

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 951 971**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6841** (2008.01)

**G16B 5/00** (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.12.2019 PCT/EP2019/087005**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2020 WO20136192**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2019 E 19831757 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3902925**

54 Título: **Método para medir variables asociadas a los telómeros y usos del mismo para el diagnóstico y/o el pronóstico de enfermedades asociadas a los telómeros**

30 Prioridad:

**26.12.2018 EP 18382992**

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

**26.10.2023**

73 Titular/es:

**LIFE LENGTH S.L. (100.0%)  
Calle Miguel Ángel 11 2nd floor  
28010 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**NAJARRO PARRA, MARÍA PILAR;  
FERNÁNDEZ CANIVELL, LUIS;  
ESTEBAN LA FUENTE, LAURA;  
DE PEDRO MONTEJO, NURIA;  
DIEZ ZAERA, MARÍA y  
GARCIA MARTÍNEZ, JORGE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 951 971 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para medir variables asociadas a los telómeros y usos del mismo para el diagnóstico y/o el pronóstico de enfermedades asociadas a los telómeros

5 La invención se refiere a métodos *in vitro* para la determinación de los valores específicos de Variables asociadas a los telómeros (VAT) que se pueden correlacionar con: una medida de salud; un riesgo de una afección patológica; una enfermedad telomérica o la respuesta a fármacos. Particularmente, la presente invención se refiere a métodos *in vitro* para diagnosticar y/o evaluar la aparición y/o la gravedad de enfermedades asociadas a los telómeros. La presente  
10 invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular, la biotecnología y la medicina.

**Antecedentes de la técnica**

15 Los telómeros, las puntas de los cromosomas eucariotas, protegen los cromosomas de la degradación nucleolítica, la fusión de extremo a extremo y la recombinación. Los telómeros se acortan como consecuencia de la división celular normal y los telómeros críticamente cortos conducen a la senescencia celular o a la apoptosis. Este proceso ocurre porque la maquinaria de replicación del ADN es incapaz de replicar totalmente los extremos de las moléculas lineales, y, como resultado se produce la degradación y el daño oxidativo de los nucleótidos en el ADN. Los telómeros críticamente cortos desencadenan la pérdida de viabilidad celular en los tejidos, que se ha relacionado con la alteración  
20 de la función tisular y la pérdida de capacidades regenerativas en el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Por lo tanto, la longitud de los telómeros es un biomarcador importante para el envejecimiento que puede usarse en el pronóstico de las enfermedades del envejecimiento. Por otro lado, las células cancerosas previenen el acortamiento de los telómeros mediante la activación de los mecanismos de elongación de los telómeros, que son dianas importantes para las terapias contra el cáncer. Los hechos anteriores resaltan la importancia de medir con precisión la longitud de los telómeros en los estudios del cáncer y de enfermedades relacionadas con la edad.

Una gran cantidad de estudios epidemiológicos y clínicos en seres humanos en la última década ha vinculado la longitud corta de los telómeros con un riesgo elevado de cáncer y enfermedades relacionadas con el envejecimiento y mortalidad por todas las causas. Los factores genéticos, medioambientales, de estilo de vida y conductuales repercuten colectivamente en la longitud de los telómeros. Por lo tanto, la longitud de los telómeros se ha convertido  
30 en un índice de salud general, riesgo de enfermedad y mortalidad. Aunque la longitud de los telómeros promedio se midió en casi todos los estudios clínicos publicados y ha demostrado su utilidad para estratificar el riesgo de enfermedad y mortalidad de los pacientes, otros trabajos han demostrado que la cantidad de telómeros cortos, y no la longitud de los telómeros promedio, es uno de los factores críticos para la viabilidad celular y la estabilidad cromosómica (Hemann, M.T., *et al.* Cell, 2001. 107(1) 67-77). Por lo tanto, se espera que los cambios en el porcentaje de abundancia de telómeros cortos sean una medición más sensible de los efectos de las intervenciones sobre el estilo de vida y farmacológicas o de otro tipo sobre los telómeros (Vera E., *et al.* Cell Rep. 25 de oct de 2012; 2(4):732-7). En este sentido, las variables teloméricas, tales como el análisis de la longitud de los telómeros y el porcentaje de abundancia de telómeros cortos en una muestra, se han utilizado como biomarcadores para permitir mejoras en las  
40 evaluaciones de riesgo de diversos resultados de salud. Sin embargo, la utilidad de la medida depende de técnicas válidas y fiables para cuantificar estas variables teloméricas.

Se han desarrollado diversos métodos para la medición de la longitud de los telómeros y el porcentaje de abundancia de telómeros cortos en el ADN genómico, incluyendo la transferencia Southern, qPCR, Q-FISH, FISH de flujo y HT Q-FISH. Todos estos métodos se pueden usar en un entorno clínico para controlar el estado de salud y permitir que los  
45 médicos prescriban una intervención profiláctica o terapéutica adaptada a las necesidades del paciente individual.

La técnica de qPCR usa cebadores para la región de los telómeros y un gen de una sola copia (puede estar en el mismo cromosoma o en un cromosoma diferente). Las técnicas basadas en PCR se han convertido en un método popular para estimar la longitud de los telómeros debido a su coste relativamente bajo, a la disponibilidad para ensayos de alto rendimiento y a la relativa facilidad de acceso de los investigadores al equipo necesario utilizado en el ensayo. Aunque las técnicas basadas en PCR son adecuadas para grandes estudios epidemiológicos, los resultados son difíciles de comparar entre estudios. Esta limitación se debe a las diferencias en la calidad del ADN basándose en el método utilizado para la extracción del ADN genómico, así como a las diferencias en los métodos de fijación de  
55 muestras en el caso de muestras de tejido fijadas e incluidas en parafina y por su nivel relativamente elevado de variación entre estimaciones repetidas.

La FISH de flujo, como su nombre indica, combina la metodología de citometría de flujo con la hibridación de una sonda pantelomérica (se une a todos los telómeros) con células en una suspensión (en lugar de hibridarse con células fijadas a portaobjetos, como se hace para Q-FISH en metafase e interfase). La metodología de FISH de flujo normalmente usa la misma sonda de ANP (CCCTAA)<sub>3</sub> telomérica utilizada en otros enfoques de Q-FISH para cuantificar la cantidad media de fluorescencia presente en las células. Este valor se usa después para proporcionar una longitud de los telómeros promedio para la población de células que se está evaluando. Una fortaleza de este enfoque es que tiene la capacidad de clasificar las células en subpoblaciones basándose en el tamaño, la granulación y/o el marcaje de anticuerpos. Como resultado de este potencial, la FISH de flujo se ha utilizado ampliamente para determinar la longitud de los telómeros promedio en subtipos de células hematopoyéticas. La FISH de flujo es también

el primero de los ensayos de telómeros que se usa como herramienta de diagnóstico clínico, usándose el método para ayudar con el reconocimiento de pacientes que tienen disqueratosis congénita, una afección que se asocia a longitudes de los telómeros más cortas. La FISH de flujo tiene limitaciones que pueden comprometer la idoneidad para su uso en investigaciones/estudios clínicos. Específicamente, las células no fijadas pueden ser difíciles de procesar (fragilidad, aglomeración, etc.), pero la técnica es sensible a los fijadores utilizados para conservar las células, reflejando la fiabilidad de las medidas estos parámetros técnicos. Además, se ha demostrado que la sonda de ANP utilizada en FISH de flujo demuestra una unión no específica a las estructuras citoplásmicas. Por lo tanto, se ha sugerido que los núcleos aislados, en lugar de las células intactas, pueden ser óptimos para la evaluación con esta metodología. Debido a los problemas técnicos indicados anteriormente, la FISH de flujo no es fácilmente adaptable para su uso en una amplia gama de tipos celulares, siendo su aplicación principalmente para su uso con muestras de sangre fresca. Además, como muchas de las demás técnicas, este método proporciona únicamente un valor medio de la intensidad de los telómeros y no proporciona información con respecto a los telómeros individuales o un subconjunto de telómeros acortados.

Las metodologías de Q-FISH usan una sonda específica para la región telomérica de las células en propagación de la metafase para estimar la longitud basándose en histogramas de las intensidades de las señales de los telómeros que representan la longitud de los telómeros individuales. Aunque la sonda tiende a ser específica para la región telomérica, es posible que la sonda pueda unirse a una porción de la región yuxtapuesta (especialmente, la región de repetición degenerada). Las limitaciones de este método son que se necesitan células vivas, los costes son elevados y el rendimiento es bajo. Por lo tanto, este procedimiento no es adecuado para estudios epidemiológicos grandes.

Para superar algunas de las limitaciones de la Q-FISH, se han desarrollado adaptaciones de este procedimiento, implicando estas adaptaciones el uso de células en interfase en lugar de cromosomas en metafase. La Q-FISH en interfase es adecuada para evaluar la longitud de los telómeros en los núcleos de múltiples tipos de muestras de ensayo (células sanguíneas; fijadas en formol; tejidos incluidos en parafina; tejidos congelados). Una clara ventaja de usar la metodología de Q-FISH en interfase es que permite recoger información sobre la longitud de los telómeros e información histológica simultáneamente, que tiene el potencial de combinarse con técnicas de inmunotinción para localizar células específicas de interés (en ocasiones denominadas "telocartografiado", (Vera E., *et al.* Cell Rep. 25 de oct de 2012; 2(4):732-7). Una desventaja del método de Q-FISH en interfase es que no permite el reconocimiento de telómeros específicos y no permite la detección de extremos libres de telómeros. Además, los datos se presentan normalmente como un valor medio, puesto que la superposición de los 92 telómeros puede impedir que se reconozca inequívocamente cada telómero individual. Sin embargo, la Q-FISH en interfase requiere menos mano de obra que la Q-FISH en metafase, siendo las adaptaciones recientes de esta técnica, denominadas Q-FISH de alto rendimiento (HT), susceptibles de automatización y para su uso en estudios epidemiológicos más grandes.

Aunque hasta ahora, las principales variables teloméricas utilizadas como biomarcadores útiles para el diagnóstico y/o el pronóstico de cáncer y enfermedades relacionadas con el envejecimiento son la longitud de los telómeros y el porcentaje de abundancia de telómeros cortos en el ADN genómico, que se pueden determinar mediante los métodos mencionados anteriormente. Sigue existiendo la necesidad de variables teloméricas más fiables, precisas y eficientes para su uso como biomarcadores para el diagnóstico y/o el pronóstico de cáncer y enfermedades relacionadas con el envejecimiento, que puedan analizarse mediante un método de alto rendimiento, rápido, fiable, preciso y eficiente.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método *in vitro* mejorado para medir VAT específicas. Los métodos *in vitro* de la invención pueden realizarse rápidamente y proporcionan una mayor sensibilidad, eficacia, fiabilidad y precisión. Asimismo, estos métodos *in vitro* son susceptibles de automatización y formatos de alto rendimiento y proporcionan, en algunas realizaciones, un medio para medir las VAT de un cromosoma individual, para comparar la varianza inter cromosómica en las VAT específicas y para medir las VAT específicas de una población celular específica dentro de una mezcla de células. La presente invención proporciona numerosas ventajas sobre todos los demás métodos de medición de la longitud de los telómeros:

- Es única ya que permite la determinación de un perfil distintivo de cada una de las VAT y su análisis individual y combinado, tal como su tratamiento de Análisis de componentes principales. El método de la invención se basa en la introducción de un conjunto de muestras biológicas patrón aisladas de longitud de los telómeros conocida para evaluar sus intensidades de fluorescencia (mediante el procedimiento mencionado en los ejemplos de la presente invención) y después convertir esa intensidad de fluorescencia en longitud absoluta expresada como pares de bases (pb) gracias a la curva patrón construida emparejando las intensidades de fluorescencia de cada muestra con su valor de longitud real. Posteriormente, el análisis se realiza en miles de puntos de telómeros individuales derivados de los datos. El método *in vitro* de la invención es la única metodología que puede obtener dispersión (en pb), percentiles (en pb), % de células con una longitud de los telómeros definida (en pb), % de telómeros con una longitud de los telómeros definida (en pb), el intervalo intercuartílico (en pb) o cualquier otra VAT conocida.
- A diferencia de la FISH de flujo, TRF, STELA y qPCR, hace posible detectar y registrar la distribución completa de la longitud de los telómeros en una muestra biológica y evaluar las diferencias en las relaciones y proporciones de las poblaciones de telómeros cortos y largos globalmente y en cualquier fracción de las células en la muestra.
- A diferencia de la qPCR que da un único valor promedio de la longitud relativa de los telómeros, el método *in vitro*

de la invención usa una curva patrón interna que da como resultado la determinación exacta de las longitudes de los telómeros absolutas en pares de bases de cada telómero.

- A diferencia de los métodos basados en gel que miden características limitadas de la longitud de los telómeros, tales como TRF y STELA, el método *in vitro* de la invención es una metodología escalable, aplicada industrialmente y puede automatizarse.
- A diferencia de la FISH de flujo, no se limita a medir la señal promedio de los telómeros de una célula sino la longitud del telómero absoluta en pb de cada telómero de cada célula individualmente.
- Asimismo, el método puede aplicarse a cualquier tipo celular.

Los datos presentados en el presente documento muestran que las VAT específicas, derivadas de miles de intensidades de los telómeros individuales expresadas como valor absoluto en pares de bases y analizadas dentro de células y grupos de células, tienen una distribución definida que es específica y que la forma de esta distribución determina el estado de la enfermedad de dichas células o grupo de células. Esto se debe a la variación específica de las VAT asociada a la división celular tanto normal como anormal. La longitud de los telómeros y su capacidad para proteger el genoma se modifican en las células tumorales de manera que las variables particulares asociadas a la distribución de las VAT pueden determinarse y analizarse en una muestra biológica dada, permitiendo la aplicación de estos valores para determinar el estado de salud de los sujetos. Por lo tanto, basándose en los presentes hallazgos, ahora es posible examinar y cuantificar de forma fiable la presencia o ausencia de las VAT específicas individuales mencionados en el presente documento en núcleos en interfase y controlarlos a lo largo del tiempo. Dichas nuevas vías tendrán una repercusión en la biología del cáncer, la genética y las innovaciones en diagnóstico y/o pronóstico en medicina.

El método de la presente invención usó microscopía de fluorescencia de alta resolución y formación de imágenes para dilucidar la longitud individual de los telómeros y cromosomas en los núcleos en interfase de las células analizadas medida en unidades absolutas, es decir, pares de bases. Se ha encontrado que los telómeros de las células de ensayo tienen una distribución definida y que esta distribución difiere de sus homólogos normales.

Los resultados obtenidos en los presentes estudios muestran que las VAT específicas de la invención, medidas en pares de bases, analizadas en una célula o en un grupo de células se correlacionan con gran precisión con una medida de salud, un riesgo de una afección patológica, una enfermedad telomérica o la respuesta a un fármaco.

Además, en el presente documento se desvelan métodos y sistemas para determinar con una precisión elevada una medida de salud; un riesgo de una afección patológica; una enfermedad telomérica o la respuesta a fármacos basándose en la medición de la longitud de los telómeros individual en pares de bases absolutos y el cálculo de VAT específicas que comprenden al menos uno de la lista seleccionada de: los percentiles de longitud de los telómeros del 1 al 99, los porcentajes de valores de longitud telomérica que se pueden especificar para un intervalo o número de pb particular, los porcentajes de células con una mediana de valor o un valor promedio de telómeros específicos que se pueden especificar en un valor de pb particular, la desviación absoluta de la mediana de las intensidades de una muestra, la diferencia entre el percentil 99 y el 1 de la longitud de los telómeros de la muestra, el intercuartil de la longitud de los telómeros de una muestra, la desviación típica de la mediana de los valores de longitud de los telómeros, o cualquier combinación de los mismos.

El método que se desvela en el presente documento permite; 1) la distinción de células normales y tumorales, 2) la identificación de subgrupos de pacientes que permitirán nuevos diseños de tratamiento, 3) la identificación de pacientes que recidivarán y, por lo tanto, deberán recibir diferentes tratamientos, 4) el control del tratamiento y 5) el tratamiento médico personalizado de los pacientes (no un tratamiento para todos, sino un tratamiento específicamente adaptado a cada paciente).

En un aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para medir las VAT, en lo sucesivo en el presente documento primer método *in vitro* de la invención, en una muestra de ensayo biológica aislada de un sujeto, en donde el método usa un conjunto de muestras biológicas aisladas patrón de longitud de los telómeros conocida, y comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar un primer conjunto de valores de intensidad de valores de los telómeros conocidos, mediante el uso de una metodología de HT Q\_FISH, a partir del conjunto de muestras biológicas aisladas patrón;
- b) generar una curva patrón que correlacione el primer conjunto de valores de intensidad con la longitud de los telómeros conocida a partir del conjunto de muestras biológicas aisladas patrón;
- c) proporcionar un segundo conjunto de valores de intensidad, mediante el uso de una metodología de HT Q\_FISH, a partir de la muestra de ensayo biológica aislada;
- d) calcular las longitudes de los telómeros dentro de la muestra de ensayo biológica aislada de un sujeto interpolando el segundo conjunto de valores de intensidad en la curva patrón; y
- e) calcular, en la muestra de ensayo biológica aislada, al menos una de las VAT seleccionadas de la lista que consiste en: los percentiles de longitud de los telómeros del 1 al 99, los porcentajes de valores de longitud telomérica que se pueden especificar para un intervalo o número de pb particular, los porcentajes de células con una mediana de valor o un valor promedio de telómeros específicos que se pueden especificar en un valor de pb particular, la desviación absoluta de la mediana de las intensidades de una muestra, la diferencia entre el percentil

99 y el 1 de la longitud de los telómeros de la muestra, el intercuartil de la longitud de los telómeros de una muestra, la desviación típica de la mediana de los valores de longitud de los telómeros, o cualquier combinación de los mismos.

5 En una realización preferida, el primer método *in vitro* de la presente invención se caracteriza porque en la etapa a) de proporcionar el primer conjunto de valores de intensidad de la longitud de los telómeros conocida, a su vez, comprende las etapas de:

- 10 (i). realizar microscopía de alta resolución, preferentemente microscopía fluorescente de alta resolución, al conjunto de muestras biológicas aisladas patrón de longitud de los telómeros conocida, obtener un primer conjunto de datos de imagen; y  
 (ii). procesar el primer conjunto de datos de imagen obtenidos, extraer un primer conjunto de valores de intensidad.

15 En otra realización preferida, el primer método *in vitro* de la presente invención se caracteriza porque la etapa c) de proporcionar el segundo conjunto de valores de intensidad a partir de la muestra de ensayo biológica aislada, a su vez, comprende las etapas de:

- 20 (i). realizar microscopía de alta resolución, preferentemente microscopía fluorescente de alta resolución, a la muestra de ensayo biológica aislada de un sujeto, obtener un segundo conjunto de datos de imagen; y  
 (ii). procesar los datos de imagen del segundo conjunto obtenidos en la etapa d), extraer un segundo conjunto de valores de intensidad.

25 La expresión "muestra biológica" o "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra aislada de un sujeto. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen, pero sin limitación, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo obtenidos mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. En una realización particular, la muestra biológica es un fluido biológico. En una realización más particular, el fluido biológico se selecciona de la lista que consiste en plasma, suero, sangre, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina, saliva, mucosa, flema y esputo. En una realización, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero y plasma. En otra realización, la muestra biológica aislada es una muestra humana. La muestra biológica aislada de la presente invención puede recogerse mediante cualquier método adecuado. La muestra biológica puede usarse inmediatamente o puede almacenarse para su uso posterior. Puede usarse cualquier método de almacenamiento adecuado conocido en la técnica para almacenar la muestra biológica; por ejemplo, la muestra se puede congelar a aproximadamente -20 °C a aproximadamente -196 °C.

35 Como se usa en el presente documento, el término "célula" incluye más de una célula o una pluralidad de células o porciones de células. Una ventaja del método *in vitro* de la presente invención es que puede usarse cualquier suspensión de células individuales.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula de ensayo" o "muestra de ensayo" o "muestra de ensayo biológica" es una célula o muestra de un sujeto del que se sospecha que tiene un trastorno de proliferación celular tal como un cáncer o una enfermedad asociada a los telómeros. En una realización de este tipo, la célula de ensayo incluye, pero sin limitación, una célula cancerosa.

45 Las expresiones "célula de control" o "muestra de control" o "muestra de referencia" son una célula de comparación adecuada, por ejemplo, una célula que es un control de la misma edad, y preferentemente una célula libre de enfermedad, o una célula.

50 La expresión "muestra biológica" o "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra aislada de un sujeto. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen, pero sin limitación, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo obtenidos mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. En una realización particular, la muestra biológica es un fluido biológico. En una realización más particular, el fluido biológico se selecciona de la lista que consiste en plasma, suero, sangre, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina, saliva, mucosa, flema y esputo. En una realización, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero y plasma. En otra realización, la muestra biológica aislada es una muestra humana. La muestra biológica aislada de la presente invención puede recogerse mediante cualquier método adecuado. La muestra biológica puede usarse inmediatamente o puede almacenarse para su uso posterior. Puede usarse cualquier método de almacenamiento adecuado conocido en la técnica para almacenar la muestra biológica; por ejemplo, la muestra se puede congelar a aproximadamente -20 °C a aproximadamente -196 °C.

60 Como se usa en el presente documento, el término "célula" incluye más de una célula o una pluralidad de células o porciones de células. Una ventaja del método *in vitro* de la presente invención es que puede usarse cualquier suspensión de células individuales.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula de ensayo" o "muestra de ensayo" o "muestra de ensayo biológica" es una célula o muestra de un sujeto del que se sospecha que tiene un trastorno de proliferación celular tal como un cáncer o una enfermedad asociada a los telómeros. En una realización de este tipo, la célula de ensayo

incluye, pero sin limitación, una célula cancerosa.

Las expresiones "muestra de referencia", "célula de control" o "muestra de control" son una célula o muestra de comparación adecuada, por ejemplo, una célula que es un control de la misma edad, y preferentemente una célula libre de enfermedad, o una célula. Estas expresiones, como se usan en el presente documento, se refieren a una o más muestras biológicas aisladas de uno o más sujetos que se consideran un control. Una muestra de referencia podría ser, por ejemplo, una muestra biológica aislada de sujetos sanos o de sujetos con enfermedades no teloméricas.

El término "control", como se usa en el presente documento, significa cualquier tejido, muestra biológica o muestra de células de uno o más sujetos que no tienen una enfermedad telomérica (por ejemplo, sujetos de control) o que también tienen una enfermedad no telomérica en fase anterior, tal como un control de la misma edad o puede ser un valor de referencia derivado de una muestra de un sujeto de control o un grupo de sujetos de control.

Como se usa en el presente documento, la expresión "muestras biológicas patrón de longitud de los telómeros conocida" se refiere a células o muestras, preferentemente a una colección de al menos cinco muestras de sujetos sanos o de control, o como alternativa, estirpes celulares inmortalizadas de las que se conoce la longitud de los telómeros, en unidades absolutas. Para el fin de la presente invención, los valores de intensidad obtenidos para cada una de las muestras sobre el conjunto de muestras biológicas patrón, según lo determinado mediante el método, se empareja con su longitud de los telómeros conocida correspondiente para generar la curva patrón y verificar la precisión, reproducibilidad y robustez del método en cada ejecución.

Como se usa en el presente documento, la expresión "curva patrón" o "curva patrón de referencia" se refiere a una curva construida a partir del valor de intensidad de cada una de las muestras biológicas aisladas patrón de longitud de los telómeros conocida. El emparejamiento de las intensidades de fluorescencia de cada muestra con su valor real calculado usando el primer método *in vitro* de la invención genera un conjunto de pares de coordenadas que después se ajustan a una curva logarítmica. La curva patrón incluirá el conjunto de muestras biológicas patrón o de control que comprende estirpes celulares inmortalizadas cuya mediana de la longitud de los telómeros, según lo determinado mediante HT-QFISH, son  $\geq 2000$  pares de bases y  $\leq 40000$  pares de bases. Cualquiera y cada uno de los puntos de intensidad de los telómeros medidos en una célula o en una muestra patrón o de control se pueden interpolar en la curva patrón para obtener el valor correspondiente en pares de bases como longitud absoluta de ese telómero para esa intensidad específica.

Para los fines de la presente invención, cada una de las intensidades de señal de los telómeros obtenidas a partir de la muestra de ensayo biológica mediante el primer método *in vitro* de la presente invención se interpola en la curva patrón y se obtiene un valor de longitud de los telómeros absoluta para cada punto de telómero individual (intensidad de señal) detectado en la muestra de ensayo biológica. Por consiguiente, la curva patrón de la presente invención permite calcular las VAT en unidades absolutas, de acuerdo con el valor de intensidad de cada telómero individual. Por lo tanto, todos los datos obtenidos para todos los telómeros determinados mediante el método permiten el cálculo de las VAT de las muestras de ensayo biológicas de interés que se pueden determinar con precisión elevada por referencia a la curva patrón de la invención.

Como se usan en el presente documento, los términos "sujeto" o "paciente" se refieren a cualquier mamífero, preferentemente un mamífero, e incluye, pero sin limitación, animales domésticos y de granja, primates y seres humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores como ratas y ratones. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano de cualquier edad, sexo o raza. Por lo tanto, se pretenden abarcar sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, sean macho o hembra.

En otra realización preferida del primer método *in vitro* de la invención, las VAT se determinan, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de hibridación convencionales, tales como la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH), hibridación *in situ* fluorescente cuantitativa (Q-FISH) o hibridación *in situ* fluorescencia cuantitativa de alto rendimiento (HT Q-FISH). En una realización más preferida, las VAT se determinan mediante HT Q-FISH.

El término HT-Q-FISH como se usa en el presente documento se refiere a cualquier técnica que permita el procesamiento de decenas o cientos de muestras en una placa multipocillo de alta capacidad, usando microscopía de fluorescencia de alta resolución. Los datos de imagen obtenidos por microscopía de fluorescencia de alta resolución pueden incluir las intensidades de uno o más colores en píxeles que comprenden una imagen de un núcleo o núcleos. Los datos de imagen también pueden ser datos de imagen de nivel de gris de un núcleo que se ha teñido adecuadamente para resaltar telómeros y/o cromosomas. Se obtienen varias imágenes, preferentemente al menos 75 correspondientes a cortes a lo largo de un eje particular.

Para obtener una imagen de los telómeros se realizan tinciones con diferentes colorantes fluorescentes (fluoróforos). Como se usa en el presente documento, "colorantes fluorescentes" o "fluorocromo" se refiere a una molécula de colorante fluorescente particular o a un resto conjugado, adecuado para su uso como marcadores en el presente método. Estos fluorocromos se pueden seleccionar de cualquiera de los muchos colorantes adecuados para su uso en aplicaciones de formación de imágenes. Un gran número de colorantes están disponibles en el mercado de una diversidad de fuentes que proporcionan una gran flexibilidad en la selección de un conjunto de colorantes que tienen

las propiedades espectrales deseadas. Los ejemplos de fluoróforos incluyen, pero sin limitación, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbena-2,2' disulfónico; acridina y derivados tales como acridina, naranja de acridina, amarillo de acridina, rojo de acridina e isotiocianato de acridina; cianina y derivados tales como cianosina, Cy3, Cy5, Cy5.5 y Cy7; 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5"-dibromopirogalol-sulfoneftaleína (rojo de bromopirogalol); eosina y derivados tales como eosina e isotiocianato de eosina; eritrosina y derivados tales como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y butirato de succinimidil 1-pireno; Rojo Reactivo 4 (Cibacron™ Brilliant Red 3B-A); rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirrodamina (R6G), tetrametil rodamina e isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; derivados del ácido rosólico y quelato de terbio; xanteno; colorantes Alexa-Fluor (por ejemplo, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 750), Pacific Blue, Pacific Orange, Cascade Blue, Cascade Yellow; colorantes Quantum Dot (Quantum Dot Corporation); colorantes Dylight de Pierce (Rockford, Ill.), incluyendo Dylight 800, Dylight 680, Dylight 649, Dylight 633, Dylight 549, Dylight 488, Dylight 405; o combinaciones de los mismos. También se pueden usar otros fluoróforos o combinaciones de los mismos conocidos por los expertos en la materia.

