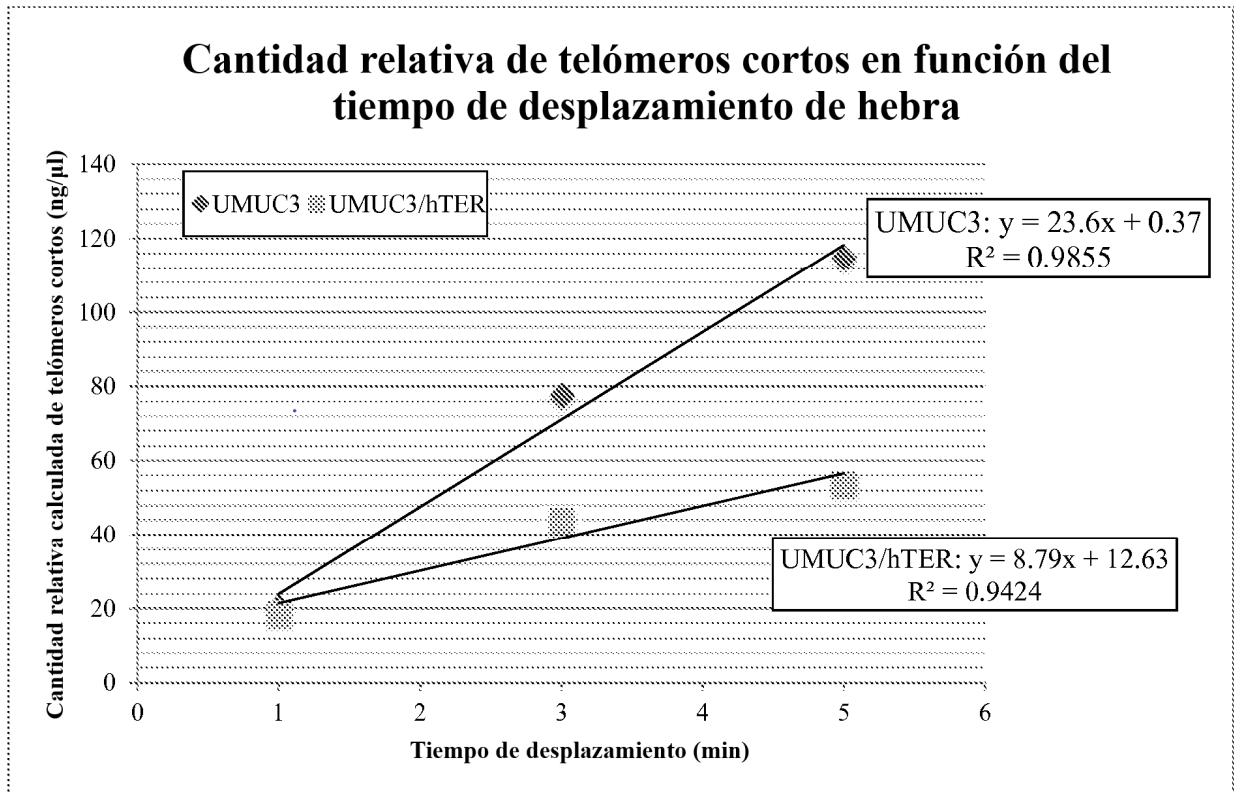


FIG. 5

Porcentaje de telómeros cortos	UMUC3	UMUC3/hTER
Southern blot (0,2 a 5 kb)	75 %	26 %
Determinación de telómeros cortos	100 %	33 %