Como se ha mencionado anteriormente, la curva patrón de la invención se construye usando los datos de intensidad de una muestra biológica aislada de la longitud de los telómeros conocida. La curva patrón incluirá estirpes celulares inmortalizadas cuya mediana de longitud de los telómeros determinada mediante HT-QFISH sea  $\geq 2000$  pares de bases y  $\leq 40000$  pares de bases. En esta curva patrón, cada una de las señales de los telómeros de intensidades medibles obtenidas a partir de la muestra de ensayo aislada se interpola en la curva patrón y se proporciona un valor de longitud de los telómeros absoluta a cada uno de los puntos de telómero detectados. Las VAT se calculan implicando la intensidad de cada telómero individual.

Las expresiones "Variables asociadas a los telómeros", "VAT", "Variables relacionadas con los telómeros" y/o "VRT", como se usan en el presente documento, se refieren a las mediciones individuales de las longitudes de los telómeros en unidades de pares de bases absolutas y su distribución durante cualquier fase de un ciclo celular e incluyen parámetros tales como percentiles de longitud de los telómeros del 1 al 99, los porcentajes de valores de longitud telomérica que se pueden especificar para un intervalo o número de pb particular, los porcentajes de células con una mediana de valor o un valor promedio de telómeros específicos que se pueden especificar en un valor de pb particular, la desviación absoluta de la mediana de las intensidades de una muestra, la diferencia entre el percentil 99 y el 1 de la longitud de los telómeros de la muestra, el intercuartil de la longitud de los telómeros de una muestra, la desviación típica de la mediana de los valores de longitud de los telómeros, o cualquier combinación de los mismos. Estos términos también se refieren a la combinación de varias VAT.

En otra realización particular del primer método *in vitro* de la invención, el porcentaje del valor de la longitud telomérica, preferentemente el porcentaje de telómeros largos  $TL_u$ , en la muestra biológica aislada  $M_t$ , se determina mediante la siguiente fórmula:

$$TL_u = 100 - TS_u$$

en donde el porcentaje de telómeros cortos  $TS_u$  en la muestra de ensayo biológica aislada  $M_t$ , para una longitud umbral  $u$  se determina como:

$$TS_u = 100 * \frac{\sum_{i=1}^n [t_i < u]}{n}$$

en donde

$M_t = \{T_1, T_2 \dots T_n\}$  es el conjunto completo de los telómeros medidos en la muestra biológica aislada  $M_t$ ,  
 $n$  es el número de telómeros en  $M_t$ , y  
 $t_i (\{t_1, t_2, \dots, t_n\})$  es la longitud telomérica del telómero  $T_i (\{T_1, T_2, \dots, T_n\})$ .

Asimismo, la longitud umbral  $u$  varía de 500 a 40000 pb en incrementos de 100 pb.

En otra realización particular del primer método *in vitro* de la invención, el porcentaje de células con un valor de longitud de los telómeros específico, preferentemente el porcentaje de células que tienen telómeros cortos ( $CS_u$ ) en la muestra de ensayo biológica aislada  $M$  para una longitud umbral  $u$  se determina como:

$$CS_u = 100 * \frac{\sum_{r=1}^n [c_r < u]}{n}$$

en donde

$c_r$  es la longitud de  $C_r \in M_c$  calculada como:  $c_r = \text{promedio}(t_i)$ ;  
 $n$  es el número de células en  $M_c$ ,

$t_{ri}$  es la longitud telomérica del telómero  $T_{ri}$ ;

$K_r = \{T_{r1}, T_{r2}, \dots, T_{rn}\}$  es el conjunto de telómeros analizados en una célula  $C_r$ ; y

$M_c = \{C_{r1}, C_{r2}, \dots, C_{rm}\}$  es el conjunto completo de células en la muestra biológica aislada  $M$ .

5 Asimismo, la longitud umbral  $u$  varía de 500 a 40000 pb en incrementos de 100 pb.

10 En otra realización preferida del primer método *in vitro* de la invención, comprende además en la etapa e) el análisis de al menos una VAT seleccionada de la lista que consiste en: las diferencias en unidades de pares de bases entre los valores percentiles 1 y 99 de la distribución de los telómeros de la muestra (P1-99), la diferencia en unidades de pares de bases entre los valores percentiles 25 y 75 de la distribución de los telómeros de la muestra (P75-25), también conocida como intercuartil (Q3-Q1), la distribución del tamaño nuclear de las células en la muestra, o cualesquier combinaciones de las mismas.

15 La expresión "longitud de los telómeros", como se usa en el presente documento, se refiere al tamaño absoluto de los telómeros determinado mediante interpolación en la curva patrón del método *in vitro* de la invención expresado en pares de bases. Por ejemplo, los telómeros con una longitud en pares de bases (eje x) que varía de 500 a 3000 pb se clasifican como muy cortos, con una longitud que varía de >3000 a 5000 pb como cortos, con una longitud que varía de >5000 a 10000 pb como tamaño medio, con una longitud de >10000 a 15000 pb como grandes y con longitudes >15000 pb como muy grandes.

20 En una realización preferida del primer método *in vitro* de la invención, los telómeros largos son preferentemente telómeros que tienen al menos 13000 pb y más preferentemente más de 15000 pb. En otra realización preferida del primer método *in vitro* de la invención, los telómeros cortos son preferentemente telómeros que tienen menos de 5000 pb.

25 En una realización más preferida del primer método *in vitro* de la invención, las células que tienen telómeros cortos son, preferentemente, células que tienen una longitud de los telómeros promedio por debajo de 5000 pb.

30 En una realización más particular del primer método *in vitro* de la invención, comprende además la medición de la MAD I2 de la longitud telomérica en la muestra biológica aislada.

En una realización más preferida, la MAD I2 de la longitud telomérica en la muestra biológica aislada  $M_t$  se determina mediante la siguiente fórmula:

$$35 \quad MAD = \text{mediana}(|m_i - \tilde{m}|)$$

en donde

40  $m$  es el conjunto de intensidades de fluorescencia correspondientes a los telómeros de la muestra  $M_t$  y  $\tilde{m}$  es la mediana de  $m$ ,

$m = \{t_1, t_2, \dots, t_n\}$ ;

$M_t = \{T_1, T_2, \dots, T_n\}$  es el conjunto completo de telómeros medidos en la muestra biológica aislada; y

$t_i$  ( $\{t_1, t_2, \dots, t_n\}$ ) es la intensidad de fluorescencia del telómero  $T_i$  ( $\{T_1, T_2, \dots, T_n\}$ ).

45 En otra realización preferida, el primer método *in vitro* de la invención, comprende además una etapa adicional en donde la medición de la actividad telomerasa se realiza en la muestra biológica aislada.

50 En otra realización preferida del primer método *in vitro* de la invención, la actividad telomerasa se mide mediante Q-TRAP.

El método *in vitro* de la invención puede realizarse rápidamente y proporcionar una mayor sensibilidad, eficacia, fiabilidad y precisión. Asimismo, este método para medir las VAT mencionadas en el presente documento se puede emplear en un formato de proceso automatizado y/o de alto rendimiento.

55 Todas las definiciones, términos y realizaciones particulares mencionados para el primer método *in vitro* de la presente invención, se aplican para todos los aspectos mencionados en el presente documento.

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico, pronóstico, identificación de subgrupos de sujetos que pueden beneficiarse de un tratamiento y/o control de la evolución de una enfermedad asociada a los telómeros, en lo sucesivo en el presente documento segundo método *in vitro* de la invención, en una muestra de ensayo biológica aislada de un sujeto, en donde el método comprende:

65 a) medir y/o cuantificar al menos una de las VAT en la muestra de ensayo biológica aislada mediante el primer método *in vitro* de la presente invención;

b) medir y/o cuantificar al menos una de las mismas VAT de la etapa a) en una muestra biológica aislada de referencia o de control, mediante las etapas c) a e) del primer método *in vitro* de la invención;

- c) comparar el valor de al menos una de las VAT detectadas en la etapa (a) con el valor de al menos una de las mismas VAT obtenidas en una muestra de referencia o de control,  
 d) identificar una diferencia significativa entre la comparación de VAT de la etapa b); y  
 e) correlacionar la diferencia significativa de la etapa (c) con la identificación de diagnóstico, pronóstico de subgrupos de sujetos que pueden beneficiarse de un tratamiento, y/o la evolución de una enfermedad asociada a los telómeros en el sujeto.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* de cribado, ensayo o validación de fármacos candidatos útiles para el tratamiento de enfermedades asociadas a los telómeros, en lo sucesivo en el presente documento tercer método *in vitro* de la invención, en donde el método comprende:

- a) poner en contacto el fármaco candidato con una muestra de ensayo biológica aislada de un sujeto que padece una enfermedad asociada a los telómeros, de acuerdo con la presente invención,  
 b) medir y/o cuantificar al menos una de las VAT mediante el primer método *in vitro* de la invención, y  
 c) seleccionar el fármaco candidato de la etapa (a) que tenga la capacidad de mantener o aumentar la longitud de los telómeros con respecto al valor de la longitud de los telómeros obtenido en una muestra de referencia o de control.

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método *in vitro* de respuesta a un tratamiento farmacológico, en lo sucesivo en el presente documento cuarto método *in vitro* de la invención, en una muestra de ensayo biológica aislada de un sujeto con una enfermedad asociada a los telómeros, en donde el método comprende:

- a) medir y/o cuantificar al menos una de las VAT mediante el primer método *in vitro* desvelado; y  
 b) comparar el valor obtenido en la etapa a) con el valor de al menos una de las mismas VAT obtenidas de pacientes respondedores y no respondedores que mostraron, respectivamente, respuesta al tratamiento y aquellos que mostraron falta de respuesta al mismo, como alternativa, la presente etapa b) puede realizarse mediante la comparación del valor obtenido en la etapa a) con el valor de al menos una de las mismas VAT obtenidas de una muestra de referencia, en donde el mantenimiento de la longitud de los telómeros o una longitud de los telómeros más larga se correlaciona con una mejor eficacia del fármaco.

La expresión "valor de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere a un criterio predeterminado utilizado como referencia para evaluar los valores o datos obtenidos a partir de las muestras recogidas de un sujeto. Particularmente, el valor de referencia o el nivel de referencia es un comparador adecuado, tal como un porcentaje, cualquier valor que tenga una diferencia significativa con respecto a la muestra de ensayo, valor umbral o de corte, por ejemplo, correspondiente a las VAT mencionadas en la presente invención, que se asocia a una enfermedad telomérica. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior y/o inferior, un intervalo de valores, un valor promedio, la mediana de un valor, un valor medio o un valor que se compara con un valor de control o basal particular. En realizaciones en las que se compara la gravedad de la enfermedad telomérica, el valor de referencia puede ser un valor de referencia de una enfermedad, por ejemplo, un valor de referencia de una enfermedad telomérica leve, el valor de referencia de una enfermedad telomérica moderada o el valor de referencia de una enfermedad telomérica grave, en donde se determina un valor tal como un valor umbral para una población de sujetos que tienen una enfermedad similar, por ejemplo, una enfermedad telomérica leve, una enfermedad telomérica moderada o una enfermedad telomérica grave. El valor de referencia puede ser un valor que surja de estudios de población, modelos teóricos o la caracterización de células de control. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, tal como en una población de sujetos del grupo de la misma edad cronológica, o basarse en un conjunto de muestras que incluyen o excluyen la muestra que a de someterse a ensayo.

En particular, el valor de las VAT, determinado usando el primer método *in vitro* de la presente invención, determina, como se ha mencionado anteriormente, el diagnóstico, pronóstico o respuesta al tratamiento de una enfermedad. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el método *in vitro* para determinar la presencia de valores anormales de las VAT en una muestra de ensayo frente a los valores de VAT obtenidas en una muestra de referencia o de control, es indicativo de cáncer y/o enfermedad telomérica.

Como se ha mencionado anteriormente, el método de medición de las VAT de la presente invención puede usarse para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico e investigación. Dichas aplicaciones incluyen, pero sin limitación: (i) la determinación de la esperanza de vida proliferativa de las células; (ii) la identificación y el análisis de la eficacia de agentes capaces de prolongar, mantener o reducir la longitud de los telómeros; (iii) el diagnóstico de enfermedades o afecciones médicas caracterizadas por una longitud de los telómeros diferente en un paciente con respecto a un individuo que no tiene la enfermedad o afección médica particular; (iv) el pronóstico de enfermedades o afecciones médicas correlacionado con la longitud de los telómeros; (v) el control y la evaluación de la eficacia de una terapia específica para la enfermedad asociada a los telómeros; y (vi) el cribado de fármacos candidatos que afecten a las VAT. En general, la medición de las VAT específicas desveladas en el presente documento proporciona un medio poderoso para evaluar y controlar la esperanza de vida celular para una diversidad de fines útiles.

En general, las afecciones asociadas a la longitud de los telómeros normalmente se han obtenido usando una medida

de la longitud de los telómeros promedio. Sin embargo, la presente invención desvela el uso de las VAT en unidades absolutas de longitud que son útiles puesto que son predictores más sensibles y potencialmente más precisos de resultados clínicamente significativos (por ejemplo, riesgo de enfermedad o mortalidad) que la medición de la longitud de los telómeros promedio o la tasa de cambio en la longitud de los telómeros promedio.

5 Las VAT, determinadas mediante el primer método *in vitro* de la presente invención, muestran un grado de correlación que sugiere que el valor predictivo de estas variables puede potenciarse mediante el uso de un Análisis de componentes principales (ACP), en particular, el ACP puede usarse para generar nuevas variables con una pérdida mínima de información, incluyendo capacidades predictivas. En consecuencia, los resultados del ACP con cada bloque o conjunto de VAT, puede usarse para discernir afecciones particulares. Por lo tanto, si la muestra biológica de ensayo tiene un porcentaje de telómeros largos, medido mediante el primer método *in vitro* exacto y preciso de la invención, que es significativamente diferente del porcentaje de telómeros largos en la muestra biológica de referencia, entonces la muestra biológica de ensayo será más propensa al riesgo de enfermedad o mortalidad en comparación con las muestras biológicas con un porcentaje no significativamente diferente de telómeros largos. La evaluación cuantitativa del porcentaje de telómeros largos tendrá una utilidad diagnóstica significativa en el control de la salud y también en el diagnóstico, pronóstico y diagnóstico complementario de enfermedades. En el mismo sentido, una muestra biológica de ensayo con un valor de abundancia promedio de telómeros largos significativamente diferente de la abundancia promedio de telómeros largos en comparación con una muestra biológica de referencia (población de referencia de la misma edad de individuos normales) tiene un mayor riesgo de morbilidad o mortalidad. Una persona de este tipo (muestra biológica de ensayo) estaría motivada a cambiar su comportamiento hacia un mejor estilo de vida y aumentar la abundancia de telómeros largos, mientras que un individuo (muestra biológica de ensayo) con una mayor abundancia promedio de telómeros largos que la abundancia promedio de telómeros largos en la población de referencia, sabrían que su salud celular es probablemente mejor que el promedio y, por lo tanto, estarían motivados al menos a mantener, sino a mejorar adicionalmente, sus hábitos de vida para mantener su buena salud. Asimismo, como se ha mencionado anteriormente, el primer método *in vitro* que se desvela en el presente documento, para la determinación de las VAT de la invención, también puede usarse para controlar la eficacia de un tratamiento específico, preferentemente la eficacia de la quimioterapia contra el cáncer durante el tratamiento.

30 Como se ha mencionado anteriormente, el primer método *in vitro* de la invención, usando las VAT mencionadas en el presente documento, determinadas a partir de muestras de ensayo biológicas aisladas de sujetos, se puede correlacionar con medidas de salud. Son de particular interés las medidas de salud que implican el estrés percibido. El acortamiento de los telómeros puede acelerarse por factores genéticos y ambientales, incluyendo múltiples formas de estrés tales como el daño oxidativo, el estrés psicológico, el trastorno de estrés postraumático, los estresores bioquímicos, la inflamación crónica y las infecciones víricas. Las enfermedades y afecciones más frecuentemente estudiadas incluyen artritis, dolor de espalda, cáncer, enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, depresión, diabetes, enfermedades gastrointestinales, cefalea de tipo migraña, VIH/SIDA, hipertensión, síndrome del intestino irritable, nefropatía, lumbalgia, esclerosis múltiple, afecciones musculoesqueléticas, afecciones neuromusculares, osteoartritis, diagnósticos psiquiátricos, artritis reumatoide, trastornos del sueño, lesiones medulares, ictus, abuso de sustancias, procedimientos quirúrgicos, trasplante y traumatismo.

40 En un aspecto particular de los métodos *in vitro* de la invención, las muestras biológicas aisladas de los sujetos, se recogen a lo largo del tiempo y las mediciones de las VAT mediante el primer método *in vitro* de la invención, se determinan a partir de las muestras. Los períodos de tiempo apropiados para la recogida de una pluralidad de muestras incluyen, pero sin limitación, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años y 10 años (por ejemplo, el tiempo entre la muestra más antigua y la última pueden ser aproximadamente estos períodos de tiempo). Los métodos *in vitro* de la invención permiten controlar los esfuerzos del paciente para mejorar su estado de salud general y/o controlar su estado de salud y/o riesgo de enfermedad. Puesto que los telómeros cortos desencadenan la muerte celular, un hallazgo de que el porcentaje de longitud de los telómeros cortos se reduce o se mantiene con el tiempo dentro de un individuo indica una mejora de la salud, mientras que el aumento del porcentaje de telómeros cortos en el tiempo representa una disminución o empeoramiento de la salud.

55 La **Fig. 1A** muestra que MAD-I2 disminuyó con la edad. En este sentido, si MAD-I2 aumenta o se mantiene en el tiempo en una muestra biológica aislada de un sujeto, esto es indicativo de una mejora en el estado de salud de este sujeto. Asimismo, si MAD-I2 disminuye en el tiempo en una muestra biológica aislada de un sujeto, esto es indicativo de un empeoramiento en el estado de salud de este sujeto. En el mismo sentido, el porcentaje de telómeros largos en una muestra biológica aislada disminuyó con la edad (**Fig. 1B**). El mantenimiento del porcentaje de telómeros largos contribuye a la salud celular. Por lo tanto, si el porcentaje de telómeros largos, preferentemente que tengan al menos 15000 pb, aumenta o se mantiene en el tiempo en una muestra biológica aislada de un sujeto, esto es indicativo de una mejora en el estado de salud de este sujeto. Asimismo, si el porcentaje de telómeros largos, preferentemente que tengan al menos 15000 pb, se reduce en el tiempo en una muestra biológica aislada de un sujeto, esto es indicativo de un empeoramiento en el estado de salud de este sujeto. Adicionalmente, el porcentaje de células que tienen telómeros cortos, preferentemente que tengan menos de 5000 pb, aumenta con la edad (**Fig. 1C**). Por lo tanto, si el porcentaje de células que tienen telómeros cortos, preferentemente que tengan menos de 5000 pb, se reduce o se mantiene en el tiempo en una muestra biológica aislada de un sujeto, esto es indicativo de una mejora en el estado de salud de este sujeto. Asimismo, si el porcentaje de células que tienen telómeros cortos, preferentemente que tengan menos de 5000 pb, aumenta o en el tiempo en una muestra biológica aislada de un sujeto, esto es indicativo de un

empeoramiento en el estado de salud de este sujeto.

En un aspecto de los métodos *in vitro* de la invención, la afección patológica es una enfermedad asociada a los telómeros. Las enfermedades asociadas a los telómeros son trastornos asociados a un acortamiento anormal o prematuro de los telómeros, que, por ejemplo, pueden ser resultado, adicionalmente, de defectos en la actividad telomerasa. Estas enfermedades pueden ser hereditarias e incluyen determinadas formas de anemia aplásica congénita, determinadas enfermedades hereditarias de la piel y los pulmones, tales como la disqueratosis congénita, las neumonías intersticiales idiopáticas y la fibrosis pulmonar idiopática. Adicionalmente, las enfermedades asociadas a los telómeros también comprenden, y sin limitación, múltiples formas de estrés tales como el daño oxidativo, el estrés psicológico, el trastorno de estrés postraumático, estresores bioquímicos; infertilidad; inflamación crónica, artritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, depresión, diabetes, enfermedades hemáticas, enfermedades gastrointestinales, cefalea de tipo migraña, VIH/SIDA, hipertensión, síndrome del intestino irritable, nefropatía, lumbalgia, esclerosis múltiple, afecciones musculoesqueléticas, afecciones neuromusculares, osteoartritis, diagnósticos psiquiátricos, artritis reumatoide, trastornos del sueño, lesiones medulares, ictus, abuso de sustancias, procedimientos quirúrgicos, trasplante y traumatismo, infecciones víricas, enfermedad cardiovascular, diabetes, cáncer, fibrosis hepática y depresión. Asimismo, en otro aspecto de los métodos *in vitro* de la invención, las VAT mencionadas en el presente documento se pueden usar como indicador de pronóstico, progresión de la enfermedad y resultado del tratamiento.

En un aspecto de los métodos *in vitro* de la invención, tanto la presencia como el progreso de enfermedades asociadas a los telómeros pueden determinarse usando muestras de ensayo biológicas aisladas como se ha mencionado anteriormente.

El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad caracterizada por una división celular descontrolada (o por un aumento de la supervivencia o de la resistencia a la apoptosis) y por la capacidad de dichas células de invadir otros tejidos vecinos (invasión) y diseminarse a otras zonas del cuerpo donde las células no se ubican normalmente (metástasis) a través de vasos linfáticos y sanguíneos, de circular a través del torrente sanguíneo y de, después, invadir los tejidos normales en cualquier lugar del cuerpo. Dependiendo de si pueden o no diseminarse por invasión y metástasis, los tumores se clasifican en benignos o malignos: los tumores benignos son tumores que no pueden diseminarse por invasión o metástasis, es decir, solo crecen localmente; mientras que los tumores malignos son tumores que son capaces de diseminarse por invasión y metástasis. Los procesos biológicos que se sabe que están relacionados con el cáncer incluyen la angiogénesis, la infiltración de células inmunitarias, la migración celular y la metástasis. Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" incluye, pero sin limitación, los siguientes tipos de cáncer: cáncer de mama; cáncer de las vías biliares; cáncer de vejiga; cáncer cerebral, incluyendo glioblastomas y meduloblastomas; cáncer de cuello de útero; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer de esófago; cáncer gástrico; neoplasias hemáticas, incluyendo la leucemia linfocítica y mielógena aguda; leucemia/linfoma linfoblástico agudo de linfocitos T; tricoleucemia; leucemia mielógena crónica, mieloma múltiple; leucemias asociadas al SIDA y leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto; neoplasias intraepiteliales, incluyendo la enfermedad de Bowen y la enfermedad de Paget; cáncer de hígado; cáncer de pulmón; linfomas, incluyendo la enfermedad de Hodgkin y linfomas linfocíticos; neuroblastomas; cáncer oral, incluyendo el carcinoma escamocelular; cáncer de ovario, incluyendo aquellos que surgen de células epiteliales, células estromales, células germinales y células mesenquimales; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer de recto; sarcomas, incluyendo el leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma y osteosarcoma; cáncer de piel, incluyendo el melanoma, carcinoma de células de Merkel, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células basales y cáncer de células escamosas; cáncer testicular, incluyendo tumores germinales tales como seminoma, no seminoma (teratomas, coriocarcinomas), tumores estromales y tumores de células germinales; cáncer de tiroides, incluyendo el adenocarcinoma de tiroides y el carcinoma medular; y cáncer renal, incluyendo el adenocarcinoma y el tumor de Wilms.

La expresión "progresión metastásica", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso a través del cual un tumor se disemina a tejidos del cuerpo diferentes del sitio primario de origen del tumor.

En otro aspecto, los métodos *in vitro* de la presente invención son útiles en el control de la eficacia de la terapia o en la selección de fármacos candidatos que afecten a la longitud de los telómeros y/o la actividad telomerasa. La capacidad de controlar las características de los telómeros puede proporcionar una ventana para examinar la eficacia de terapias y agentes farmacológicos particulares. La capacidad de respuesta a los fármacos de una patología a una terapia particular en un individuo puede determinarse mediante los métodos *in vitro* de la presente divulgación, en donde la longitud más corta de los telómeros se correlaciona con una mejor eficacia del fármaco. Por ejemplo, la presente divulgación también se refiere al control de la eficacia de la terapia contra el cáncer puesto que el potencial proliferativo de las células se relacionado con el mantenimiento de la integridad de los telómeros.

El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere al manejo médico de un paciente con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, afección patológica o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente a la mejoría de una enfermedad, afección patológica o trastorno, y también incluye el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido a la eliminación de la causa de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociado. Además, este término incluye el tratamiento

paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas más que para la cura de la enfermedad, afección patológica o trastorno; el tratamiento preventivo, es decir, el tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o totalmente el desarrollo de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociado; y el tratamiento de apoyo, es decir, el tratamiento que se emplea para complementar otra terapia específica dirigida a la mejoría de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociado. En diversos aspectos, el término abarca cualquier tratamiento de un sujeto, incluyendo un mamífero (por ejemplo, un ser humano), e incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad en un sujeto que pueda tener predisposición a la enfermedad, pero al que aún no se le haya diagnosticado; (ii) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (iii) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, el término "prevenir" o "que previene" se refiere a evitar, prevenir, obviar, impedir, detener u obstaculizar algo para que no ocurra, especialmente mediante una acción por adelantado. Se comprende que cuando se usa reducir, inhibir o prevenir en el presente documento, a menos que se indique específicamente otra cosa, el uso de las otras dos palabras también se desvela expresamente.

Como se usa en el presente documento, el término "pronóstico" o "predicción" o "control" se refiere, pero sin limitación, a un curso esperado de la enfermedad clínica. El pronóstico proporciona una indicación de la progresión de la enfermedad e incluye, por ejemplo, una indicación de la probabilidad de recurrencia, metástasis, muerte debida a la enfermedad, subtipo de tumor o tipo de tumor. Asimismo, estos términos también se refieren a la probabilidad de que un paciente, tal como un paciente que padece una enfermedad asociada a los telómeros de acuerdo con la presente invención, responda de manera favorable o desfavorable a un tratamiento específico, y a la extensión de dichas respuestas, o de que el paciente sobreviva, después de la extirpación quirúrgica de un tumor primario y/o quimioterapia durante un período de tiempo sin una enfermedad asociada, preferentemente, un cáncer. El pronóstico puede comprender un buen pronóstico, que corresponde a un buen resultado clínico con respecto al espectro de posibles resultados clínicos para el cáncer o síndrome específico, y un mal pronóstico, que corresponde a un mal resultado clínico con respecto al espectro de posibles resultados clínicos para el cáncer o síndrome específico. Como se usa en el presente documento, "buen pronóstico" significa un curso probable de la enfermedad o el resultado de la enfermedad que tiene un mayor número de años de vida ajustados por calidad (AVAC), una menor morbilidad y/o una menor la mortalidad en comparación con el promedio para la enfermedad o afección. Como se usa en el presente documento, "pronóstico malo" significa un curso probable de la enfermedad o el resultado de la enfermedad que tiene una mayor morbilidad y/o una mayor mortalidad en comparación con el promedio de la enfermedad o afección.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende normalmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. En la puesta en práctica de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos adicionales, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras examinar la descripción o pueden aprenderse poniendo en práctica la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo ilustrativo y no pretenden limitar la presente invención.

### Breve descripción de los dibujos

**FIG. 1.** Gráficos de dispersión para las VAT de la invención. Todos los sujetos de cero a 93 años se analizaron siguiendo HT-Q-FISH para obtener las VAT de la invención MAD-I2 (**A**), el porcentaje de telómeros largos (TelLargos15000) (**B**) y el porcentaje de células que tienen telómeros cortos (CélCortos 5000) (**C**). En el eje x, la edad individual en años se correlaciona con los valores de VAT en el eje y.

**FIG. 2.** Las VAT de la invención, tales como (**A**) MAD-I2, (**B**) telómeros largos > 15000 pb (TelLargos15000) y (**C**) células que tienen telómeros cortos < 5000 pb (CélCortos 5000), analizadas en muestras biológica de sujetos con cáncer de próstata (biopsia positiva) y de sujetos de control sanos (biopsia negativa) en los diferentes intervalos de edad. La línea marcada en forma de diamante representa a los pacientes diagnosticados con cáncer de próstata. La línea marcada en forma de cuadrado representa controles sanos emparejados por edad.

**FIG. 3.** Las VAT de la invención, tales como (**A**) MAD-I2, (**B**) telómeros largos > 15000 pb (TelLargos15000) y (**C**) células que tienen telómeros cortos < 5000 pb (CélCortos5000), analizadas en muestras biológicas de sujetos con cáncer LLC (biopsia positiva) y de sujetos de control sanos en los diferentes intervalos de edad. La línea marcada en forma de diamante representa a los pacientes diagnosticados con cáncer de Pulmón. La línea marcada en forma de cuadrado representa controles sanos emparejados por edad.

**FIG. 4.** Las VAT de la invención, tales como (**A**) MAD-I2, (**B**) telómeros largos > 15000 pb (TelLargos15000) y (**C**) células que tienen telómeros cortos < 5000 pb (CélCortos5000), analizadas en muestras biológicas de sujetos con cáncer de pulmón y de sujetos de control sanos en los diferentes intervalos de edad. La línea marcada en forma de diamante representa a los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón. La línea marcada en forma de cuadrado representa controles sanos emparejados por edad.

**FIG. 5.** Las VAT de la invención, tales como (**A**) MAD-I2 y (**B**) el porcentaje de células que tienen telómeros cortos (<5 Kpb), analizadas en muestras biológicas de sujetos que tienen cáncer y de control sano.

**FIG. 6.** Análisis de componentes principales que comprende datos de los pacientes (n=401) usando las VAT de la invención. El eje X muestra el ACP de los telómeros (dimensión 0 de ACP\_Tel); el eje Y muestra el ACP de los

datos celulares (dimensión 1 de ACP\_Cél) y el eje Z muestra la MAD-I2.

**FIG. 7.** ACP usando las VAT de la invención (n= 401). Los puntos de color blanco representan pacientes que necesitan una biopsia de confirmación y los puntos de color negro representan pacientes que no requieren una biopsia de confirmación. El eje X muestra la dimensión 0 de ACP\_Tel; El eje Y muestra la dimensión 1 de ACP\_Cél y el eje Z muestra la MAD-I2.

**FIG. 8.** ACP usando las VAT de la invención (n= 401). Los puntos de color negro representan pacientes sin cáncer significativo encontrado después de la biopsia y los puntos de color blanco representan pacientes con cáncer significativo diagnosticado después de la biopsia. El eje X muestra la dimensión 0 de ACP\_Tel; El eje Y muestra la dimensión 1 de ACP\_Cél y el eje Z muestra la MAD-I2

**FIG. 9.** ACP usando las VAT de la invención (n= 401). Los puntos de color blanco representan pacientes con cáncer significativo encontrado después de la biopsia mediante el método de la invención basado en las VAT de la invención, en donde los datos obtenidos indican que se les debe realizar una biopsia (verdaderos positivos); los puntos de color gris claro representan pacientes para los que las VAT obtenidas mediante el método de la invención indican que se les debe realizar una biopsia pero no fue necesaria (falsos positivos); los puntos de color gris oscuro representan pacientes para los que las VAT obtenidas mediante el método de la invención indican que no se les realizó una biopsia y de hecho no la necesitaban (negativos verdaderos) y los puntos de color negro representan pacientes con cáncer diagnosticado después de la biopsia en donde las VAT obtenidas mediante el método de la invención indican que no se les debe realizar una biopsia (falsos negativos). El eje X muestra la dimensión 0 de ACP\_Tel; El eje Y muestra la dimensión 1 de ACP\_Cél y el eje Z muestra la MAD-I2.

**FIG. 10.** Gráficos de dispersión que muestran la longitud de los telómeros obtenida mediante qPCR (A), FISH de flujo (B) y mediante el método *in vitro* de la invención que muestran los datos obtenidos mediante el análisis de la VAT: mediana de la longitud de los telómeros (Kb) (C).

**FIG. 11.** Comparación de los valores y distribuciones obtenidos para sujetos de control y con cáncer de próstata, emparejados por edad y género, a través de los valores calculados para (A) porcentajes de telómeros con un valor de longitud definido (% de TELCortos), (B) porcentajes de células con un valor de longitud de los telómeros promedio definido (% de CÉLCortos) y (C) distribución de percentiles (1 a 99) con su correspondiente longitud de los telómeros en pb.

**FIG. 12.** Diagrama de cajas que compara pacientes de control y con cáncer de próstata, emparejados por edad y sexo, por sus valores sobre el porcentaje de telómeros menores de 2500 pb (A) y por su MAD-I2 (B).

**FIG. 13.** Comparación de los valores y distribuciones obtenidos para sujetos de control y con cáncer de pulmón, emparejados por edad y género, a través de los valores calculados para (A) porcentajes de telómeros con un valor de longitud definido (% de TELCortos), (B) porcentajes de células con un valor de longitud de los telómeros promedio definido (% de CÉLCortos) y (C) distribución de percentiles (1 a 99) con su correspondiente longitud de los telómeros en pb.

**FIG. 14.** Diagrama de cajas que compara pacientes de control y con cáncer de pulmón, emparejados por edad y sexo, por sus valores intercuartílicos calculados (p75-25 en Kpb) (A) y por sus valores de MAD-I2 (B).

**FIG. 15.** Comparación de los valores y distribuciones obtenidos para sujetos de control y con cáncer de colon, emparejados por edad y género, a través de los valores calculados para (A) porcentajes de telómeros con un valor de longitud definido (% de TELCortos), (B) porcentajes de células con un valor de longitud de los telómeros promedio definido (% de CÉLCortos) y (C) distribución de percentiles (1 a 99) con su correspondiente longitud de los telómeros en pb.

**FIG. 16.** Diagrama de cajas que compara pacientes de control y con cáncer de colon, emparejados por edad y sexo, por sus valores intercuartílicos calculados (p75-25 en Kpb) (A) y por sus valores de MAD-I2 (B).

**FIG. 17.** Comparación de los valores y distribuciones obtenidos para sujetos de control y con cáncer gástrico, emparejados por edad y género, a través de los valores calculados para (A) porcentajes de telómeros con un valor de longitud definido (% de TELCortos), (B) porcentajes de células con un valor de longitud de los telómeros promedio definido (% de CÉLCortos) y (C) distribución de percentiles (1 a 99) con su correspondiente longitud de los telómeros en pb.

**FIG. 18.** Diagrama de cajas que compara pacientes de control y con cáncer gástrico, emparejados por edad y sexo, por sus valores intercuartílicos calculados (p75-25 en Kpb) (A) y por sus valores de MAD-I2 (B).

**FIG. 19.** Comparación de los valores y distribuciones obtenidos para sujetos de control y con melanoma, emparejados por edad y género, a través de los valores calculados para (A) porcentajes de telómeros con un valor de longitud definido (% de TELCortos), (B) porcentajes de células con un valor de longitud de los telómeros promedio definido (% de CÉLCortos) y (C) distribución de percentiles (1 a 99) con su correspondiente longitud de los telómeros en pb.

**FIG. 20.** Diagrama de cajas que compara pacientes de control y con melanoma, emparejados por edad y sexo, por su percentil 20 calculado (A) y por sus valores de MAD-I2 (B).

**FIG. 21.** Comparación de los valores y distribuciones obtenidos para sujetos de control y con cáncer de ovario, emparejados por edad y género, a través de los valores calculados para (A) porcentajes de telómeros con un valor de longitud definido (% de TELCortos), (B) porcentajes de células con un valor de longitud de los telómeros promedio definido (% de CÉLCortos) y (C) distribución de percentiles (1 a 99) con su correspondiente longitud de los telómeros en pb.

**FIG. 22.** Diagrama de cajas que compara pacientes de control y con cáncer de ovario, emparejados por edad y sexo, por sus valores intercuartílicos calculados (p75-25 en Kpb) (A) y por sus valores de MAD-I2 (B).

**FIG. 23.** Comparación de los valores y distribuciones obtenidos para sujetos de control y con cáncer de mama, emparejados por edad y género, a través de los valores calculados para (A) porcentajes de telómeros con un valor

de longitud definido (% de TELCortos), (B) porcentajes de células con un valor de longitud de los telómeros promedio definido (% de CÉLCortos) y (C) distribución de percentiles (1 a 99) con su correspondiente longitud de los telómeros en pb.

**FIG. 24.** Diagrama de cajas que compara pacientes de control y con cáncer de mama, emparejados por edad y sexo, por su valor de longitud de los telómeros del percentil 80 en pb (A) y para sus valores de MAD12 (B).

## Ejemplos

Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad. Los siguientes ejemplos se proporcionan como referencia y no son limitantes. La presente invención también se describe y demuestra por medio de los siguientes ejemplos. Sin embargo, el uso de estos y otros ejemplos en cualquier sitio en la memoria descriptiva es solo ilustrativo y no limita de ninguna manera el alcance y el significado de la invención o de cualquier término ejemplificado. Análogamente, la invención no se limita a ninguna de las realizaciones preferidas particulares descritas en el presente documento. De hecho, muchas modificaciones y variaciones de la invención pueden ser evidentes para los expertos en la materia tras leer esta memoria descriptiva y dichas variaciones se pueden realizar sin apartarse de la invención en espíritu o alcance. La invención se limita, por lo tanto, solo por los términos de las reivindicaciones adjuntas junto con el alcance total de los equivalentes a los cuales tienen derecho dichas reivindicaciones.

### Ejemplo 1. VAT construidas a partir de estudios de población de individuos sanos.

#### Método

Se recogieron muestras de sangre de individuos sanos de forma voluntaria con protocolos de estudios clínicos aprobados éticamente y también se recopilaron datos relacionados con la salud para garantizar la ausencia de enfermedad. Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron de las muestras de sangre, se contaron y se almacenaron congeladas hasta su uso. Para realizar el método, se sembraron células en placas de microtitulación de 384 pocillos para realizar HT-Q-FISH (Canela A. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 27 de marzo de 2007; (104-13): 5300-5).

Se usaron estirpes celulares humanas inmortalizadas para establecer una curva patrón. La curva patrón es la curva de regresión logarítmica definida por las coordenadas derivadas del emparejamiento de las intensidades de fluorescencia de cada muestra con su valor real en pares de bases calculado usando el método. Estos pares de coordenadas después se ajustan a una curva logarítmica. La curva patrón incluirá el conjunto de muestras biológicas que comprende estirpes celulares inmortalizadas cuya mediana de longitud de los telómeros, según lo determinado mediante HT-QFISH, son  $\geq 2000$  pares de bases y  $\leq 40000$  pares de bases. Cualquiera y cada uno de los puntos de intensidad de los telómeros medidos en una célula o en una muestra se pueden interpolar en la curva patrón para obtener el valor correspondiente en pares de bases para esa intensidad. El valor absoluto correspondiente en pares de bases de cada telómero en la muestra de ensayo se usa para derivar el valor de todas las VAT de la invención en individuos sanos de 0 a 93 años de edad. Las estirpes celulares de linfoblasto humano inmortalizadas utilizadas incluyeron líneas disponibles en el mercado de la Colección Americana de Cultivos Tisulares (ATCC n.º CCL-159, ATCC n.º CCL-119, ATCC n.º ccl-86 y ATCC n.º crl-8286) y de la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECACC n.º 91071212 y ECACC n.º 93012805), así como de la colección de Life Length (LL n.º 125).

Obtención y análisis de imágenes. La obtención y el análisis de imágenes cuantitativas se realizan en un sistema Opera de cribado de alto contenido (Perkin Elmer), usando el software Acapella, Versión 2.0 (Perkin Elmer). Las imágenes se capturan, usando un objetivo de inmersión en agua 40x 0,95 NA. Se usan las longitudes de onda de excitación de UV y de 488 nm para detectar las señales de DAPI y A488, respectivamente. Con ajustes de exposición constante, se capturan al menos 15 imágenes independientes en diferentes posiciones para cada pocillo. A continuación, las imágenes de los núcleos se usan para definir la región de interés de cada célula, midiendo la intensidad de fluorescencia de los telómeros de la imagen de A488 en todos ellos. Los resultados de intensidad para cada foco se exportan al software Columbus 2.4 (Perkin Elmer).

Se calcula la distribución de la longitud de los telómeros, la mediana de la longitud de los telómeros y otras VAT tales como MAD-I2, TelLargos15000 y CélCortos5000 usando el programa Plate Analyzer de Life Length. Para el análisis cuantitativo para generar las VAT y obtener la distribución de estas VAT en una muestra biológica, se usa el software de análisis Plate Analyzer desarrollado por Life Length SL (Madrid, España). Con el fin de facilitar el procesamiento, el análisis se puede configurar con filtros que permitan la configuración de umbrales en múltiples puntos durante la obtención de datos y la integración de datos que determinan la calidad de los datos y si deben conservarse, descartarse o marcarse como inválidos.

El software funciona en dos dimensiones diferentes: intensidad y longitud, siendo la longitud derivable en cualquier punto de la intensidad a través de una interpolación configurable. Ambas dimensiones se pueden analizar a nivel de telómero individual, así como a otros niveles, incluyendo, pero sin limitación, una célula, grupo de células, pocillo o alícuota. La información estadística sobre la distribución se obtiene en cualquiera de estos niveles.

## Resultados

Se analizaron muestras de sangre de sujetos sanos de cero a 93 años de edad mediante el método *in vitro* de la invención para obtener las tres VAT específicas. Los datos se representaron de manera que la edad del sujeto se emparejó con el percentil 50 de la longitud de los telómeros de la muestra. El percentil 50 de la distribución se corresponde con la mediana de la longitud de los telómeros de la muestra.

Se usaron un total de 2652 muestras para obtener el gráfico de distribución de la población para las VAT de la invención, esto es, MAD-I2 de la longitud telomérica, porcentaje de telómeros largos (TelLargos15000) y porcentaje de células que tenían telómeros cortos (CélCortos5000). Para cada una de las VAT resultantes del método *in vitro* de la invención también se calcularon las diferentes curvas de percentiles.

Las VAT analizadas dependen de la edad y el método permite generar una base de datos para establecer los valores de control o de referencia para comparar muestras de ensayo.

La **Fig. 1A** muestra que la VAT MAD-I2 es una variable que disminuye con la edad. En el mismo sentido, la **Fig. 1B** muestra que el porcentaje de células que tienen telómeros largos (al menos 15000 pb) (TelLargos15000) es una VAT que disminuye con la edad y, asimismo, la **Fig. 1C** muestra que el porcentaje de células con telómeros cortos (menos de 5000 pb) (CélCortos5000) aumenta con la edad.

**Ejemplo 2. El valor de las VAT de la invención es significativamente diferente en tumores sólidos y cáncer hemático en comparación con el valor de las VAT de sujetos sin cáncer.**

## Método

Se recogieron voluntariamente muestras de sangre de sujetos sanos así como de individuos en estadios iniciales de cáncer de próstata (CP), cáncer de pulmón (CP) y leucemia linfocítica crónica (LLC) con protocolos de estudio clínico aprobados éticamente y también se recopilaron datos clínicos relacionados. Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron de las muestras de sangre, se contaron y se almacenaron congeladas hasta su uso. Para realizar el método, se sembraron células en placas de microtitulación de 384 pocillos para realizar HT-Q-FISH (Canela A. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 27 de marzo de 2007; (104-13): 5300-5).

Se utilizan líneas celulares humanas seleccionadas de IM9, CEM, C0106, COJ, C0154 RAJI, REH y 1301 para establecer una curva patrón. Cualquiera y cada uno de los puntos de intensidad de los telómeros medidos en los sujetos sanos y con cáncer se interpolan en la curva patrón para obtener el valor correspondiente en pares de bases para esas intensidades. El valor absoluto correspondiente en pares de bases de cada telómero en la muestra de ensayo se usa para derivar el valor de todas las VAT de la invención de sujetos sanos y sujetos en el estadio inicial de diagnóstico de cáncer de próstata, cáncer de pulmón y LLC.

La Obtención y el análisis de imágenes se realizaron como se desvela en el Ejemplo 1.

## Resultados

### Cáncer de próstata.

Se analizaron resultados de los datos de VAT para estudiar individuos seleccionados de un grupo de sujetos masculinos que tienen un análisis de sangre de antígeno prostático específico (PSA) superior a 3 ng/ml para determinar variables asociadas a los telómeros de acuerdo con el método *in vitro* de la invención. Otras variables clínicas registradas fueron la edad, el tacto rectal y el PSA libre.

A todos los pacientes con PSA por encima de 3 ng/ml se les realizó una biopsia de próstata para diagnosticar si los niveles elevados de PSA estaban provocados por la presencia de cáncer de próstata.

Se observó que las VAT analizadas mediante el método *in vitro* de la invención de pacientes que tienen una biopsia positiva (que tienen cáncer de próstata) o que tienen una biopsia negativa (que no tienen cáncer de próstata) eran significativamente diferentes en los diferentes intervalos de edad, como se representa en **Tabla 1** y las **FIG. 2A-C**.

**Tabla 1.** Muestra las VAT de la invención para pacientes con biopsia positiva (cáncer de próstata) y biopsia negativa (sin cáncer de próstata) emparejados por edad.

| VAT  |        |        |   |   |
|------|--------|--------|---|---|
| Edad | Cáncer | MAD-I2 | Telómeros largos en %<br>(TelLargos15000) | Célula que tiene telómeros cortos en %<br>(CélCortos5000) |
| 83   | NO     | 0,71   | 15,34                                     | 0,25  |
| 83   | SÍ     | 0,46   | 10,07                                     | 2,33  |
| 80   | NO     | 0,85   | 23,19                                     | 0,52  |
| 80   | SÍ     | 0,56   | 14,66                                     | 1,59  |
| 77   | NO     | 0,64   | 23,58                                     | 0,84  |
| 77   | SÍ     | 0,57   | 12,34                                     | 4,35  |
| 73   | NO     | 0,8    | 18,36                                     | 0,35  |
| 73   | SÍ     | 0,61   | 7,7                                       | 0,58  |
| 70   | NO     | 0,69   | 14,12                                     | 0,75  |
| 70   | SÍ     | 0,48   | 9,69                                      | 1,62  |
| 67   | NO     | 0,87   | 25,17                                     | 0,36  |
| 67   | SÍ     | 0,51   | 13,1                                      | 5,7   |
| 62   | NO     | 0,64   | 25,52                                     | 0,27  |
| 62   | SÍ     | 0,49   | 11,1                                      | 2,86  |
| 51   | NO     | 0,77   | 26,69                                     | 0,66  |
| 51   | SÍ     | 0,37   | 6,19                                      | 15,82   |

Los resultados mostrados en **Tabla 1** y las **FIG. 2A-C** señalan que el porcentaje de telómeros mayores de 15000 pb es mayor en los pacientes sin cáncer (**FIG. 2B**). Asimismo, la MAD-I2 de la distribución de los telómeros en cada una de las muestras es menor en pacientes con cáncer (**FIG. 2A**) y el porcentaje de células que tienen una mediana de telómeros por debajo de 5000 pb es mayor en sujetos con biopsias positivas de cáncer de próstata (**FIG. 2C**).

#### **Leucemia linfocítica crónica (LLC)**

Se sometieron a ensayo individuos seleccionados de un grupo de sujetos recientemente diagnosticados con CLL para determinar las VAT de la invención. Otras variables clínicas registradas fueron la edad, el sexo, el estadio de la enfermedad y la mutación p53.

Todos los pacientes diagnosticados con CLL se emparejaron con controles sanos emparejados por edad.

Como se muestra en la **Tabla 2** y en las **Fig. 3A-C**, se observaron diferencias significativas para cada una de las VAT de la invención en controles sanos (sin cáncer) frente a pacientes con cáncer LLC. Las diferencias significativas están relacionadas con la edad, de manera que para pacientes de edad avanzada (> 75 años) en comparación con individuos más jóvenes (> 65 años), la VAT MAD-I2 se reduce significativamente mientras que la VAT CélCortos5000 (porcentaje de células que tienen telómeros cortos con una longitud inferior a 5000 pb) aumenta significativamente.

**Tabla 2.** Muestra las VAT obtenidas mediante el método *in vitro* de la invención para pacientes con LLC y sujetos de control sanos emparejados por edad.

| VAT  |        |        |                      |                       |                      |
|------|--------|--------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| Edad | Cáncer | MAD-I2 | Percentil 50 (en pb) | TelLargos15000 (en %) | CélCortos5000 (en %) |
| 63   | NO     | 0,7    | 10305                | 19,12                 | 0,88                 |

(continuación)

| Edad | Cáncer | MAD-I2 | Percentil 50 (en pb) | TelLargos15000 (en %) | CélCortos5000 (en %) |
|------|--------|--------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| 63   | SÍ     | 0,44   | 7816                 | 7,38                  | 2,57                 |
| 65   | NO     | 0,63   | 10117                | 18,18                 | 0,77                 |
| 65   | SÍ     | 0,43   | 7259                 | 21,07                 | 5,39                 |
| 68   | NO     | 0,83   | 10601                | 22,92                 | 1,17                 |
| 68   | SÍ     | 0,58   | 8521                 | 12,48                 | 2,13                 |
| 71   | NO     | 0,63   | 10233                | 20,64                 | 0,44                 |
| 71   | SÍ     | 0,33   | 6546                 | 2,77                  | 9,08                 |
| 74   | NO     | 0,64   | 10366                | 21,07                 | 0,94                 |
| 74   | SÍ     | 0,37   | 6847                 | 5,62                  | 9,91                 |
| 76   | NO     | 0,56   | 9178                 | 14,43                 | 2,18                 |
| 76   | SÍ     | 0,32   | 6072                 | 0,56                  | 7,16                 |
| 78   | NO     | 0,55   | 9191                 | 14,61                 | 1,34                 |
| 78   | SÍ     | 0,35   | 6339                 | 5,49                  | 11,8                 |
| 80   | NO     | 0,53   | 9100                 | 16,19                 | 1,56                 |
| 80   | SÍ     | 0,37   | 6467                 | 4,09                  | 10,14                |

5 Los resultados muestran que el porcentaje de telómeros mayores de 15.000 pb es significativamente mayor en los pacientes sin cáncer (**FIG. 3B**), la MAD-I2 es significativamente menor en pacientes con cáncer (**FIG 3A**) y el porcentaje de células con una mediana de longitud de los telómeros por debajo de 5000 pb es significativamente mayor en sujetos a los que se les ha diagnosticado LLC (**FIG. 3C**).

### Cáncer de pulmón.

10 Se evaluaron individuos seleccionados de un grupo de sujetos con sospecha de cáncer de pulmón para determinar variables asociadas a los telómeros. Otras variables clínicas registradas fueron la edad, el sexo, el estadio de la enfermedad y el consumo de tabaco. Todos los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón se compararon con controles sanos emparejados por edad. Se observaron diferencias para las VAT de la invención examinadas para todas las edades.

15

**Tabla 3.** Las VAT obtenidas mediante el método *in vitro* de la invención para pacientes con cáncer de pulmón y controles sanos emparejados por edad.

### VAT

| Edad | Cáncer | MAD-I2 | Telómeros largos (TelLargos15000) | Célula que tiene telómeros cortos (CélCortos5000) |
|------|--------|--------|-----------------------------------|---|
| 56   | NO     | 0,99   | 31,45                             | 0,73  |
| 56   | SÍ     | 0,41   | 6,83                              | 1,25  |
| 58   | NO     | 0,73   | 25,38                             | 0,42  |
| 58   | SÍ     | 0,53   | 9,8                               | 3,78  |
| 62   | NO     | 0,69   | 19,61                             | 1,06  |

(continuación)

| Edad | Cáncer | MAD-I2 | Telómeros largos (TelLargos15000) | Célula que tiene telómeros cortos (CélCortos5000) |
|------|--------|--------|-----------------------------------|---|
| 62   | SÍ     | 0,56   | 12,23                             | 4,48  |
| 64   | NO     | 0,72   | 26,9                              | 0,77  |
| 64   | SÍ     | 0,55   | 10,46                             | 8,11  |
| 68   | NO     | 0,68   | 18,16                             | 1,38  |
| 68   | SÍ     | 0,55   | 11,25                             | 6,66  |
| 70   | NO     | 0,62   | 18,48                             | 0,71  |
| 70   | SÍ     | 0,47   | 9,44                              | 1,14  |
| 72   | NO     | 0,72   | 21,00                             | 1,04  |
| 72   | SÍ     | 0,39   | 6,04                              | 16,54   |

## VAT

| Edad | Cáncer | MAD-I2 | Telómeros largos (TelLargos15000) | Célula que tiene telómeros cortos (CélCortos5000) |
|------|--------|--------|-----------------------------------|---|
| 76   | NO     | 0,63   | 18,26                             | 0,35  |
| 76   | SÍ     | 0,52   | 8,44                              | 8,44  |

- 5 Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de telómeros mayores de 15000 pb es significativamente mayor en los pacientes sin cáncer (controles sanos) frente a los pacientes con cáncer de pulmón (**FIG. 4B**). Asimismo, la MAD-I2 en cada una de las muestras es significativamente menor en pacientes con cáncer de pulmón que en pacientes sin cáncer (**FIG. 4A**) y el porcentaje de células con una mediana de longitud de los telómeros por debajo de 5000 pb es significativamente mayor en sujetos a los que se les ha diagnosticado cáncer de pulmón que en pacientes sin
- 10 cáncer (controles sanos) (**FIG. 4C**).

**Ejemplo 3. VAT obtenidas mediante el método *in vitro* de la invención para la clasificación de pacientes en biopsia de confirmación después de la determinación de PSA > 3 ng/ml.**

15 **Método**

Se recogieron voluntariamente muestras de sangre de sujetos sanos, así como de individuos en el estadio inicial de diagnóstico de cáncer de próstata (CP), con protocolos de estudio clínico aprobados éticamente y también se

20 recopilamos datos clínicos relacionados. Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron de las muestras de sangre, se contaron y se almacenaron congeladas hasta su uso. Para realizar el método, se sembraron células en placas de microtitulación de 384 pocillos para realizar HT-Q-FISH (Canela A. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 27 de marzo de 2007; (104-13): 5300-5). La obtención y el análisis de imágenes de las muestras de sangre se realizaron como en el Ejemplo 1.

25 Los resultados de los datos de VAT de un grupo de 150 sujetos masculinos que tienen un análisis de sangre de antígeno prostático específico (PSA) superior a 3 ng/ml e inferior a 10 ng/ml se usaron en combinación con el método *in vitro* de la invención para validar las VAT obtenidas mediante este método. Para esto, los datos clínicos mencionados en el presente documento con las VAT obtenidas mediante el método *in vitro* de la invención se usaron en combinación como parte de un algoritmo predictivo (Life Length S.L. Madrid, España) para determinar si un sujeto con sospecha

30 de cáncer de próstata debe ser biopsiado o no.