FIG. 6

PASO	DESCRIPCIÓN	¿AUTOMÁTICO O MANUAL?
Apareamiento	1.1. Pipetear ADN _g y mezclar con TeloPrimer y agua	Automático
	1.2. Incubar a 65 °C durante 10 min y enfriar lentamente	
Desplazamiento de hebra	2.1. Pipetear la mezcla madre con Sequenase 2.0/SSB/solución tampón	Automático
	2.2. Pipetear ADN _g y mezclar	Automático
	2.3. Sellar la placa	Manual
	2.4. Incubar a 37 °C durante 3 minutos	Manual
	2.5. Transferir la placa a 80 °C durante 20 minutos	Manual
PCR con cebadores SUS y TeloAnchor	3.1. Diluir las muestras del paso 2.5 con Tris con baja concentración de EDTA	Automático
	3.2. Pipetear la mezcla madre de PCR a una placa de 96 pocillos	Automático
	3.3. Pipetear el ADN diluido del paso 3.1 a una placa de 96 pocillos del paso 3.2	Automático
	3.4. Sellar ambas placas	Automático
	3.5. Transferir la placa de PCR al termociclador	Manual
	3.6. PCR	Manual
TeloTest	4.1. Diluir los productos de PCR del paso 3.6 con Tris con baja concentración de EDTA	Automático
	4.2. Realizar el análisis T de la prueba TeloTest [®] con las muestras diluidas del paso 4.1.	Automático

FIG. 7A

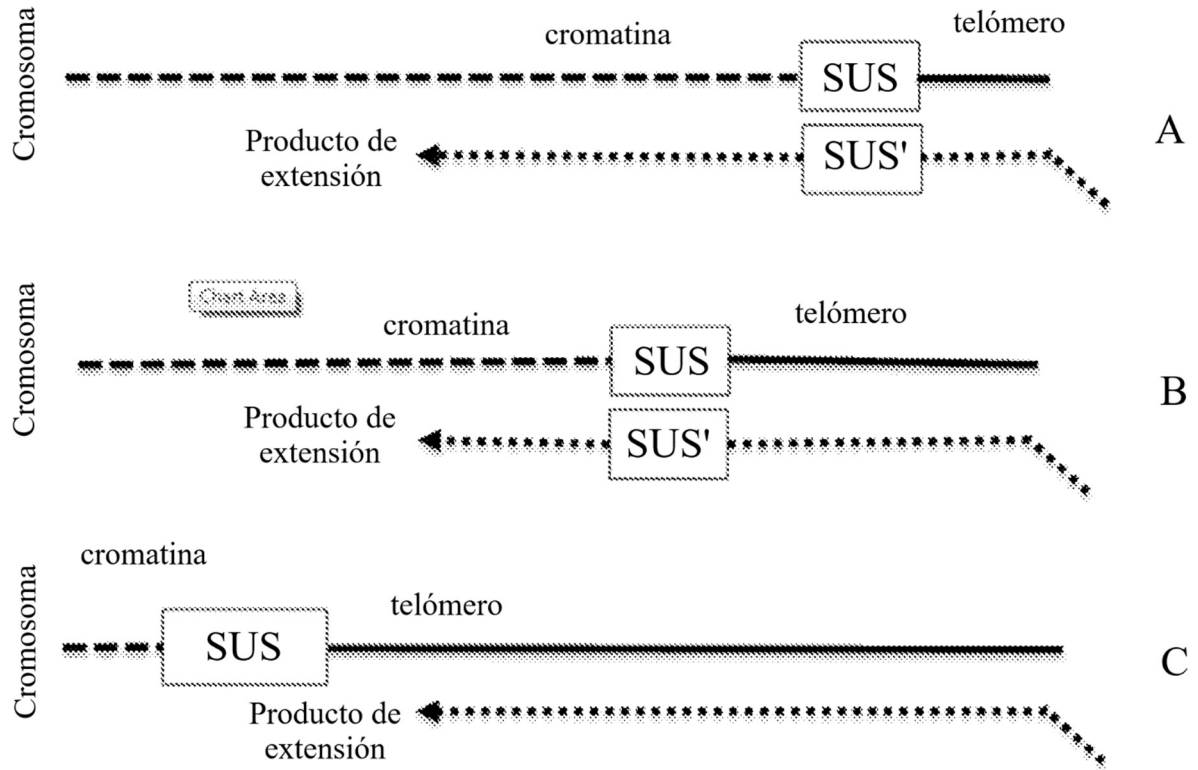


FIG. 7B