Para integrar las VAT del método de la invención se realizó un Análisis de componentes principales (ACP). El conjunto de variables que se ha de someter a ensayo incluye una combinación de Análisis de componentes principales (ACP). Se realizaron un total de seis combinaciones cada una de ellas combinando variables de percentiles, variables de

35 TelLargos (porcentaje de telómeros mayores de 15000 pb) y variables de CélCortos (células con telómeros cortos menores de 5000 pb), junto con las variables MAD-I2, P75-25 (Q3-Q1) y P1-99. Se generaron un total de cinco ACP.

Los componentes principales de cada grupo se numeran del 0 al 5.

**Tabla 4.** Muestra la distribución de los 150 pacientes incluidos en este análisis divididos en aquellos que fueron diagnosticados con cáncer, aquellos considerados con cáncer negativo (sin cáncer) y dentro del grupo de cáncer aquellos que tienen un cáncer significativo (Gleason) y aquellos que tienen un cáncer no significativo (Sin Gleason).

|                    | <b>Cáncer</b> | <b>Sin cáncer</b> | <b>Total</b> |
|--------------------|---------------|-------------------|--------------|
| <b>Sin Gleason</b> | 36            | 85                | 121          |
| <b>Gleason</b>     | 29            | 0                 | 29           |
| <b>Total</b>       | 65            | 85                | 150          |

### Resultados

Cuando los pacientes se agruparon en aquellos diagnosticados con cáncer y libres de cáncer (sin cáncer), las VAT MAD-I2 y las células que tienen telómeros cortos menores de 5000 pb (CélCortos5000) analizadas mediante el método *in vitro* de la invención mostraron diferencias en su distribución (**FIG. 5A-B**). Los datos mostrados en la **FIG. 5** no están segmentados por edad.

La precisión de las VAT de la invención, solas (MAD-I2 o TelLargos15000 o CélCortos5000) o en cualquier combinación de las mismas (MAD-I2 o MAD-I2 y TelLargos15000 o MAD-I2 y TelLargos15000 y CélCortos5000) se calculó mediante el método *in vitro* de la invención y los resultados obtenidos muestran un aumento en el porcentaje de precisión de la predicción del cáncer a medida que se tienen en cuenta más VAT de la invención (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Precisión para las VAT de la invención solas o en combinaciones de las mismas.

| <b>VAT</b>                          | <b>Precisión</b> |
|-------------------------------------|------------------|
| MAD-I2                              | 52 %             |
| MAD-I2+CélCortos5000                | 54 %             |
| MAD-I2+CélCortos5000+TelCortos15000 | 55 %             |

Una vez que se crearon los ACP, se realiza un ensayo t de dos colas que asume varianzas desiguales en cada una de las variables mencionadas anteriormente.

**Tabla 6.** Lista de variables analizadas mediante Análisis de componentes principales de los datos para establecer si eran significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre los grupos de pacientes con cáncer y sin cáncer.

| <b>Variable</b>         | <b>Valor de p</b> |
|-------------------------|-------------------|
| Dimensión 0 de ACP_Perc | 8,00E-05          |
| Dimensión 1 de ACP_Perc | 0,52              |
| Dimensión 2 de ACP_Perc | 0,85              |
| Dimensión 3 de ACP_Perc | 0,3               |
| Dimensión 4 de ACP_Perc | 0,03              |
| Dimensión 5 de ACP_Perc | 0,16              |
| Dimensión 0 de ACP_Tel  | 7,00E-05          |
| Dimensión 1 de ACP_Tel  | 0,78              |
| Dimensión 2 de ACP_Tel  | 0,5               |
| Dimensión 3 de ACP_Tel  | 0,8               |
| Dimensión 4 de ACP_Tel  | 0,78              |
| Dimensión 5 de ACP_Tel  | 0,38              |
| Dimensión 0 de ACP_Cél  | 2,00E-04          |
| Dimensión 1 de ACP_Cél  | 0,32              |
| Dimensión 2 de ACP_Cél  | 0,42              |
| Dimensión 3 de ACP_Cél  | 0,77              |
| Dimensión 4 de ACP_Cél  | 0,83              |
| Dimensión 5 de ACP_Cél  | 0,17              |
| MAD-I2                  | 8,00E-05          |
| Percentil 1-99          | 8,00E-04          |
| <b>Variable</b>         | <b>Valor de p</b> |
| Percentil 25-75         | 0,05              |

El resultado que se muestra en **Tabla 6** indica que, MAD-I2 está un orden de magnitud por encima de los percentiles P1-99 y el percentil P25-75 no es estadísticamente significativo. Cada una de las dimensiones de los ACP se refiere a la reducción de la dimensión o al proceso de reducción del número de variables aleatorias en consideración. Las dimensiones cero son estadísticamente significativas, mientras que la mayoría de las otras dimensiones no lo son,

con la única excepción del ACP de Percentil para la dimensión 4, que es estadísticamente significativo. Estos datos apuntan a una distribución desigual de la información entre los múltiples CP, de manera que la gran mayoría de la información para cada grupo de variables está contenida en la dimensión inicial, que muestra diferencias significativas entre los grupos con cáncer/sin cáncer. Esto está en línea con la gran cantidad de variables estadísticamente significativas que se procesan para generar los ACP, un total de 209 de los cuales 186 son significativos.

La **FIG. 6** muestra todos los pacientes incluidos en el Análisis de componentes principales usando las VAT.

La **FIG. 7** muestra todos los pacientes incluidos en el ACP usando VAT codificadas por colores de acuerdo con su clasificación mediante el modelo en puntos de color blanco que representan a los pacientes que necesitan una biopsia de confirmación y puntos de color negro que representan a los pacientes que no requieren una biopsia de confirmación.

La **FIG. 8** muestra todos los pacientes incluidos en el ACP usando VAT codificadas por colores de acuerdo con el resultado de su biopsia, así como la significancia o no del cáncer diagnosticado. Los puntos de color negro representan pacientes sin cáncer significativo encontrado después de la biopsia, los puntos de color blanco representan pacientes con cáncer significativo diagnosticado después de la biopsia.

La **FIG. 9** muestra todos los pacientes incluidos en el ACP usando VAT codificadas por colores de acuerdo con la predicción del modelo generado usando los datos clínicos del resultado de su biopsia. Los puntos de color blanco representan pacientes con cáncer significativo encontrado después de la biopsia que el modelo basado en las VAT indica que deben someterse a una biopsia (verdaderos positivos), los puntos de color gris claro representan pacientes que el modelo encontró que deberían someterse a una biopsia pero no era necesario (falsos positivos), los puntos de color gris oscuro representan pacientes que el modelo indica que no se sometieron a una biopsia y, de hecho, no la necesitaban (verdaderos negativos) y los puntos de color negro representan pacientes con cáncer diagnosticado después de la biopsia que el modelo indica que no deberían someterse a una biopsia (falsos negativos).

**Ejemplo 4. El método para determinar las VAT y no otros métodos de determinación de la longitud de los telómeros puede informar sobre la desviación promedio de la mediana, el porcentaje de telómeros largos y el porcentaje de células con telómeros cortos.**

**Método**

Con el fin de comparar el método *in vitro* de la invención frente a diferentes métodos conocidos en la técnica para el ensayo de las VAT (es decir, qPCR y FISH de flujo) se analizó una muestra biológica del mismo sujeto mediante qPCR, FISH de flujo y mediante el método *in vitro* de la invención. La qPCR se realizó en un laboratorio comercial (Spectra Cell Laboratories, Houston, Texas). La FISH de flujo se realizó en un laboratorio comercial (Repeat Diagnostic, Vancouver, Canadá) y la HT-QFISH se realizó en Life Length SL. Madrid, España).

**Resultados**

Se obtuvieron los datos relacionados con los telómeros, tales como la longitud promedio de los telómeros en la muestra biológica o la longitud de un tipo celular particular. La misma muestra biológica fue analizada mediante el método *in vitro* de la invención para determinar las VAT y es el único método que puede determinar variables asociadas al estado de salud y enfermedad tales como MAD-I2, TelLargos15000 y CélCortos5000.

**Tabla 7.** Muestra datos de una muestra de sangre procesada mediante FISH de flujo. MLT: Mediana de la longitud los telómeros del paciente; MLTN: MLT normal a la edad (percentil 50) e INT: Interpretación de la longitud de los telómeros.

| Linfocitos   |           |          |
|--------------|-----------|----------|
| MLT (kb)     | MLTN (kb) | INT (kb) |
| 5,4          | 6,0       | N        |
| Granulocitos |           |          |
| MLT (kb)     | MLTN (kb) | INT (kb) |
| 6,4          | 7,8       | N        |

Los resultados asociados (**Tabla 7**) pueden determinar la mediana de la longitud de los telómeros de la muestra, la mediana de la distribución de la longitud de los telómeros calculada por célula, y pueden especificar si las células son linfocitos o granulocitos. Sin embargo, el método no puede calcular la MAD-I2 ni el porcentaje de telómeros largos en la muestra.

**Tabla 8.** Muestra datos de una muestra de sangre procesada mediante qPCR.

|   |        |
|---|--------|
| Puntuación de los telómeros del paciente                  | 7,26 % |
| Percentil con respecto a la edad y población del paciente | 73 %   |

Los resultados asociados (**Tabla 8**) pueden determinar la longitud de los telómeros promedio de la muestra con respecto a un patrón. La qPCR no puede generar valores sobre las VAT de la invención, tales como la MAD-I2, el porcentaje de telómeros largos y el porcentaje de células que tienen telómeros cortos.

**Tabla 9.** Muestra datos de una muestra de sangre procesada mediante el método *in vitro* de la invención (HT-Q-FISH).

| VAT  | Pares de bases (pb) |
|--|---------------------|
| Longitud promedio (pb)   | 13130               |
| Mediana de la longitud (pb)  | 11296               |
| % de Telómeros largos [PorcentajeTelLargos (15000 pb)]                   | 72,5                |
| % de Células que tienen telómeros cortos [PorcentajeCélCortos (5000 pb)] | 0,25                |
| MAD-I2   | 0,71                |

Los resultados asociados obtenidos mediante el método *in vitro* de la invención (**Tabla 9**) puede determinar la mediana de la muestra y la longitud de los telómeros promedio en unidades absolutas de pares de bases. Además, también se pueden obtener datos sobre las VAT tales como la MAD-I2, los TelLargos15000 y las CélCortos5000.

La **FIG. 10** muestra diferentes gráficos para el análisis de telómeros obtenidos mediante qPCR (**FIG. 10A**), FISH de flujo (**FIG. 10B**) y HT-Q-FISH (**FIG. 10C**) basado en la longitud promedio o la mediana de la longitud de los telómeros calculadas sobre un grupo de sujetos sanos de diferentes edades. Las pendientes y la distribución de los datos es diferente para cada método.

### 20 Ejemplo 5. Las VAT obtenidas mediante el primer método de la invención son útiles para evaluar el riesgo de cáncer

#### Método

Se recogieron voluntariamente muestras de sangre de sujetos sanos, así como de personas con cáncer de próstata (n= 336), cáncer de pulmón (n= 166), cáncer de mama (n= 30), cáncer de ovario (n= 13), cáncer de colon (n= 27), cáncer gástrico (n= 10) y cáncer melanoma (n= 15) con protocolos de estudio clínico aprobados éticamente y también se recopilaron datos clínicos relacionados. Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron de las muestras de sangre, se contaron y se almacenaron congeladas hasta su uso.

Todos los datos se registraron electrónicamente y se controlaron para garantizar la calidad de los resultados.

Se seleccionaron pacientes de control al azar de una cohorte que se emparejó por sexo y edad con los de los pacientes con cáncer.

Para realizar el método, se sembraron células en placas de microtitulación de 384 pocillos para realizar HT-Q-FISH (Canela A. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 27 de marzo de 2007; (104-13): 5300-5).

Los análisis estadísticos se realizaron usando t-student y análisis de razón de probabilidades.

#### 40 Resultados

Los resultados inesperados en tumores sólidos analizados en el presente documento, se refieren a los datos obtenidos usando dos tipos de análisis:

1. Basado en el cálculo de diferencias significativas de VAT particulares obtenidas mediante el método de la invención entre controles y pacientes con cáncer.

- Se ha encontrado que varias variables son significativamente diferentes en el control y en los pacientes con cáncer.
- Cada tipo de cáncer tiene un conjunto diferente de valores de VAT con diferentes grados de significancia.
- Una de las VAT más coherentes encontradas diferentes entre todos los tipos de cáncer es la VAT p25-75 (intercuartil).

2. Calcular la razón de probabilidades (RP) en sujetos con cáncer:

- Mediante el método de la invención se han identificado diferentes VAT que permiten evaluar la razón de probabilidades de que un individuo tenga cáncer.
- La razón de probabilidades y la significancia (valores p) de los datos obtenidos son específicas para cada tipo de cáncer.
- Los telómeros más largos son significativamente más cortos en el caso de los pacientes con cáncer de pulmón, mama y colon
- Los telómeros más cortos son significativamente más largos en el caso de los pacientes con melanoma y cáncer de ovario.

**Resultados en sujetos con cáncer de próstata frente a sujetos de control.**

Las VAT obtenidas mediante el método *in vitro* de la presente invención son diferentes en sujetos de control con respecto a los sujetos con cáncer de próstata (**Tabla 10**).

**Tabla 10.** La Tabla muestra los resultados del ensayo t utilizado para calcular el valor de p de diferentes VAT entre sujetos de control y sujetos con cáncer de próstata, los valores de  $p < 0,05$  se consideran significativos.

| VAT           | Valor de p del ensayo t |
|---------------|-------------------------|
| Percentil4    | 2,52798E-06             |
| Percentil5    | 7,64626E-08             |
| Percentil6    | 3,04693E-08             |
| Percentil7    | 6,75678E-08             |
| Percentil8    | 1,97336E-07             |
| Percentil9    | 6,56973E-07             |
| Percentil10   | 2,03323E-06             |
| Percentil11   | 6,83414E-06             |
| TelCortos500  | 3,01451E-09             |
| TelCortos1000 | 1,10094E-08             |
| TelCortos1500 | 9,9311E-08              |
| TelCortos2000 | 4,1595E-07              |
| TelCortos2500 | 5,06145E-06             |

La comparación de las VAT calculadas mediante el método *in vitro* de la invención, obtenidas de pacientes de control y con cáncer de próstata, muestra curvas de distribución ligeramente diferentes para los porcentajes de telómeros de determinados valores de longitud (% de TELCortos) (**FIG. 11 A**) en ambos grupos de sujetos. Las curvas son significativamente diferentes entre 500 y 2500 pb (**Tabla 10**) siendo menor para las muestras sanas, de control. Las curvas para los porcentajes de células con una longitud de los telómeros promedio definida (% de CÉLCortos) (**FIG. 11B**) también es ligeramente diferente. Se observan diferencias significativas en los valores absolutos de pb para los percentiles en pacientes con cáncer de próstata con respecto a controles (**FIG 11C**) en particular para los percentiles 4 a 11 (**Tabla 10**).

Las VAT específicas se compararon en el grupo de control y con cáncer mediante gráficos de cajas (**FIG 12A y 12B**) que muestran la diferencia de valores intercuartílicos (p75-25) y MAD12 para pacientes con cáncer de próstata en comparación con sujetos de control, sanos.

**Resultados en sujetos con cáncer de pulmón frente a sujetos de control.**

Las VAT obtenidas mediante el método *in vitro* de la presente invención son diferentes en sujetos de control con respecto a los sujetos con cáncer de pulmón (**Tabla 11**).

**Tabla 11.** La Tabla muestra los resultados del ensayo t utilizado para calcular el valor de p de diferentes VAT entre sujetos de control y sujetos con cáncer de pulmón. Los valores de  $p < 0,05$  se consideran significativos.

| VAT        | Ensayo T, Valor de p | VAT           | Ensayo T, Valor de p |
|------------|----------------------|---------------|----------------------|
| LTP        | 1,77E-06             | CélCortos3000 | 7,24E-04             |
| MLT        | 2,82E-04             | CélCortos3500 | 6,02E-04             |
| P1-99-Kpb  | 2,06E-16             | CélCortos4000 | 5,26E-04             |
| P75-25-Kpb | 1,94E-15             | CélCortos5000 | 4,54E-04             |

(continuación)

| VAT         | Ensayo T, Valor de p |  | VAT            | Ensayo T, Valor de p |
|-------------|----------------------|--|----------------|----------------------|
| Percentil3  | 6,73E-06             |  | TelCortos14000 | 2,26E-08             |
| Percentil65 | 3,00E-06             |  | TelCortos15000 | 1,25E-09             |
| Percentil85 | 2,68E-10             |  | TelCortos16000 | 9,64E-11             |
| Percentil90 | 6,97E-12             |  | TelCortos17000 | 1,24E-11             |

La comparación de las VAT, calculadas mediante el método *in vitro* de la invención, de pacientes de control y con cáncer de pulmón, muestra diferentes curvas para los porcentajes de telómeros de determinados valores (% de TELCortos) (**FIG 13A**), los porcentajes de células con una longitud de los telómeros promedio definida (% de CÉLCortos) (**FIG 13B**) y para el percentil que varía de 1 a 99. (FIG. 13C). Las diferencias más significativas para todos las VAT analizadas se enumeran en la **Tabla 11**.

Las VAT específicas se compararon en el grupo de control y con cáncer mediante gráficos de cajas (**FIG 14A y 14B**) que muestran la diferencia de valores intercuartílicos (p75-25) y MADI2 para pacientes con cáncer de pulmón en comparación con sujetos de control, sanos.

#### **Resultados en sujetos con cáncer de colon frente a sujetos de control.**

Las VAT obtenidas mediante el método *in vitro* de la presente invención son diferentes en sujetos de control con respecto a los sujetos con cáncer de colon (**Tabla 12**).

**Tabla 12.** La Tabla muestra los resultados del ensayo t utilizado para calcular el *valor de p* de diferentes VAT entre sujetos de control y sujetos con cáncer de colon. Los *valores de p* < 0,05 se consideran significativos.

| VAT            | Valor de p del ensayo t |
|----------------|-------------------------|
| Percentil99    | 0,00073631              |
| CélCortos20000 | 0,00324657              |

La comparación de las VAT, calculadas mediante el método *in vitro* de la presente invención, de pacientes de control y con cáncer de colon, muestra diferentes curvas para los porcentajes de telómeros de determinados valores (% de TELCortos) (**FIG 15A**), los porcentajes de células con una longitud de los telómeros promedio definida (% de CÉLCortos) (**FIG 15B**) y para el percentil que varía de 1 a 99. (FIG. 15C). Las diferencias más significativas para todos las VAT analizadas se corresponden con valores de telómeros largos y se enumeran en la **Tabla 12**.

Las VAT específicas se compararon en el grupo de control y de cáncer de colon mediante gráficos de cajas (**FIG 16A y 16B**) que muestran la distribución diferente para p75-25 y MADI2, de manera que ambas VAT son más bajas en los pacientes con cáncer de colon en comparación con sujetos de control, sanos.

#### **Resultados en sujetos con cáncer gástrico frente a sujetos de control.**

Las VAT obtenidas mediante el método *in vitro* de la presente invención son diferentes en sujetos de control con respecto a los sujetos con cáncer gástrico (**Tabla 13**).

**Tabla 13.** La Tabla muestra los resultados del ensayo t utilizados para calcular el *valor de p* de la diferencia de las características de VAT entre los sujetos de control y con cáncer gástrico. Los *valores de p* < 0,05 se consideran significativos.

| VAT         | Valor de p del ensayo t |
|-------------|-------------------------|
| Percentil99 | 0,018                   |
| P75-25-Kpb  | 0,041                   |

La comparación de las VAT, calculadas mediante el método *in vitro* de la invención, de pacientes de control y con cáncer de gástrico, muestra diferentes curvas para los porcentajes de telómeros de determinados valores (% de TELCortos) (**FIG 17A**), los porcentajes de células con una longitud de los telómeros promedio definida (% de CÉLCortos) (**FIG 17B**) y para el percentil que varía de 1 a 99. (FIG. 17C). Las diferencias más significativas para todas las VAT analizadas se corresponden con las VAT enumeradas en la **Tabla 13**.

Las VAT específicas se compararon en el grupo de control y de cáncer gástrico mediante gráficos de cajas (**FIG 18A y 18B**) que muestran la distribución diferente de p75-25 y MADI2 en los pacientes con cáncer gástrico en comparación con sujetos de control, sanos.

#### **Resultados en sujetos con cáncer melanoma frente a sujetos de control.**

Las VAT obtenidas mediante el método *in vitro* de la presente invención son diferentes en sujetos de control con respecto a los sujetos con melanoma (**Tabla 14**).

- 5 **Tabla 14.** La Tabla muestra los resultados del ensayo t utilizado para calcular el *valor de p* de diferentes VAT entre sujetos de control y sujetos con melanoma. Los *valores de p* < 0,05 se consideran significativos.

| VAT        | Valor de <i>p</i> del ensayo t |
|------------|--------------------------------|
| P1-99-Kpb  | 0,047                          |
| P75-25-Kpb | 0,041                          |

- 10 La comparación de las VAT, calculadas mediante el método *in vitro* de la invención, de pacientes de control y con melanoma, muestra diferentes curvas para los porcentajes de telómeros de determinados valores (% de TELCortos) (**FIG 19A**), los porcentajes de células con una longitud de los telómeros promedio definida (% de CÉLCortos) (**FIG 19B**) y para el percentil que varía de 1 a 99. (FIG. 19C). Las diferencias más significativas para todas las VAT analizadas se corresponden con las VAT enumeradas en la **Tabla 14**.

- 15 Las VAT específicas se compararon en el grupo de control y de cáncer gástrico mediante gráficos de cajas (**FIG 20A** y **20B**) que muestran la distribución diferente para el percentil 20 y MAD12 en los pacientes con melanoma en comparación con sujetos de control, sanos.

#### **Resultados en sujetos con cáncer de ovario frente a sujetos de control.**

- 20 Las VAT obtenidas mediante el método *in vitro* de la presente invención son diferentes en sujetos de control con respecto a los sujetos con cáncer de ovario (**Tabla 15**).

**Tabla 15.** La tabla muestra los resultados del ensayo t utilizado para calcular el *valor de p* de diferentes VAT entre sujetos de control y sujetos con cáncer de ovario. Los *valores de p* < 0,05 se consideran significativos.

| VAT        | Valor de <i>p</i> del ensayo t |
|------------|--------------------------------|
| Percentil3 | 0,037                          |
| P75-25-Kpb | 0,0044                         |

- 25 La comparación de las VAT, calculadas mediante el método *in vitro* de la presente invención, de pacientes de control y con cáncer de ovario, muestra diferentes curvas para los porcentajes de telómeros de determinados valores (% de TELCortos) (**FIG 21A**), los porcentajes de células con una longitud de los telómeros promedio definida (% de CÉLCortos) (**FIG 21B**) y para el percentil que varía de 1 a 99. (**FIG. 21C**). Las diferencias más significativas para todas las VAT analizadas se corresponden con las VAT enumeradas en la **Tabla 15**.

- 30 Las VAT específicas se compararon en el grupo de control y de cáncer de ovario mediante gráficos de cajas (**FIG 22A** y **22B**) que muestran la distribución diferente de p75-25 y MAD12 en los pacientes con cáncer de ovario en comparación con sujetos de control, sanos.

#### **Resultados en sujetos con cáncer de mama frente a sujetos de control.**

- 35 Las VAT obtenidas mediante el método *in vitro* de la presente invención son diferentes en sujetos de control con respecto a los sujetos con cáncer de mama (**Tabla 16**).

- 40 **Tabla 16.** La tabla muestra los resultados del ensayo t utilizado para calcular el *valor de p* de diferentes VAT entre sujetos de control y sujetos con cáncer de mama. Los *valores de p* < 0,05 se consideran significativos.

| VAT        | Valor de <i>p</i> del ensayo t |
|------------|--------------------------------|
| MedianI2   | 0,001671711                    |
| P1-99-Kpb  | 0,000451705                    |
| P75-25-Kpb | 0,0000427461                   |

- 45 La comparación de las VAT, calculadas mediante el método, de pacientes de control y con cáncer de mama, muestra diferentes curvas para los porcentajes de telómeros de determinados valores (% de TELCortos) (**FIG 23A**), los porcentajes de células con una longitud de los telómeros promedio definida (% de CÉLCortos) (**FIG 23B**) y para el percentil que varía de 1 a 99. (FIG. 23C). Las diferencias más significativas para todas las VAT analizadas se corresponden con las VAT enumeradas en la **Tabla 16**.

- 50 Las VAT específicas se compararon en el grupo de control y de cáncer de ovario mediante gráficos de cajas (**FIG 24A** y **24B**) que muestran la distribución diferente para el percentil 80 y MAD12 en los pacientes con cáncer de mama en

comparación con sujetos de control, sanos.

Además, se calculó la razón de probabilidades (RP) para los diferentes grupos de pacientes con cáncer. La RP es la medida de asociación entre las VAT y los diferentes tipos de cáncer en la población analizada que se muestra en el presente ejemplo. Específicamente, se evaluó si el valor de las VAT tiene efecto sobre la probabilidad de la presencia de cáncer o su ausencia (sin cáncer).

Por lo tanto, la RP puede usarse para averiguar si una VAT particular, como p75-25 (en Kpb), es un factor de riesgo para un resultado particular de cada cáncer específico analizado, y para comparar los diversos factores de riesgo para ese resultado.

El cálculo de la razón de probabilidades se realizó usando la metodología convencional (**Tabla 17**):

**Tabla 17.** Razones de probabilidades calculadas para los valores del primer cuartil (Q1) y su correspondiente resultado del ensayo t de significancia (*valor de p*) de características de VAT. Mediana de la longitud de los telómeros (MLT) e intercuartil p75-25 para diferentes tipos de cáncer.

| Valor del primer cuartil (Q1) para VAT: MLT |                         |            | Valor del primer cuartil (Q1) para VAT: p75-25 |                         |            |
|---|-------------------------|------------|--|-------------------------|------------|
| Tipo de cáncer                              | Razón de probabilidades | Valor de p | Tipo de cáncer                                 | Razón de probabilidades | Valor de p |
| Mama  | 3,00                    | 4.65E-03   | Mama   | 11,99                   | 5.41E-10   |
| Colon                                       | 2,40                    | 2.63E-02   | Colon  | 4,36                    | 1.78E-04   |
| Gástrico                                    | 3,00                    | 1.34E-01   | Gástrico                                       | 7,00                    | 3.60E-03   |
| Pulmón                                      | 4,43                    | 8.53E-20   | Pulmón   | 6,22                    | 1.51E-28   |
| Melanoma                                    | 0,46                    | 3.83E-01   | Melanoma                                       | 2,62                    | 7.04E-02   |
| Ovario                                      | 1,87                    | 3.32E-01   | Ovario   | 10,00                   | 1.33E-04   |
| Próstata                                    | 2,58                    | 3.97E-15   | Próstata                                       | 1,47                    | 2.87E-03   |

La medición de la longitud de los telómeros en cada telómero individualmente, su conversión a valores absolutos de pares de bases y su análisis para calcular VAT permite usar VAT únicas, derivadas del método, tales como MLT y p75-25 como biomarcadores para diferentes tipos de cáncer. Cada tipo de cáncer tiene un distintivo de VAT diferente.

**REIVINDICACIONES**

1. Método *in vitro* para medir variables asociadas a los telómeros (VAT) en una muestra de ensayo biológica aislada de un sujeto, en donde el método usa un conjunto de muestras biológicas aisladas patrón de longitud de los telómeros conocida, y comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar un primer conjunto de valores de intensidad de la longitud de los telómeros conocida, mediante el uso de una metodología de HT Q-FISH, a partir del conjunto de muestras biológicas aisladas patrón;
- b) generar una curva patrón que correlacione el primer conjunto de valores de intensidad con la longitud de los telómeros conocida a partir del conjunto de muestras biológicas aisladas patrón;
- c) proporcionar un segundo conjunto de valores de intensidad, mediante el uso de una metodología de HT Q-FISH, a partir de la muestra de ensayo biológica aislada;
- d) calcular las longitudes de los telómeros dentro de la muestra de ensayo biológica aislada de un sujeto interpolando el segundo conjunto de valores de intensidad en la curva patrón; y
- e) calcular, en la muestra de ensayo biológica aislada, al menos una de las VAT seleccionadas de la lista que consiste en: los percentiles de longitud de los telómeros del 1 al 99, los porcentajes de valores de longitud telomérica que se pueden especificar para un intervalo o número de pb particular, los porcentajes de células con una mediana de valor o un valor promedio de telómeros específicos que se pueden especificar en un valor de pb particular, la desviación absoluta de la mediana de las intensidades de una muestra, la diferencia entre el percentil 99 y el 1 de la longitud de los telómeros de la muestra, el intercuartil de la longitud de los telómeros de una muestra, la desviación típica de la mediana de los valores de longitud de los telómeros, o cualquier combinación de los mismos.

2. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa a) de proporcionar el primer conjunto de valores de intensidad de la longitud de los telómeros conocida, a su vez, comprende las etapas de:

- (i). realizar microscopía de alta resolución a la muestra biológica aislada patrón de longitud de los telómeros conocida, obtener un primer conjunto de datos de imagen; y
- (ii). procesar el primer conjunto de datos de imagen obtenidos, extraer un primer conjunto de valores de intensidad.

3. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la etapa c) de proporcionar el segundo conjunto de valores de intensidad a partir de la muestra de ensayo biológica aislada, a su vez, comprende las etapas de:

- (i). realizar microscopía de alta resolución a la muestra de ensayo biológica aislada de un sujeto, obtener un segundo conjunto de datos de imagen; y
- (ii). procesar los datos de imagen del segundo conjunto obtenidos en la etapa d), extraer un segundo conjunto de valores de intensidad;

4. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el porcentaje del valor de la longitud telomérica ( $TL_u$ ), preferentemente el porcentaje de telómeros largos se determina mediante la fórmula:

$$TL_u = 100 - TS_u$$

en donde el porcentaje de telómeros cortos  $TS_u$  en la muestra de ensayo biológica aislada  $M_t$ , para una longitud umbral  $u$  se determina como:

$$TS_u = 100 * \frac{\sum_{i=1}^n [t_i < u]}{n}$$

en donde

$M_t = \{T_1, T_2 \dots T_n\}$  es el conjunto completo de los telómeros medidos en la muestra de ensayo biológica aislada  $M_t$ ,  $n$  es el número de telómeros en  $M_t$ , y,  $t_i (\{t_1, t_2, \dots, t_n\})$  es la longitud telomérica del telómero  $T_i (\{T_1, T_2, \dots, T_n\})$ .

5. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el porcentaje de células con un valor de longitud de los telómeros específico, preferentemente el porcentaje de células que tienen telómeros cortos ( $CS_u$ ) en la muestra de ensayo biológica aislada  $M$  para una longitud umbral  $u$  se determina mediante la fórmula:

$$CS_u = 100 * \frac{\sum_{r=1}^n [c_r < u]}{n}$$

en donde:

$c_r$  es la longitud de  $C_r \in M_c$  calculada como:  $c_r = promedio(t_{ri})$ ;

$n$  es el número de células en  $M_c$ ,  
 $t_{ri}$  es la longitud telomérica del telómero  $T_{ri}$ ;  
 $K_r = \{T_{r1}, T_{r2}, \dots, T_{rm}\}$  es el conjunto de telómeros analizados en una célula  $C_i$ ; y  
 $M_c = \{C_{r1}, C_{r2}, \dots, C_{rm}\}$  es el conjunto completo de células en la muestra biológica de ensayo aislada  $M$ .

5 6. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la longitud umbral  $u$  varía de 500 a 40000 pb en incrementos de 100 pb.

10 7. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde comprende además la medición de la MAD-I2 de la longitud telomérica.

8. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la MAD-I2 de la longitud telomérica se determina mediante la fórmula:

15 
$$MAD = \text{mediana}(|m_i - \tilde{m}|)$$

en donde

$m$  es el conjunto de intensidades de fluorescencia correspondientes a los telómeros de la muestra de ensayo  $M_t$  y  $\tilde{m}$  es la mediana de  $m$ ,

20  $m = \{t_1, t_2, \dots, t_n\}$ ;

$M_t = \{T_1, T_2, \dots, T_n\}$  es el conjunto completo de telómeros medidos en la muestra de ensayo biológica aislada; y  $t_i (\{t_1, t_2, \dots, t_n\})$  es la intensidad de fluorescencia del telómero  $T_i (\{T_1, T_2, \dots, T_n\})$ .

25 9. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde comprende además la medición de la actividad telomerasa en la muestra biológica aislada.

10. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la actividad telomerasa se determina mediante Q-TRAP.

30 11. Un método *in vitro* para el diagnóstico, pronóstico, identificación de subgrupos de sujetos que pueden beneficiarse de un tratamiento y/o control de la evolución de una enfermedad asociada a los telómeros, en una muestra de ensayo biológica aislada de un sujeto, en donde el método comprende:

35 a) medir y/o cuantificar al menos una de las VAT en la muestra de ensayo biológica aislada mediante el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;

b) medir y/o cuantificar al menos una de las mismas VAT de la etapa a) en una muestra biológica aislada de referencia o de control, mediante las etapas c) a e) del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 8;

40 c) comparar el valor de al menos una de las VAT detectadas en la etapa (a) con el valor de al menos una de las mismas VAT obtenidas en una muestra de referencia o de control,

d) identificar una diferencia significativa entre la comparación de VAT de la etapa b); y

e) correlacionar la diferencia significativa de la etapa (c) con la identificación de diagnóstico, pronóstico de subgrupos de sujetos que pueden beneficiarse de un tratamiento, y/o la evolución de una enfermedad asociada a los telómeros en el sujeto.

45 12. Un método *in vitro* de cribado, ensayo o validación de fármacos candidatos útiles para el tratamiento de enfermedades asociadas a los telómeros en una muestra de ensayo biológica aislada de un sujeto, en donde el método comprende:

50 a) poner en contacto el fármaco candidato con una muestra de ensayo biológica aislada de un sujeto que padece una enfermedad asociada a los telómeros,

b) medir y/o cuantificar al menos una de las VAT mediante el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y

55 c) seleccionar el fármaco candidato de la etapa (a) que tenga la capacidad de mantener o aumentar la longitud de los telómeros con respecto al valor de la longitud de los telómeros obtenido en una muestra de referencia o de control.

13. Un método *in vitro* de respuesta a un tratamiento farmacológico en una muestra biológica aislada de un sujeto con una enfermedad asociada a los telómeros, en donde el método comprende:

60 a) medir y/o cuantificar al menos una de las VAT mediante el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y

b) comparar el valor obtenido en la etapa a) con el valor de al menos una de las mismas VAT obtenidas de pacientes respondedores y no respondedores que mostraron, respectivamente, respuesta al tratamiento y aquellos que mostraron falta de respuesta al mismo o, como alternativa, comparar el valor obtenido en la etapa a) con el valor de al menos una de las mismas VAT obtenidas de una muestra de referencia, en donde el mantenimiento de la

65

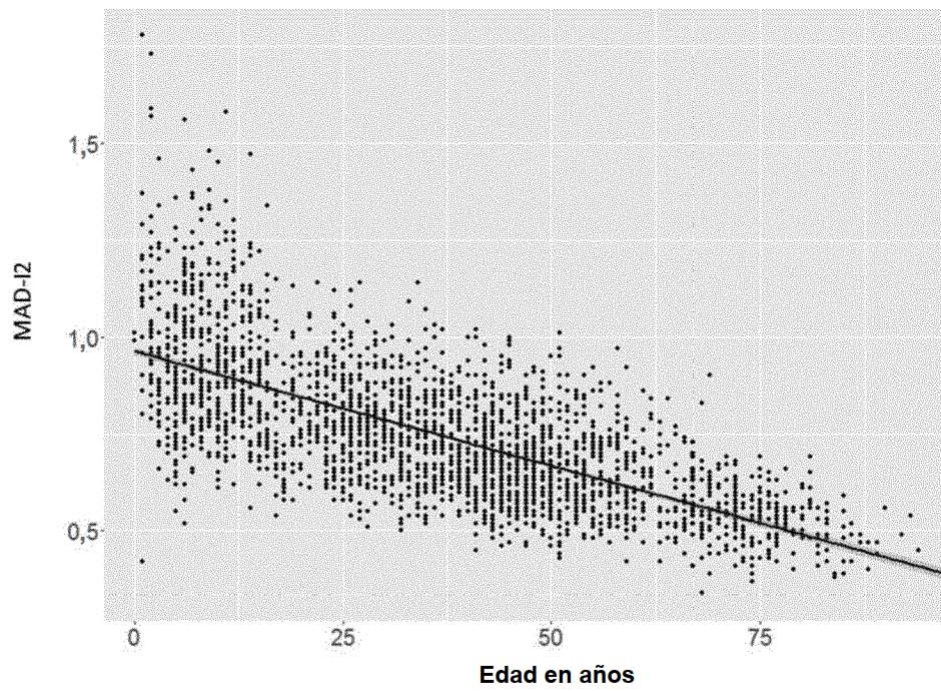
longitud de los telómeros o una longitud de los telómeros más larga se correlaciona con una mejor eficacia del fármaco.

5 14. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la muestra de ensayo biológica aislada se selecciona de: células, tejidos y/o fluido biológico.

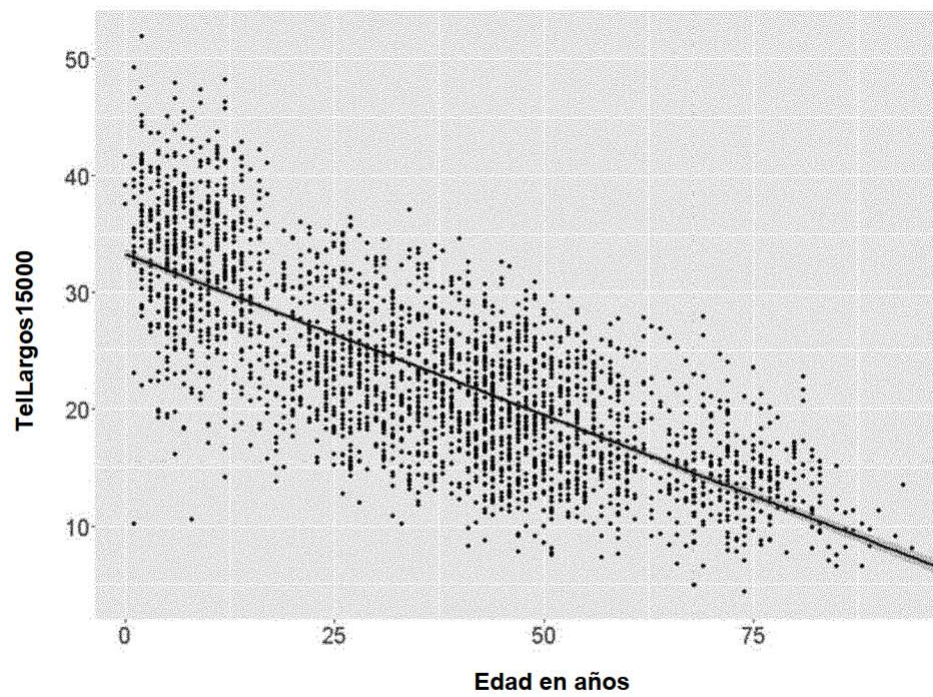
10 15. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la muestra de ensayo biológica aislada se selecciona de la lista que consiste en: plasma, suero, sangre, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina, saliva, mucosa, flema y esputo, preferentemente plasma, suero o sangre.

15 16. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la enfermedad asociada a los telómeros se selecciona de la lista que consiste en: cáncer, enfermedad cardiovascular, disqueratosis congénita, fibrosis pulmonar, anemia aplásica, neumonía intersticial, diabetes, infertilidad, enfermedades hemáticas, enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades hepáticas y enfermedades metabólicas.

17. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: próstata, pulmón, colon, gástrico, melanoma, ovario, mama y neoplasias hemáticas.



**FIG. 1A**



**FIG. 1B**

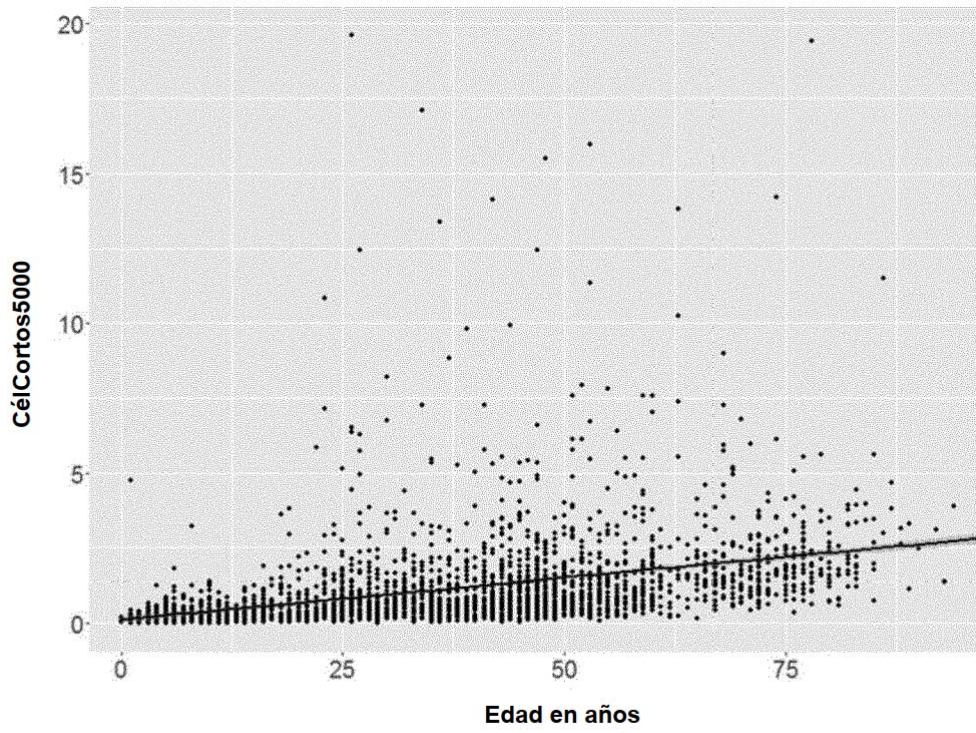


FIG. 1C

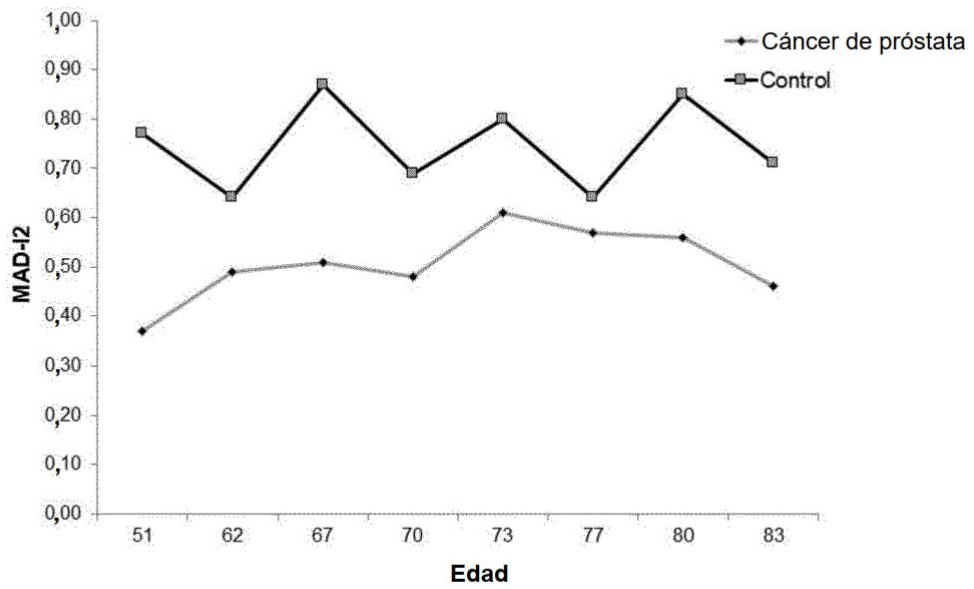


FIG. 2A

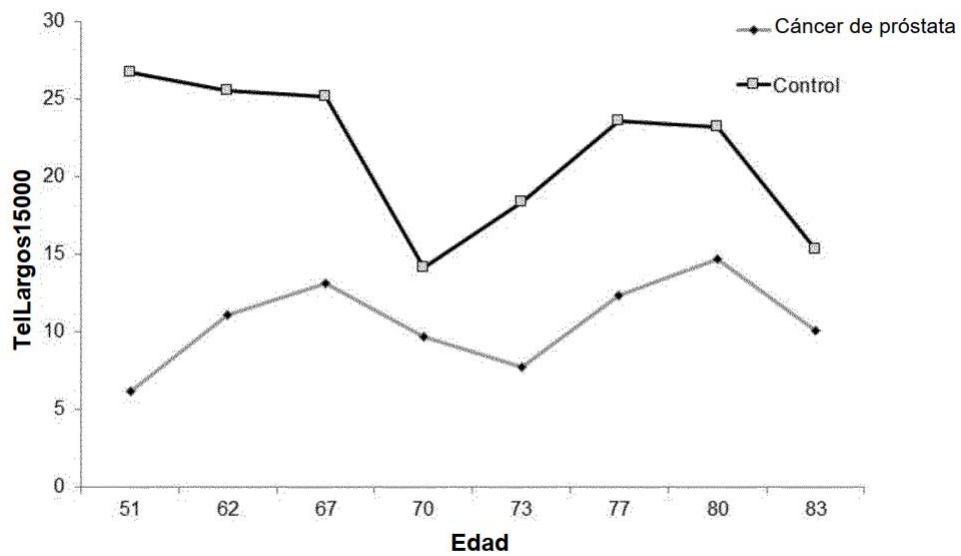


FIG. 2B

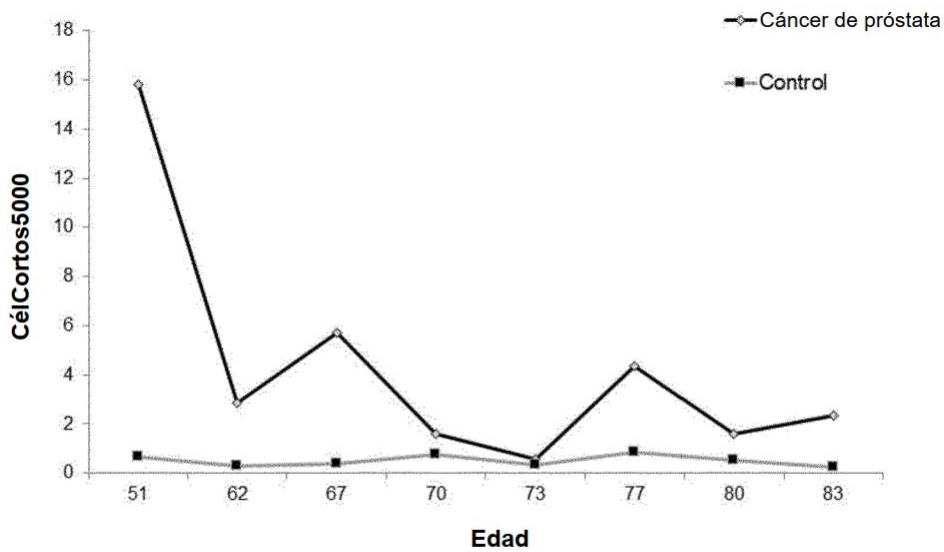


FIG. 2C

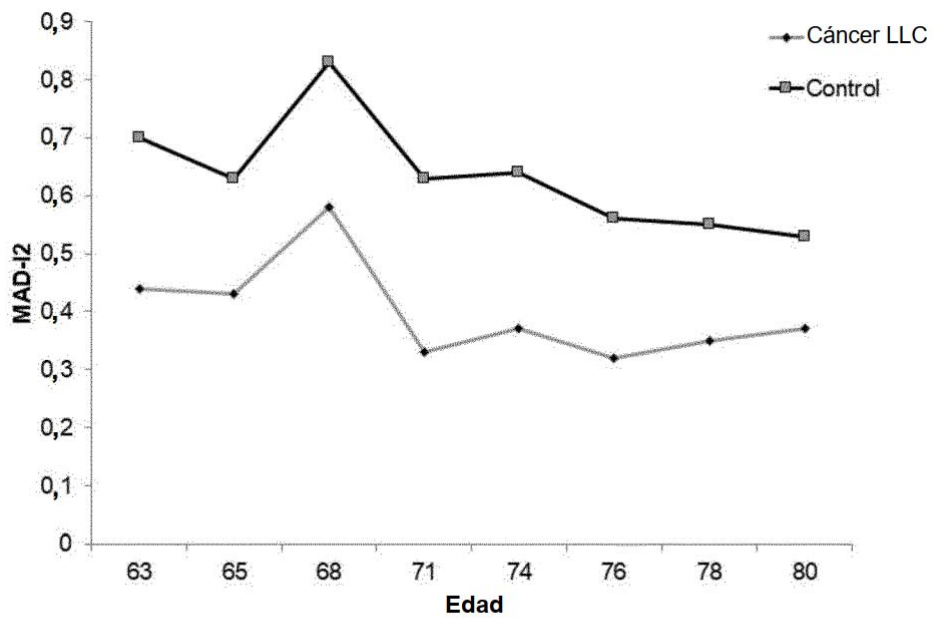


FIG. 3A

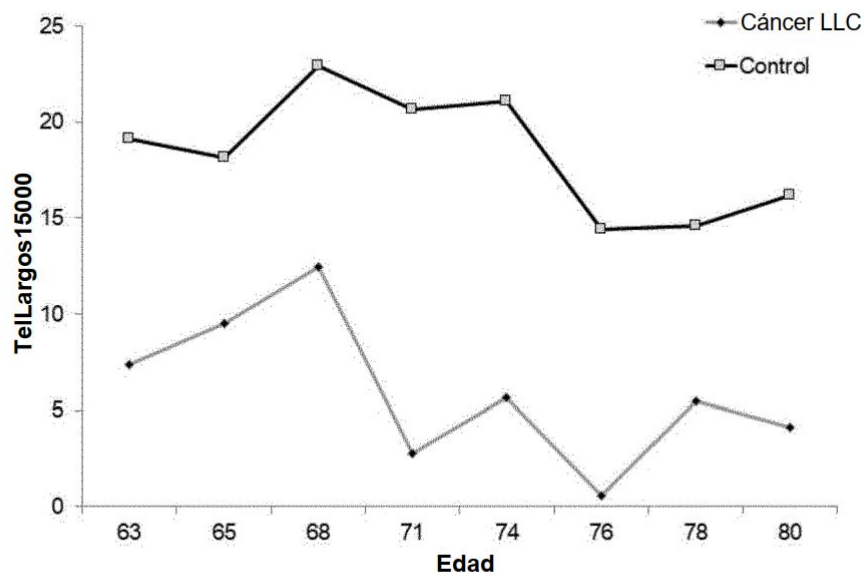


FIG. 3B

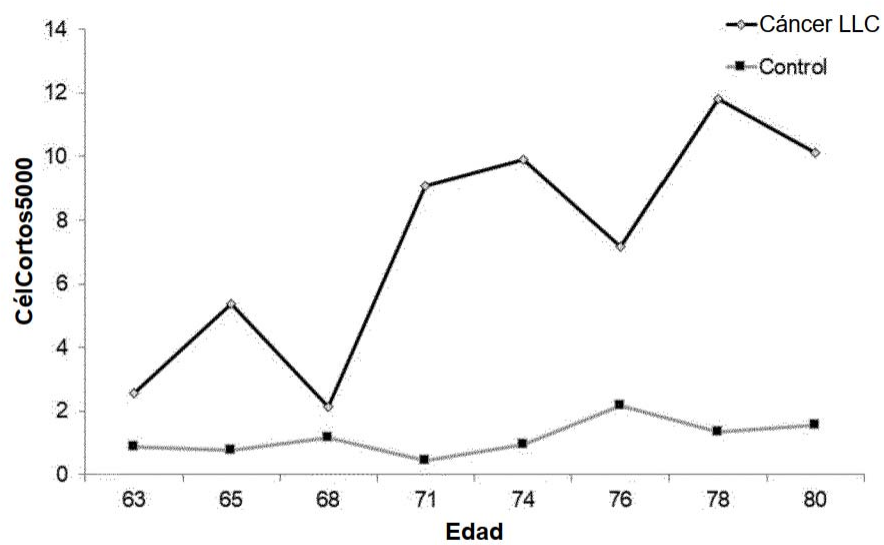


FIG. 3C

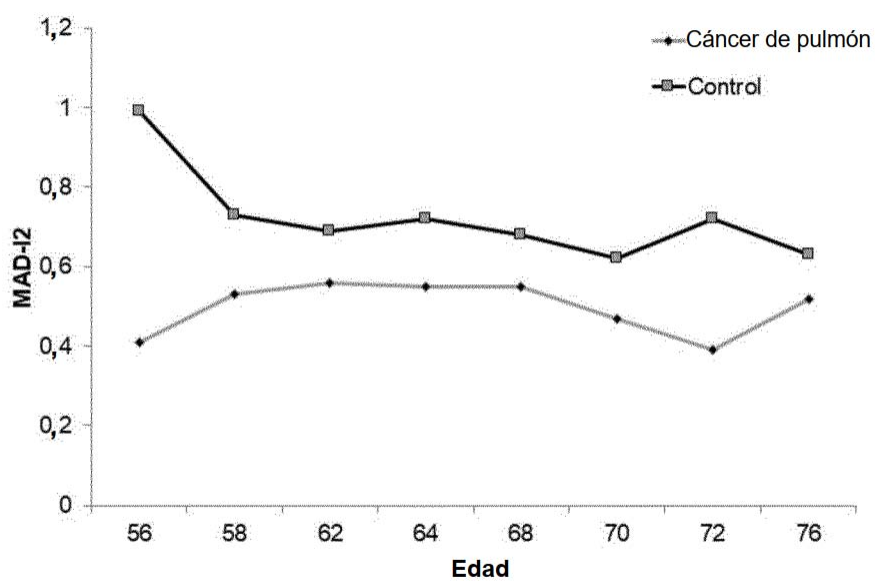


FIG. 4A

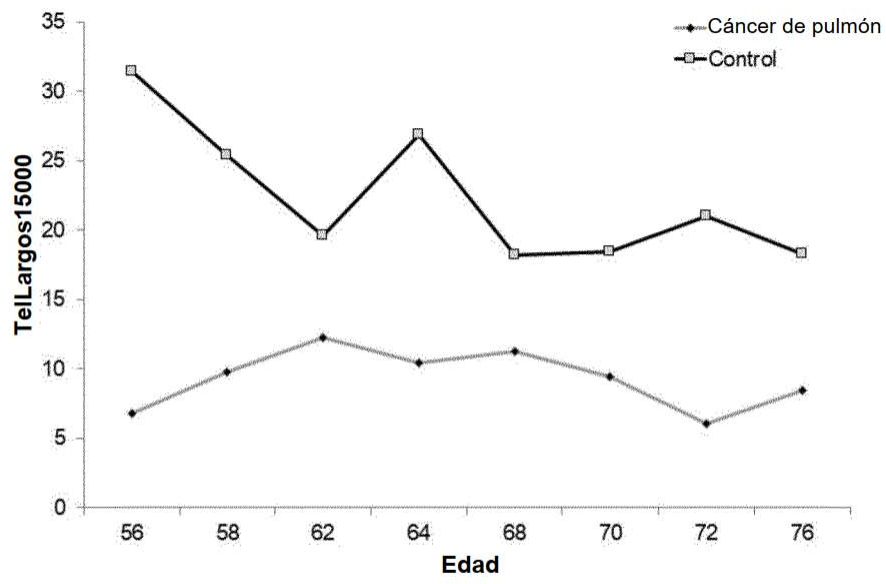


FIG. 4B

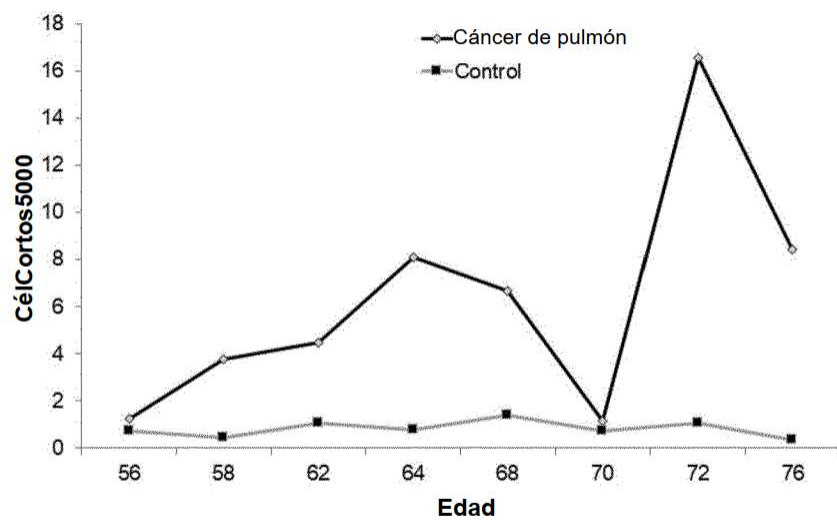


FIG. 4C

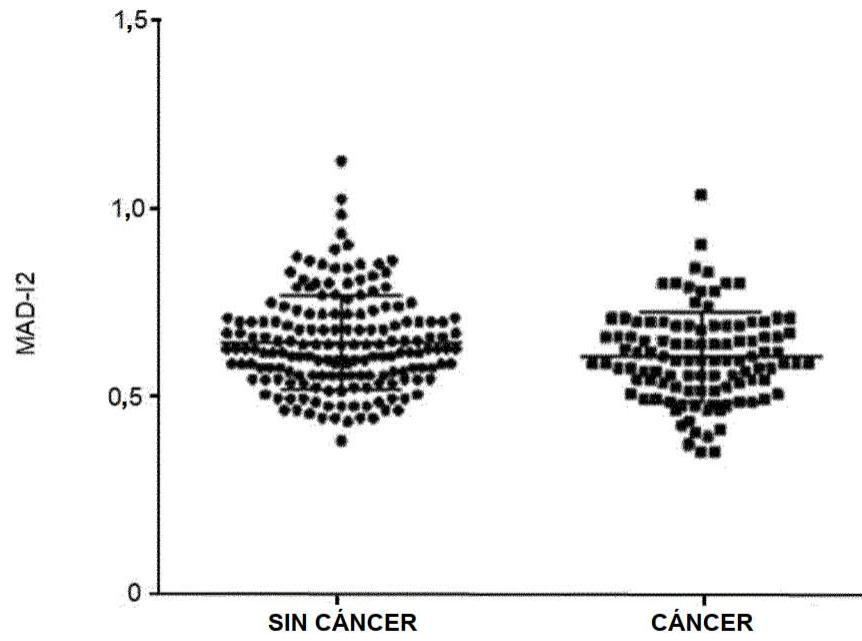


FIG. 5A

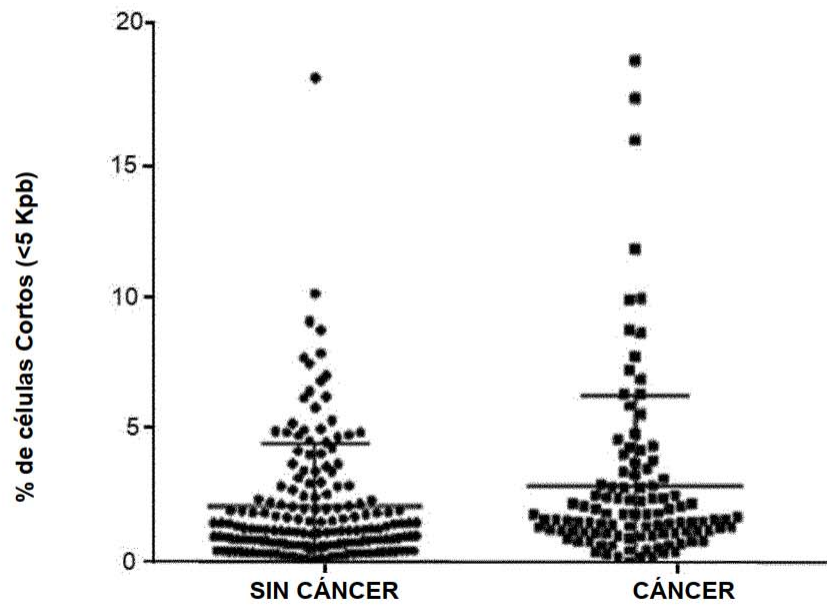


FIG. 5B

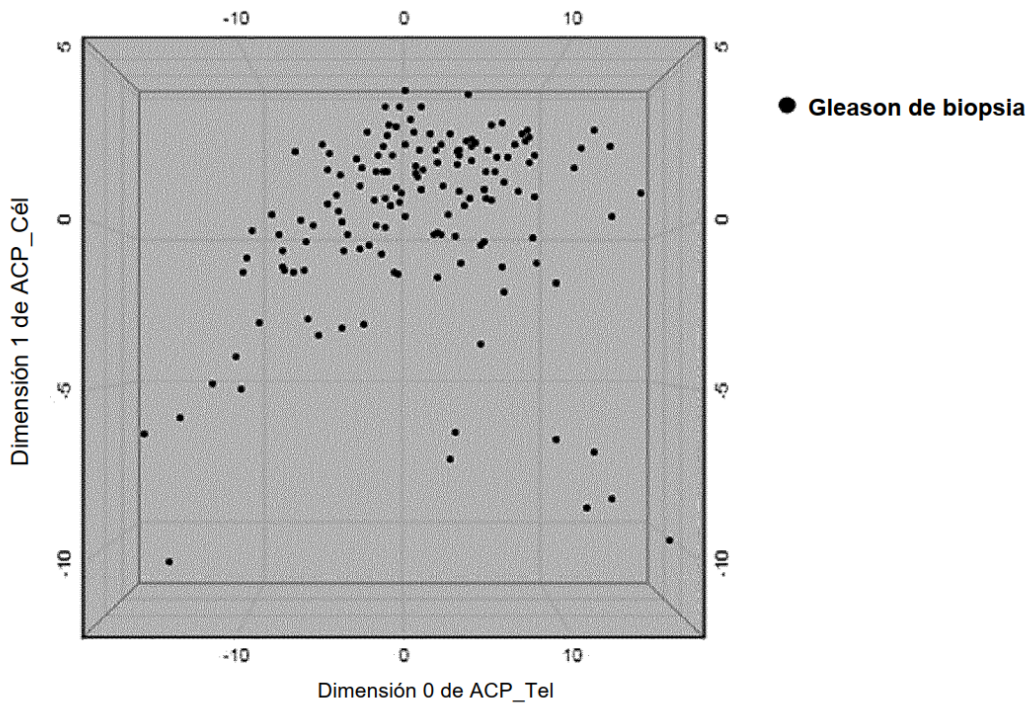


FIG. 6

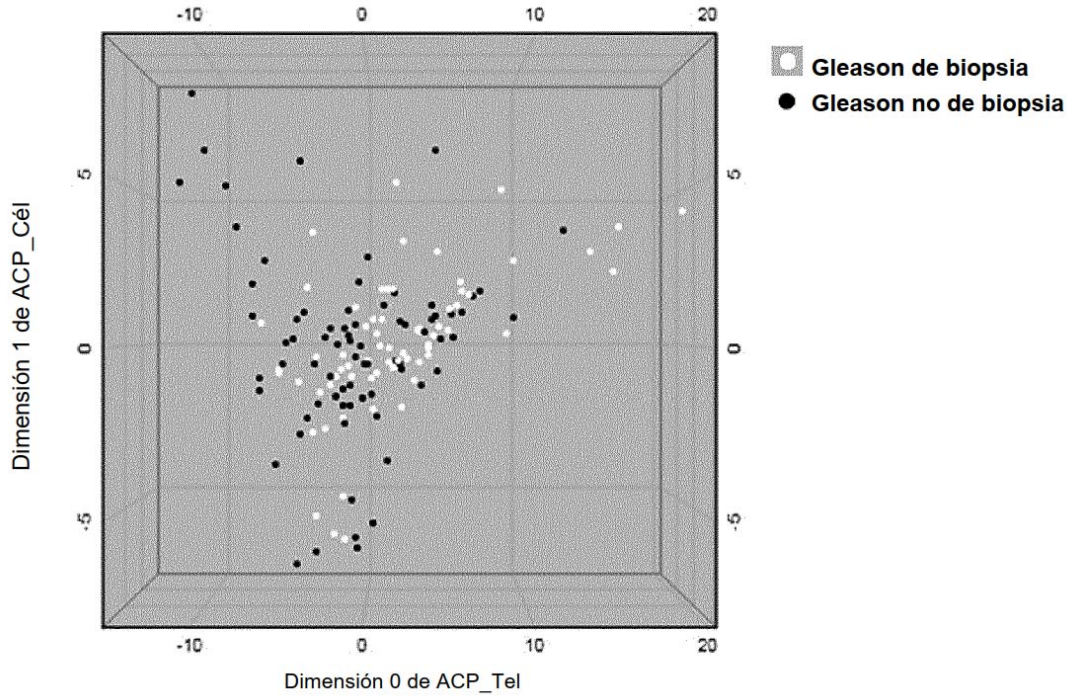


FIG. 7

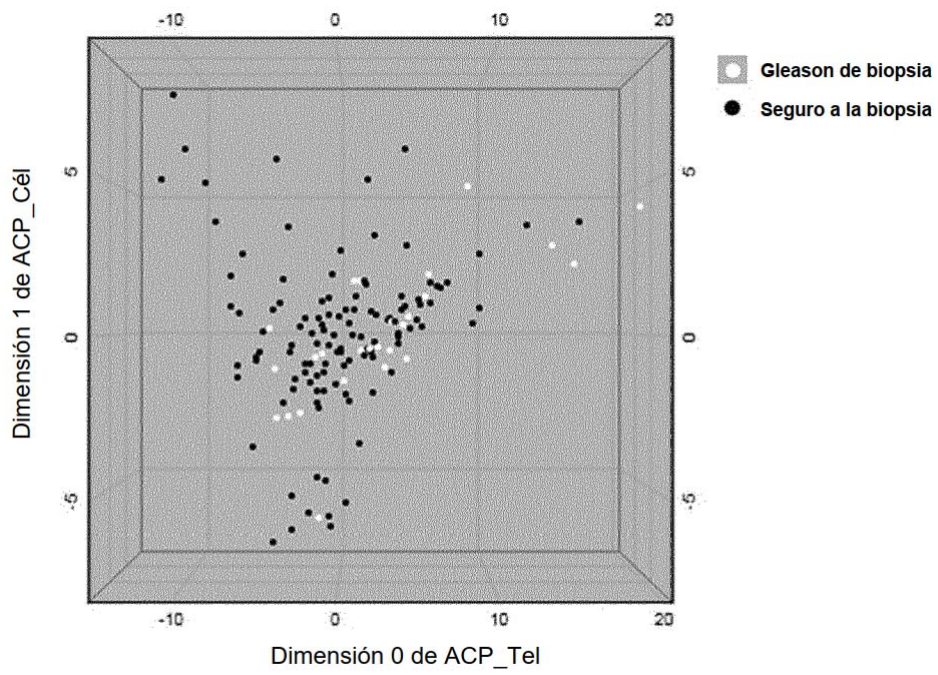


FIG. 8

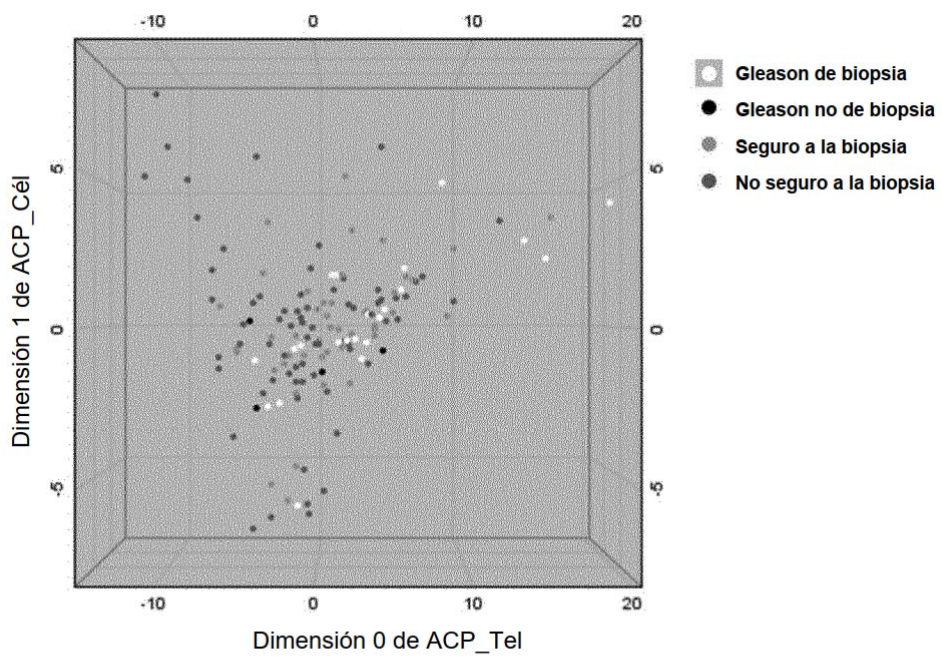


FIG. 9

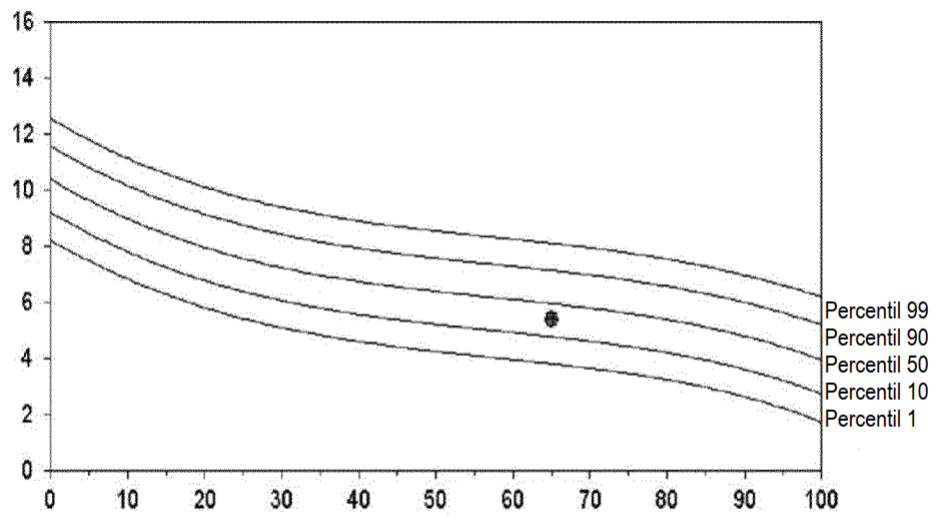


FIG. 10A

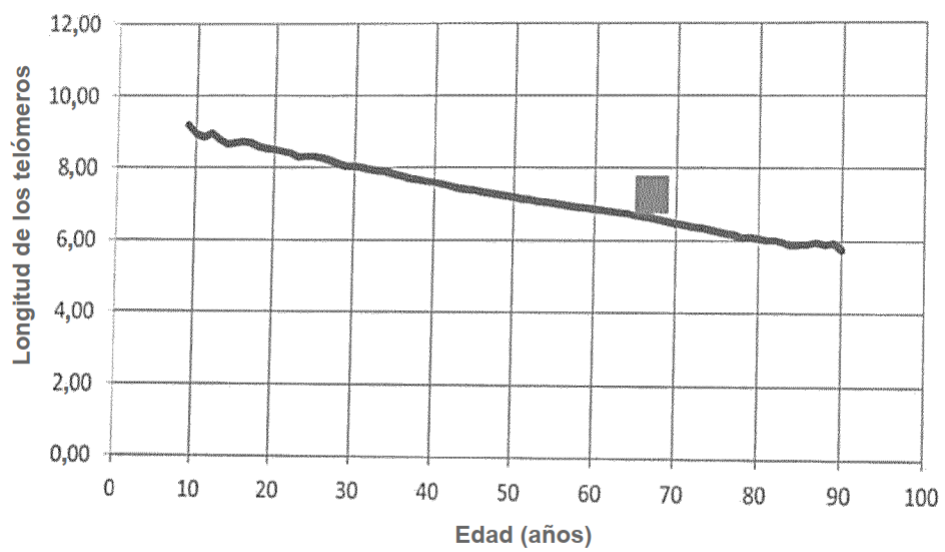


FIG. 10B

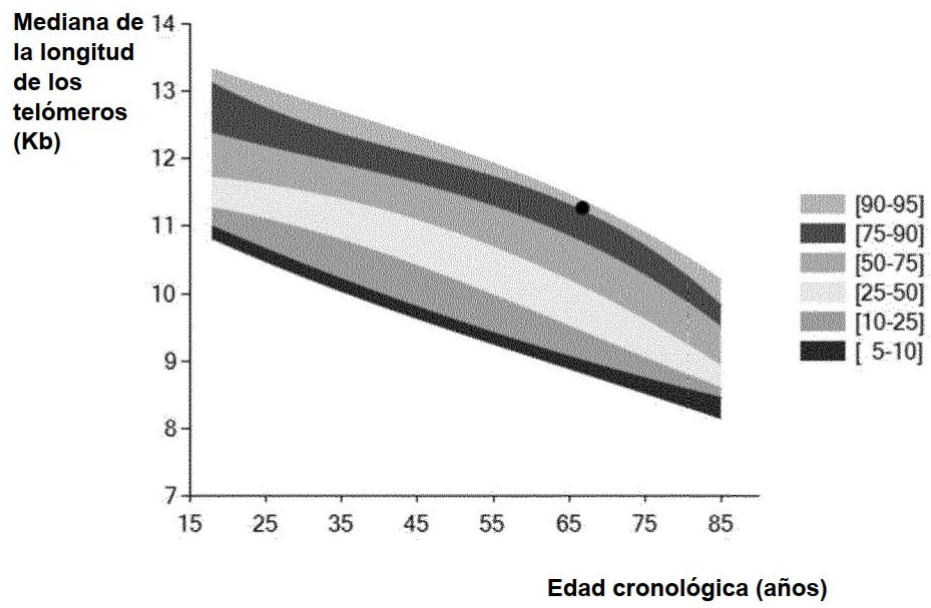


FIG. 10C

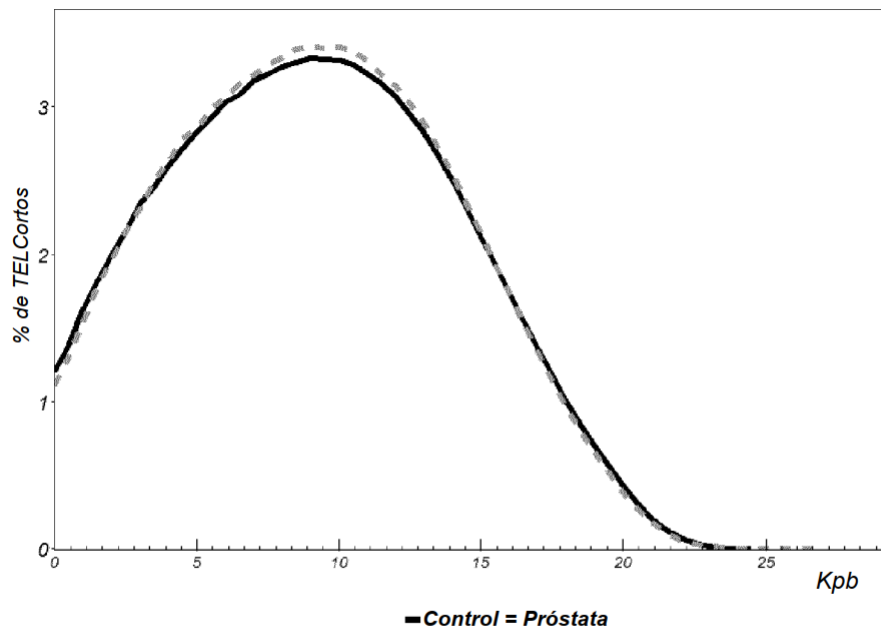


FIG. 11A

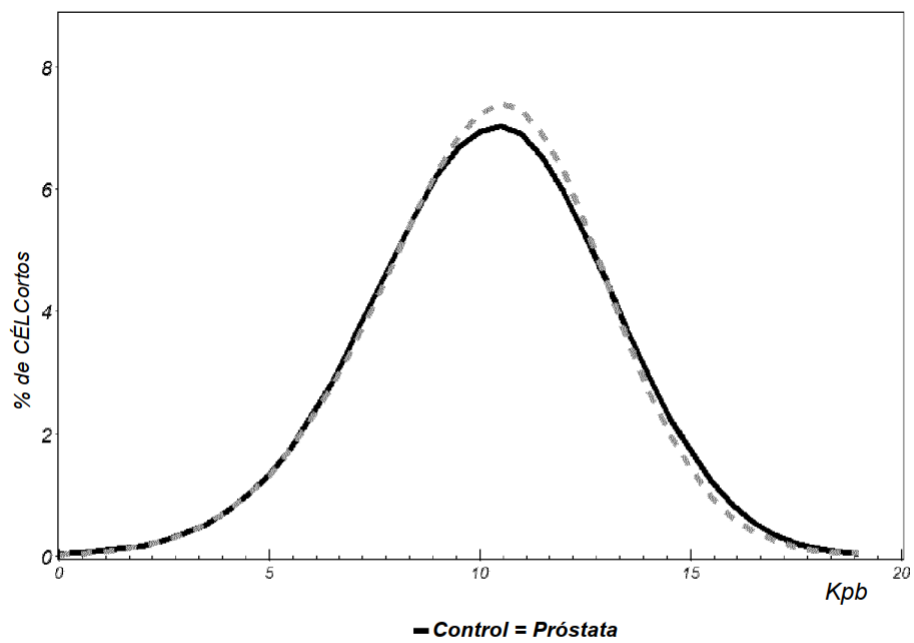


FIG. 11B

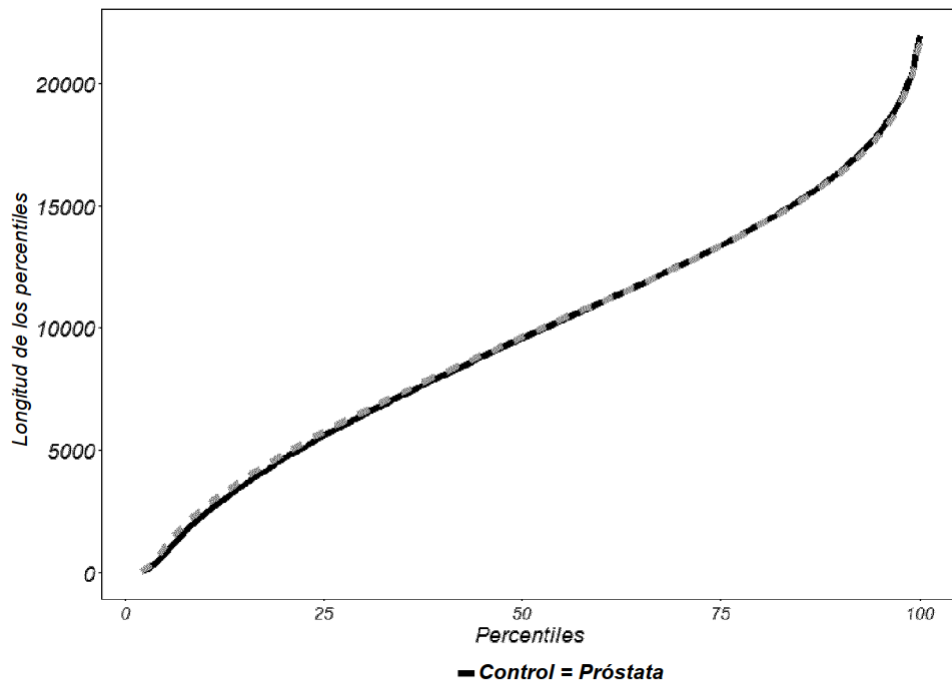


FIG. 11C

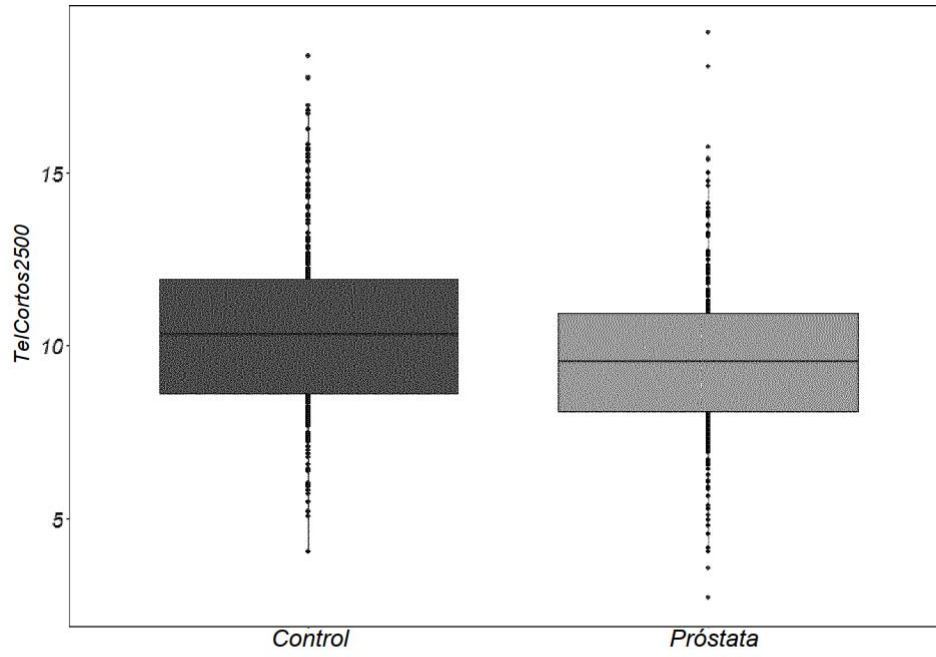


FIG. 12A

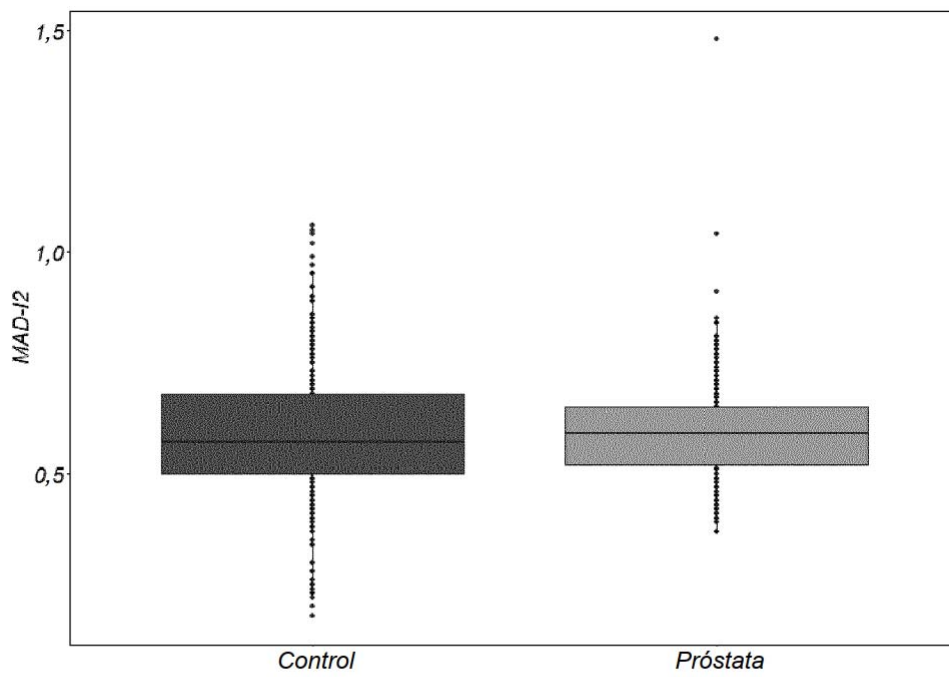


FIG. 12B

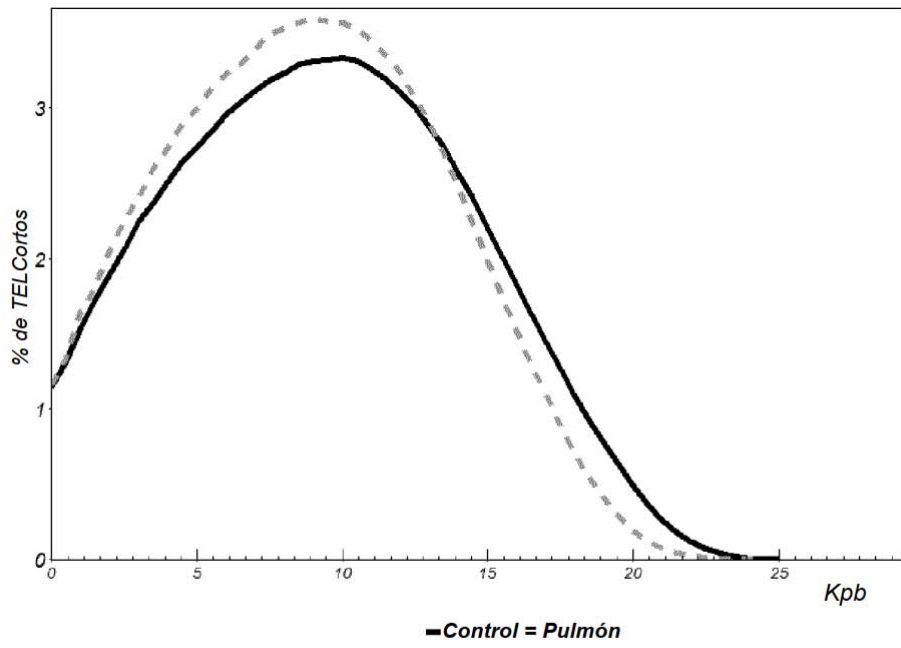


FIG. 13A

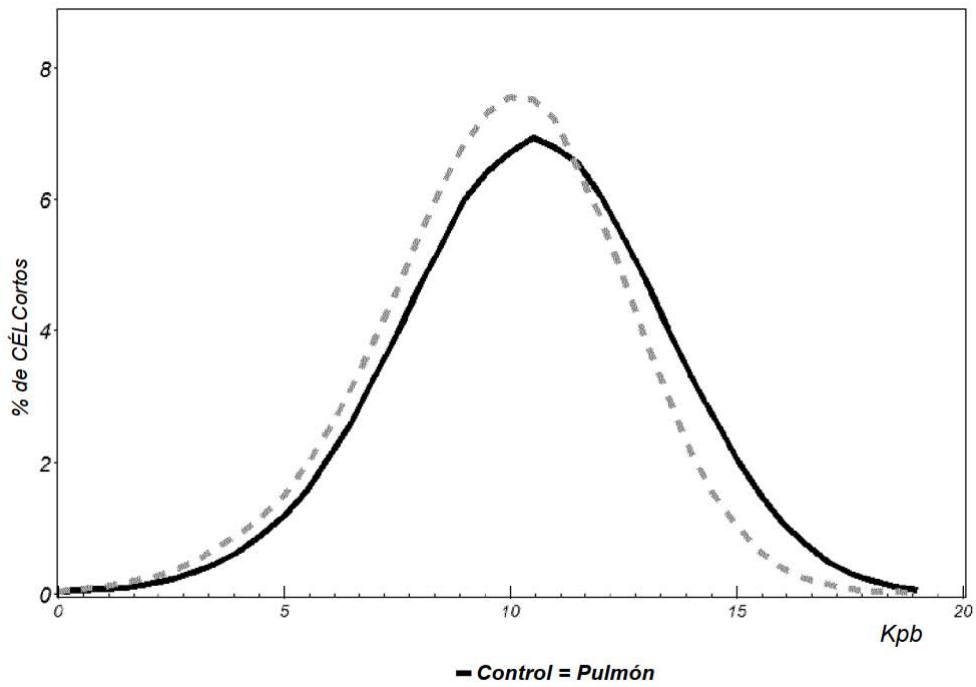


FIG. 13B

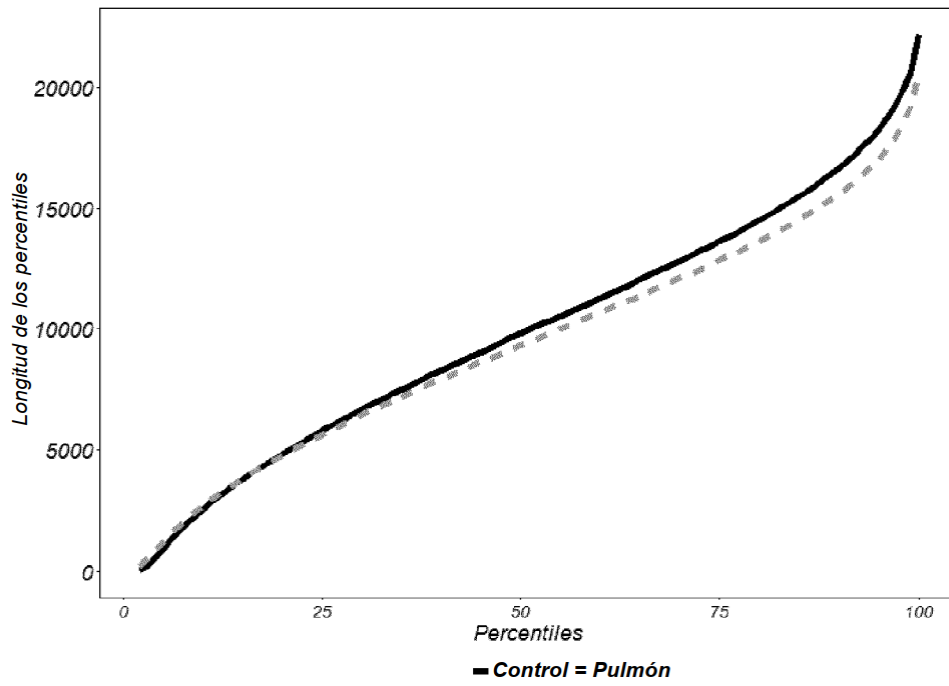


FIG. 13C

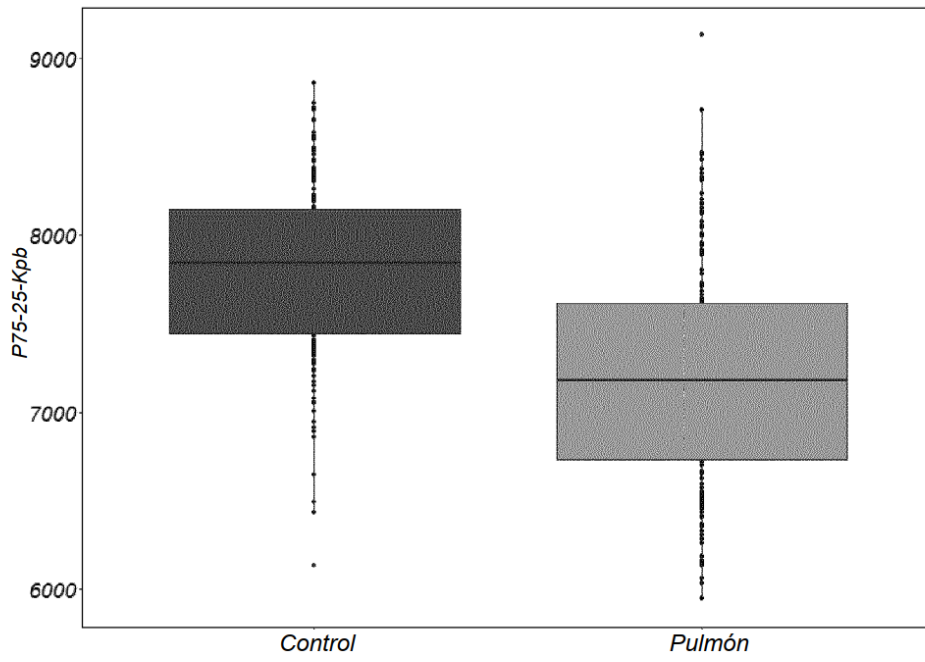


FIG. 14A

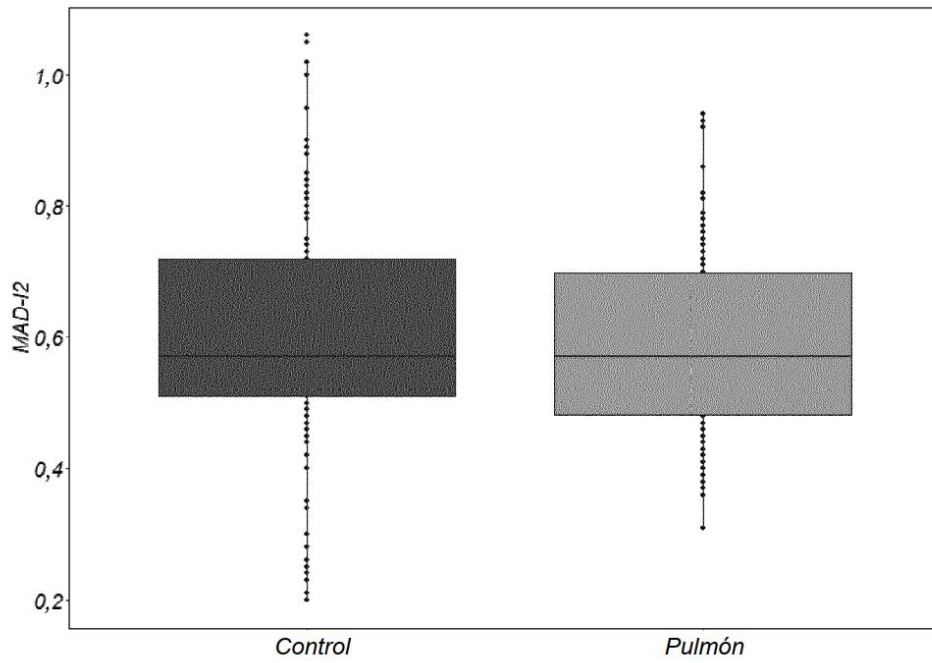


FIG. 14B

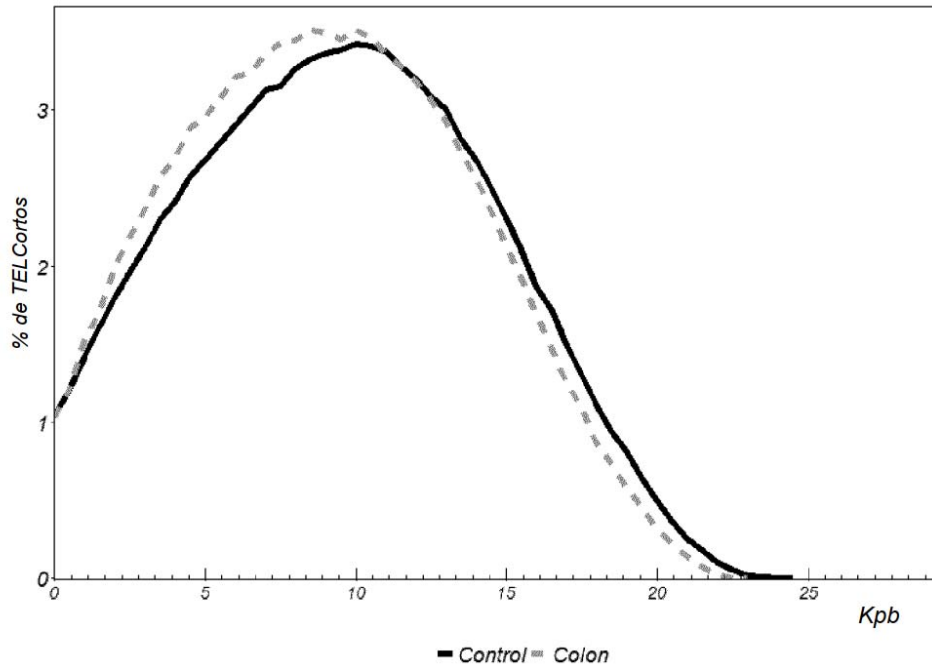


FIG. 15A

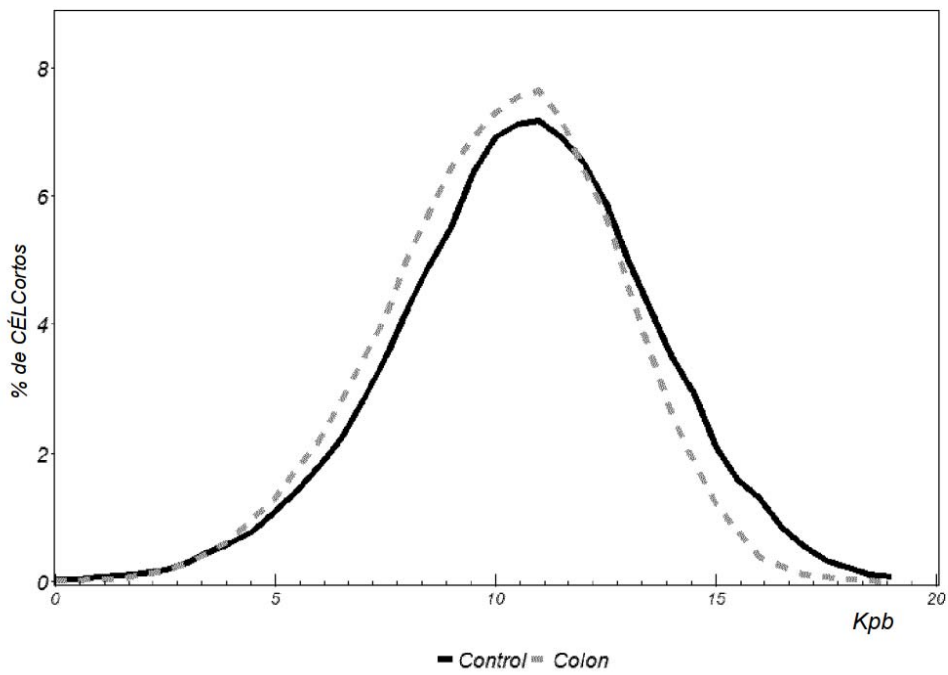


FIG. 15B

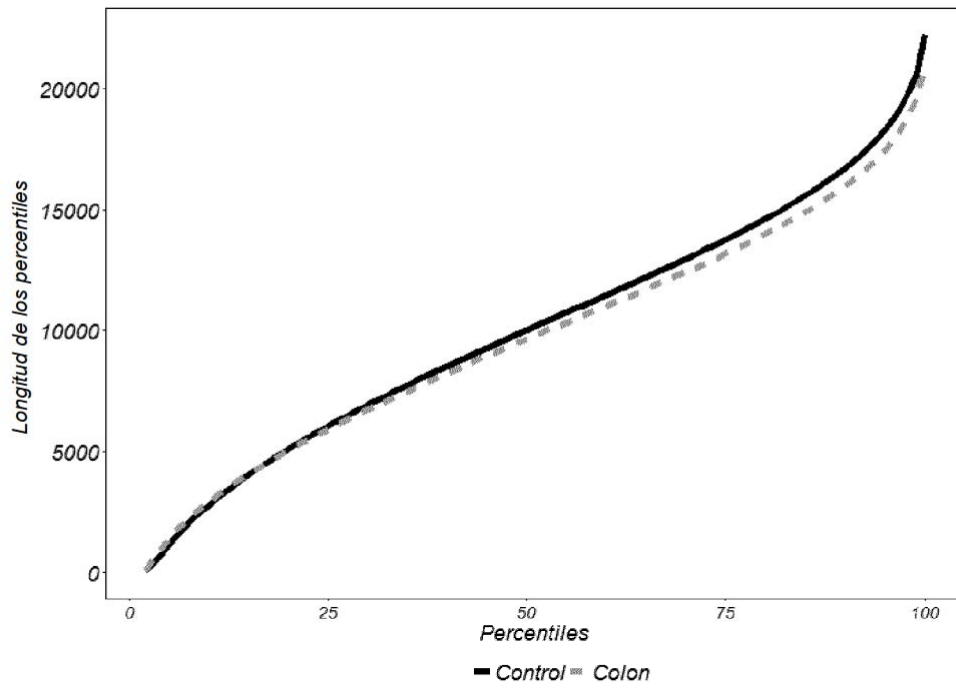


FIG. 15C

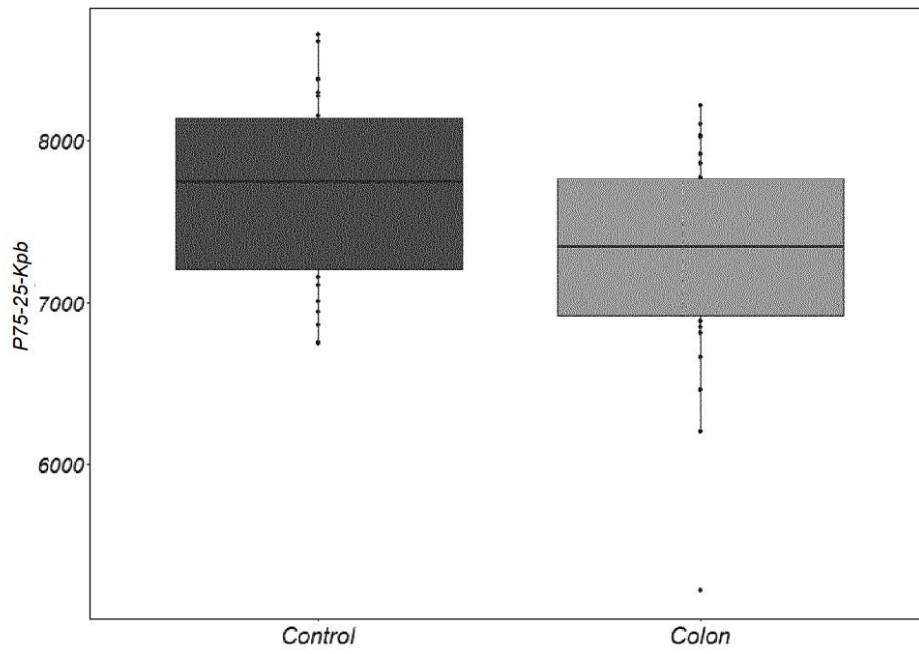


FIG. 16A

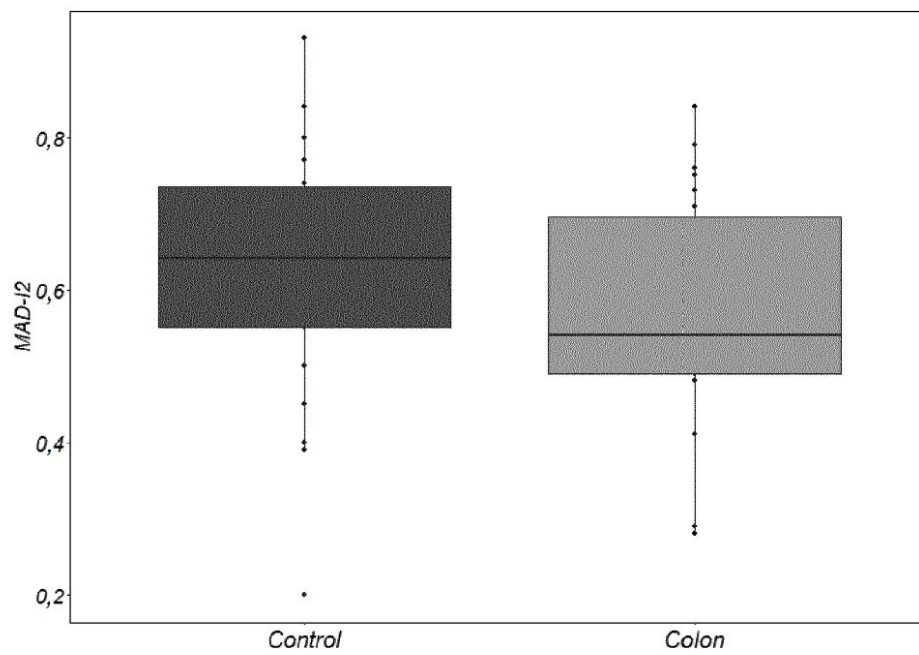


FIG. 16B

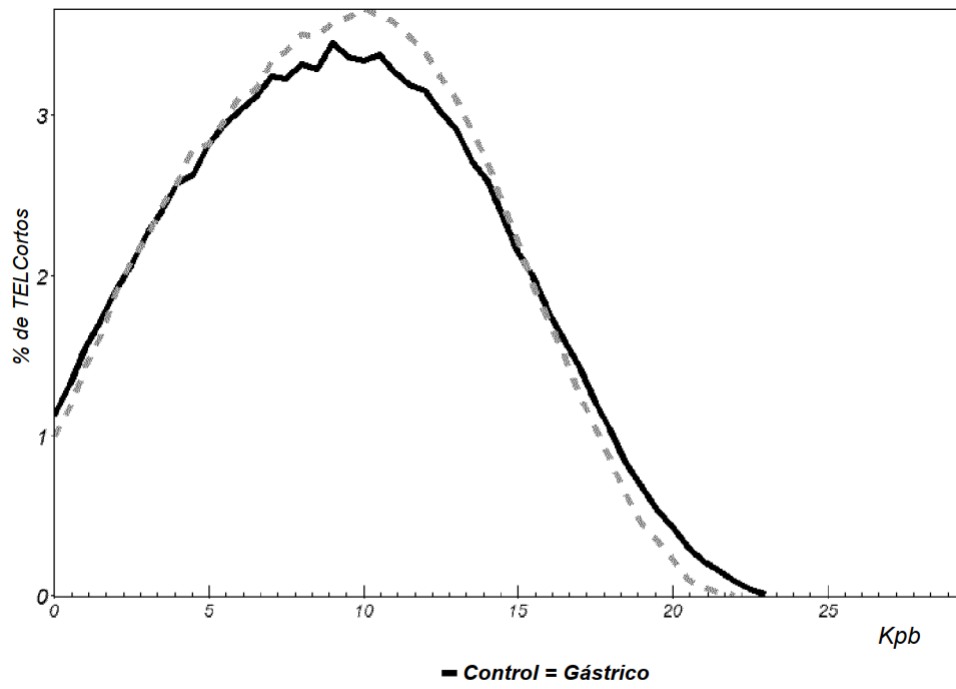


FIG. 17A

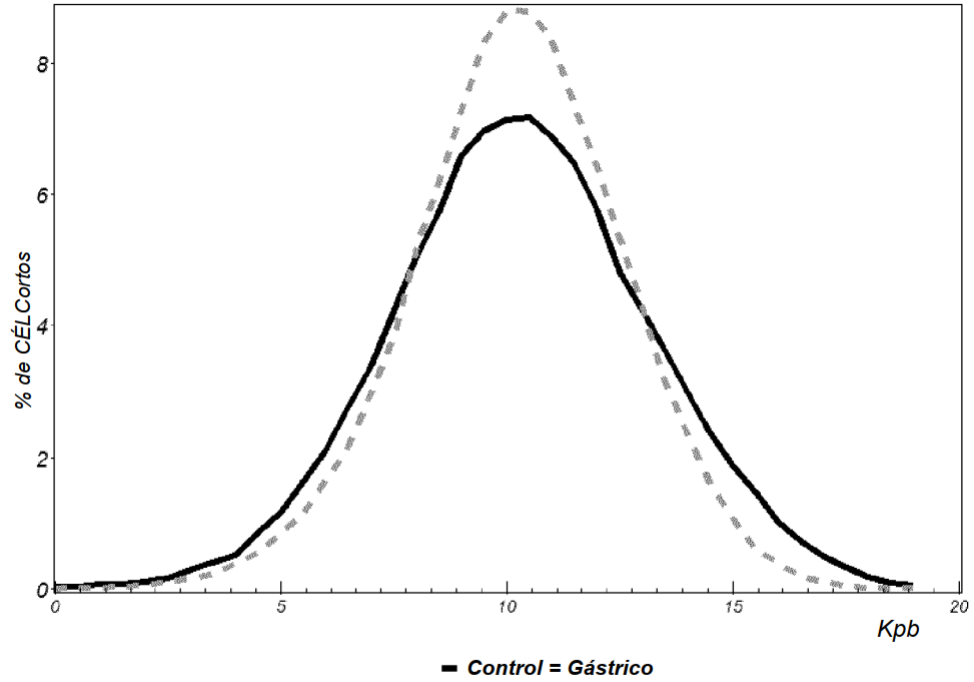


FIG. 17B

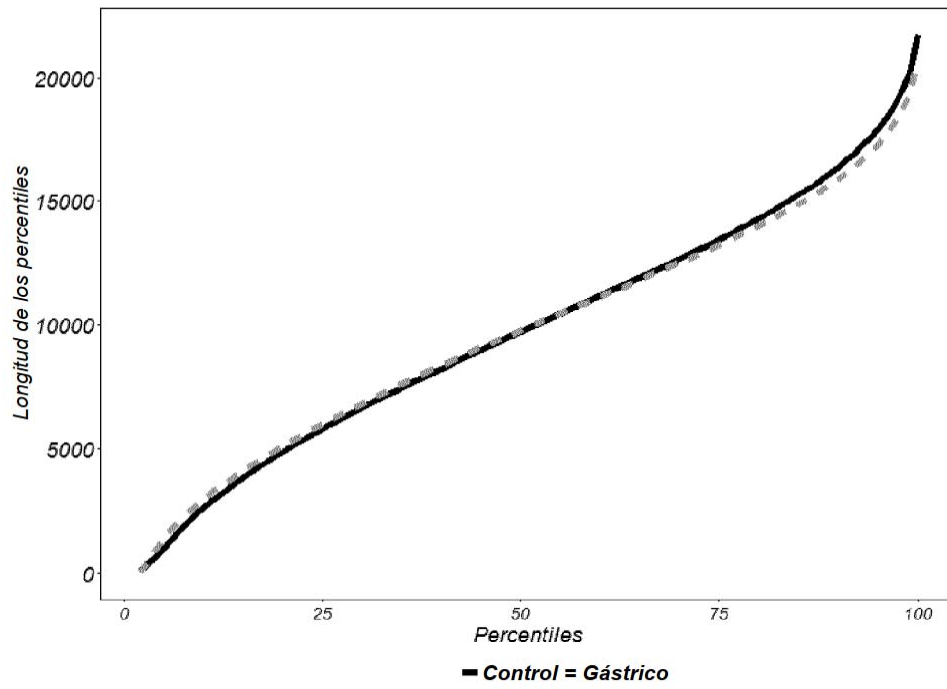


FIG. 17C

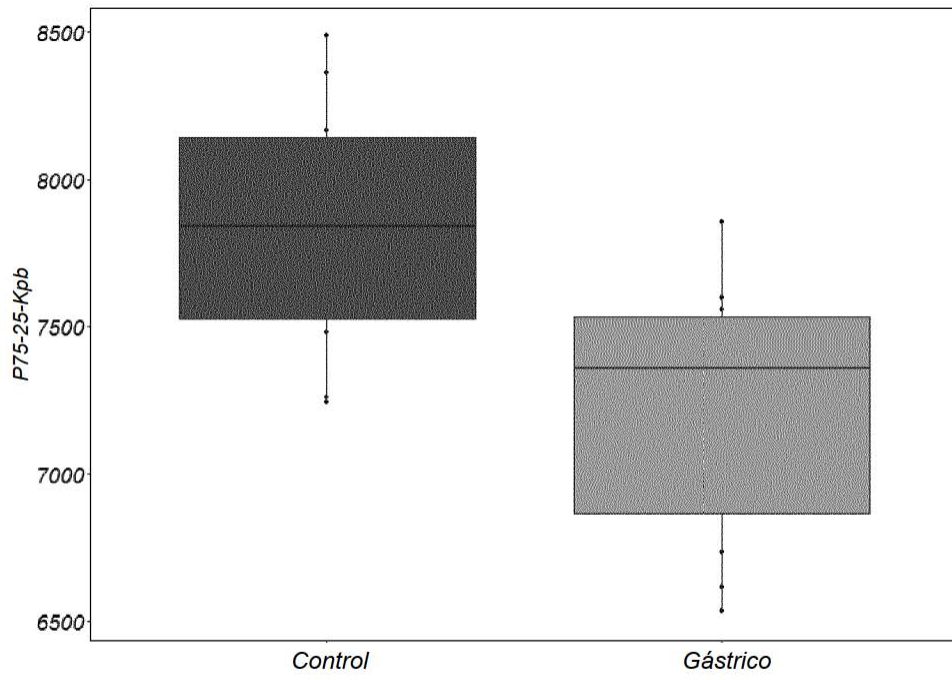


FIG. 18A

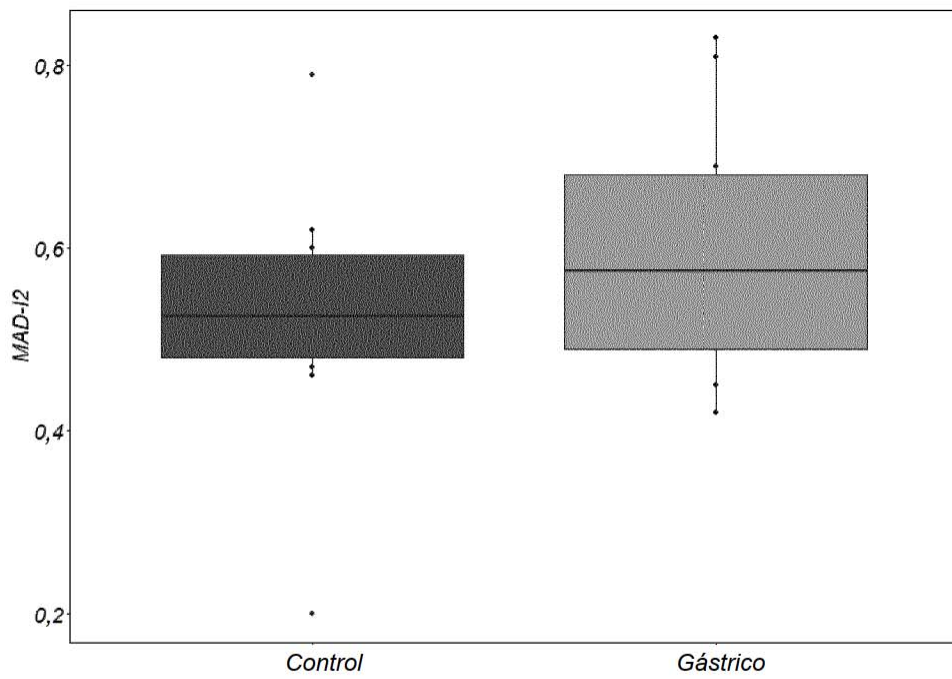


FIG. 18B

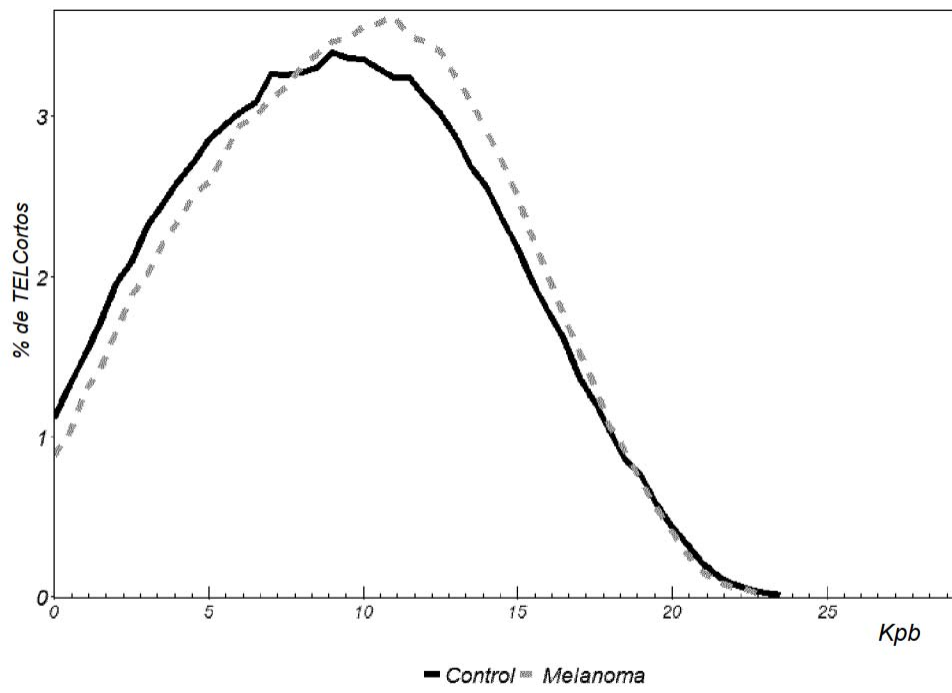


FIG. 19A

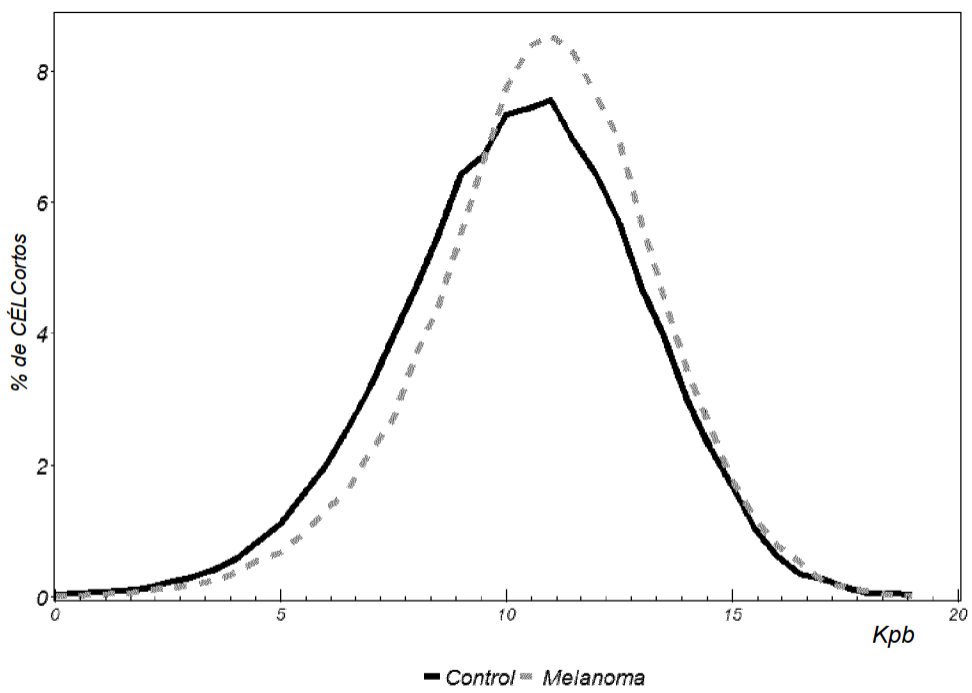


FIG. 19B

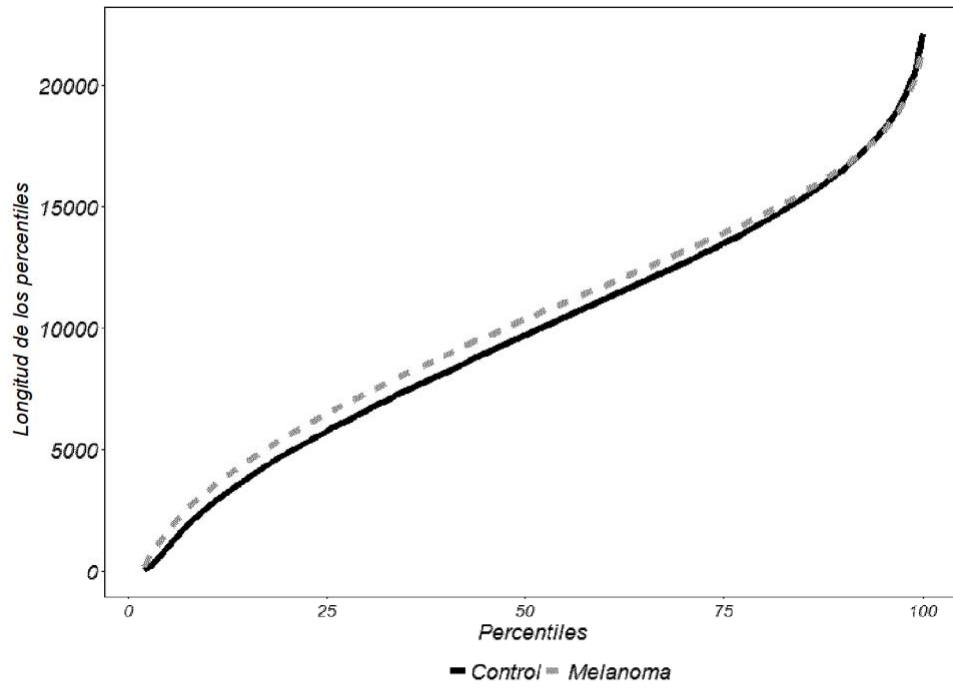


FIG. 19C

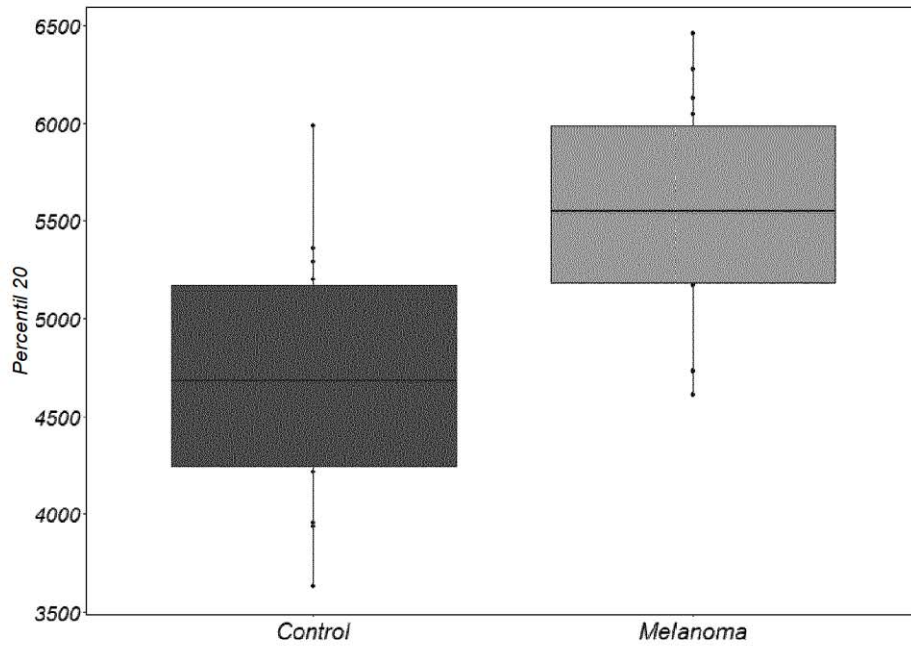


FIG. 20A

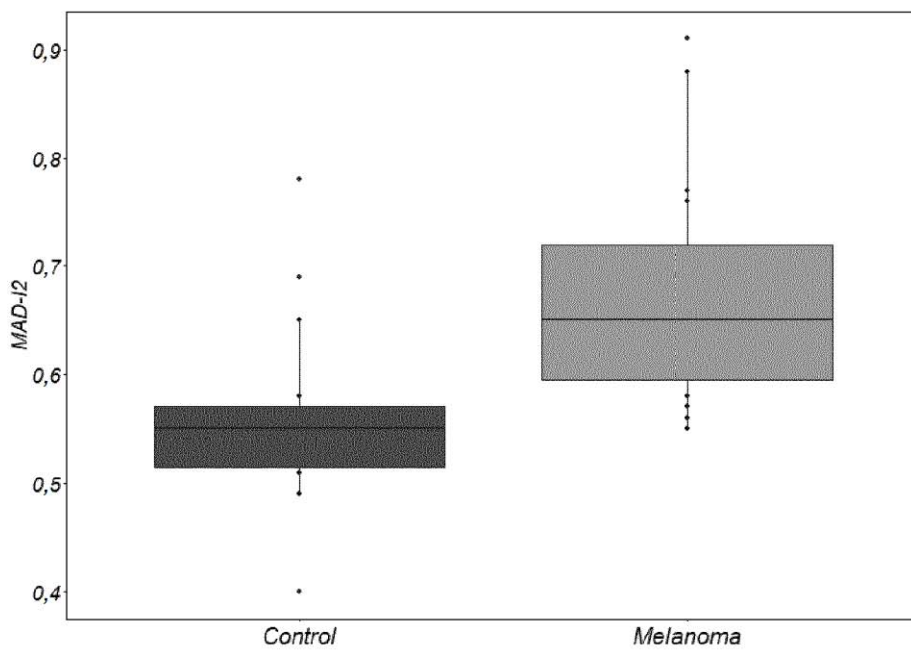


FIG. 20B

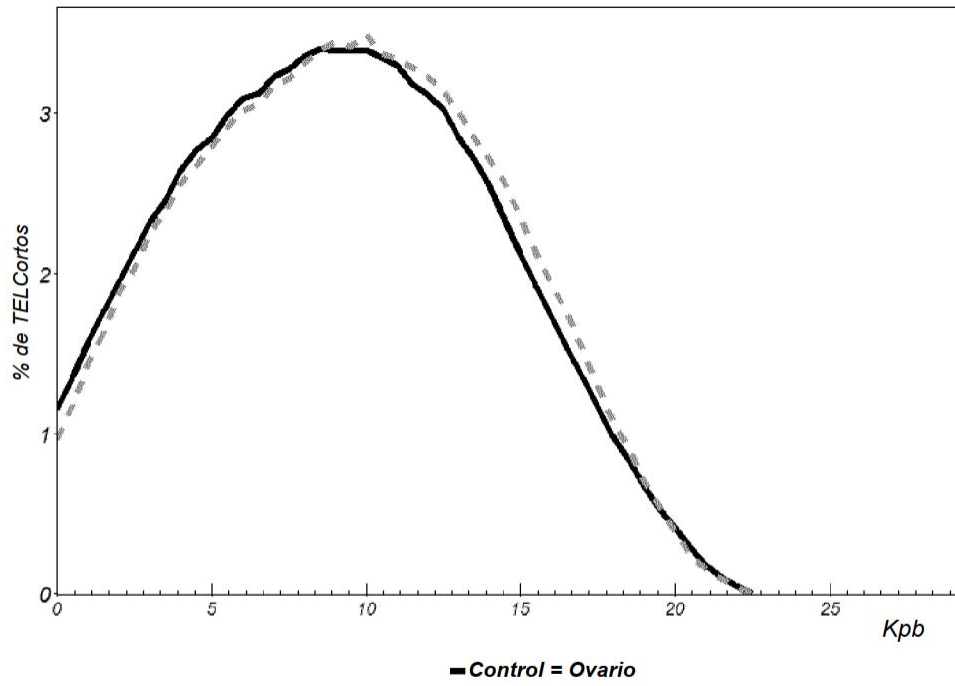


FIG. 21A

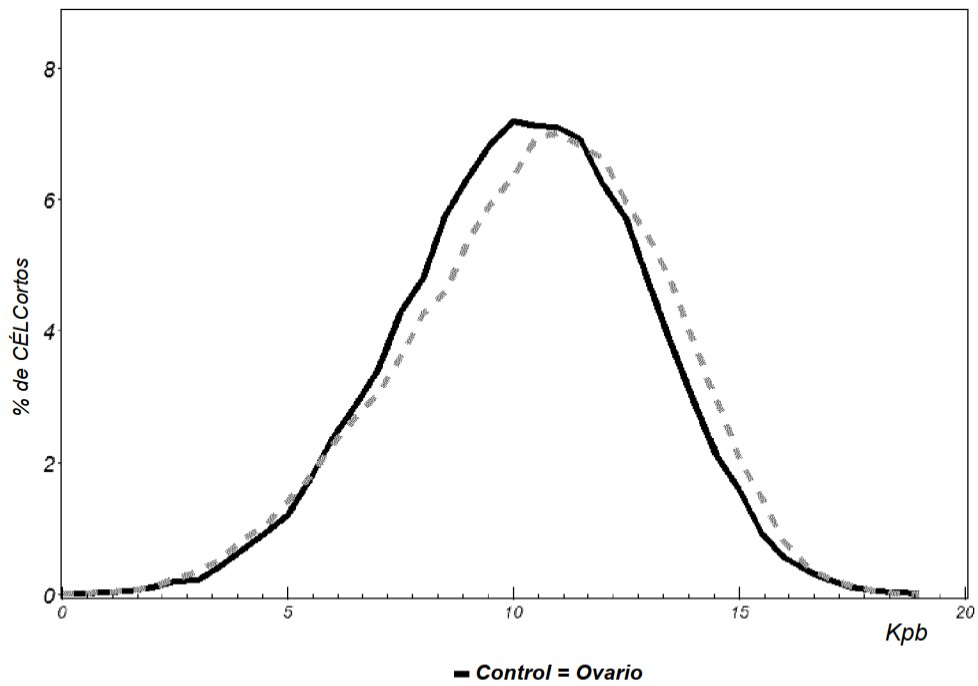


FIG. 21B

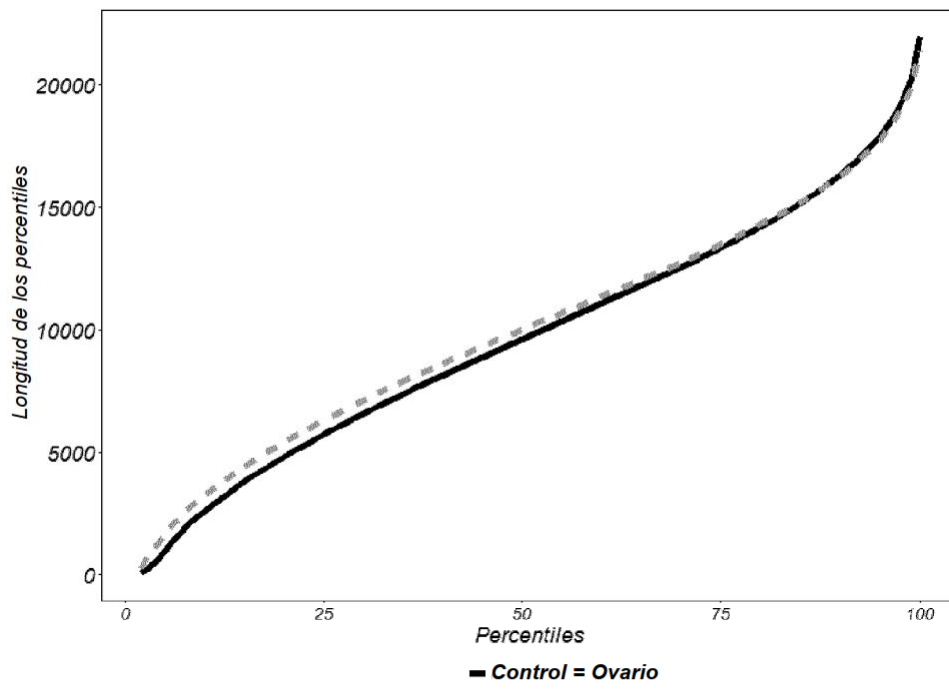


FIG. 21C

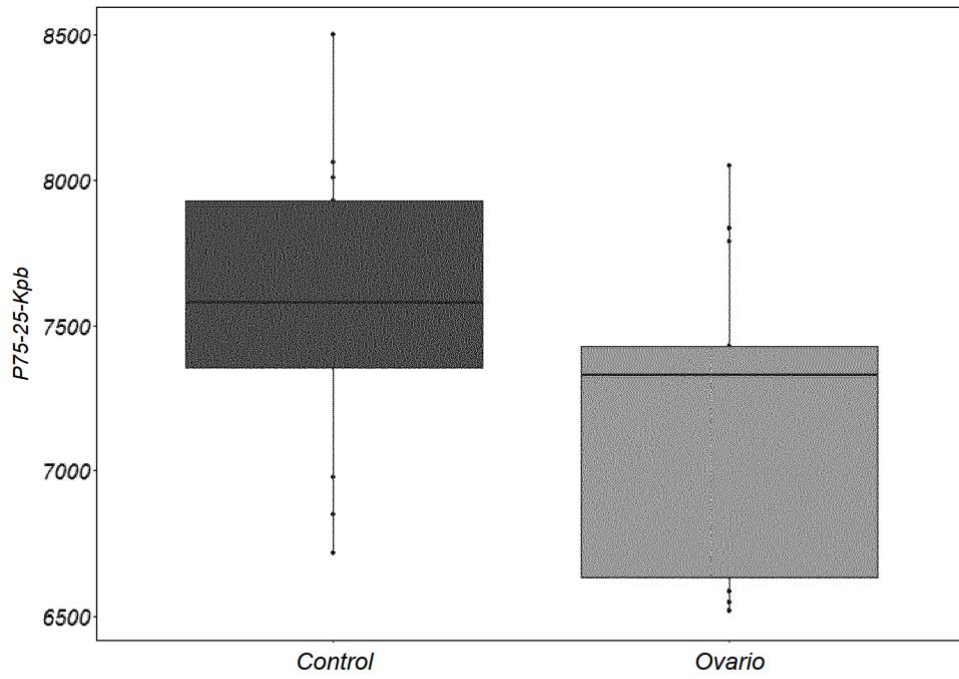


FIG. 22A

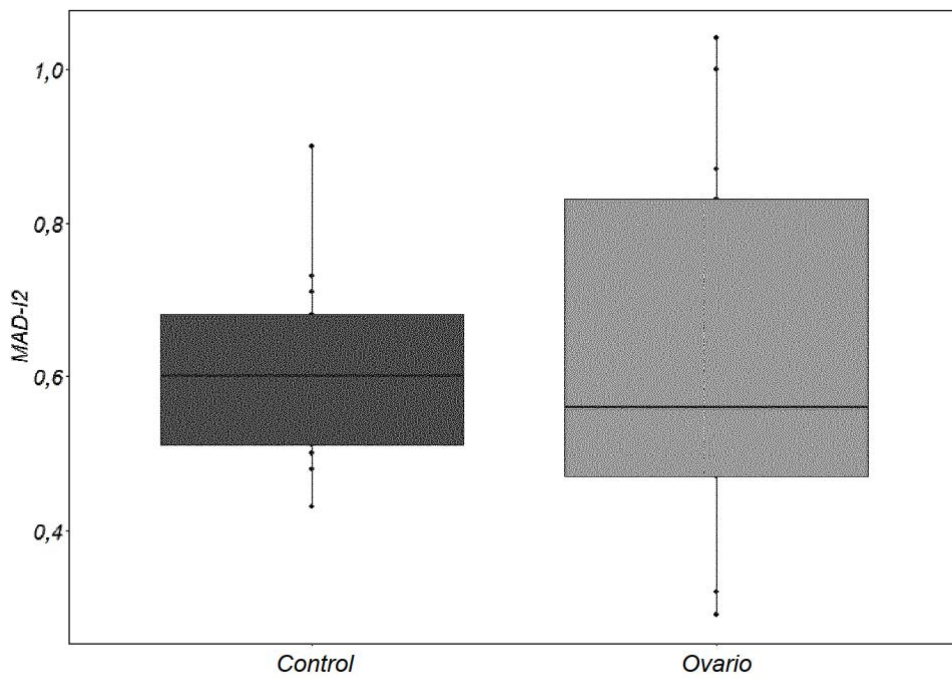


FIG. 22B

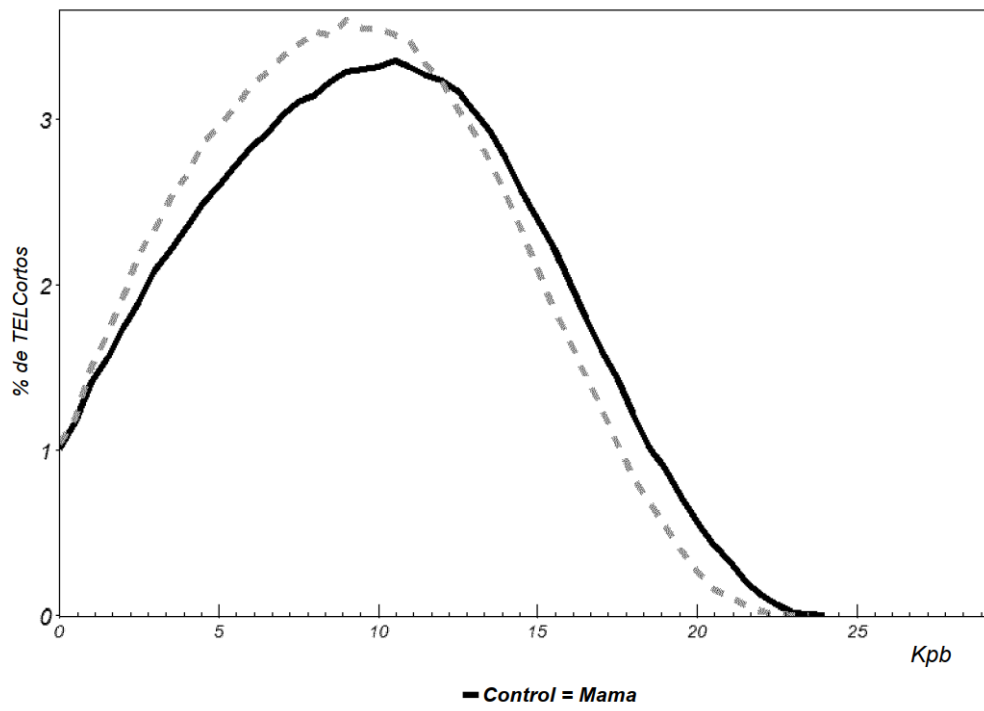


FIG. 23A

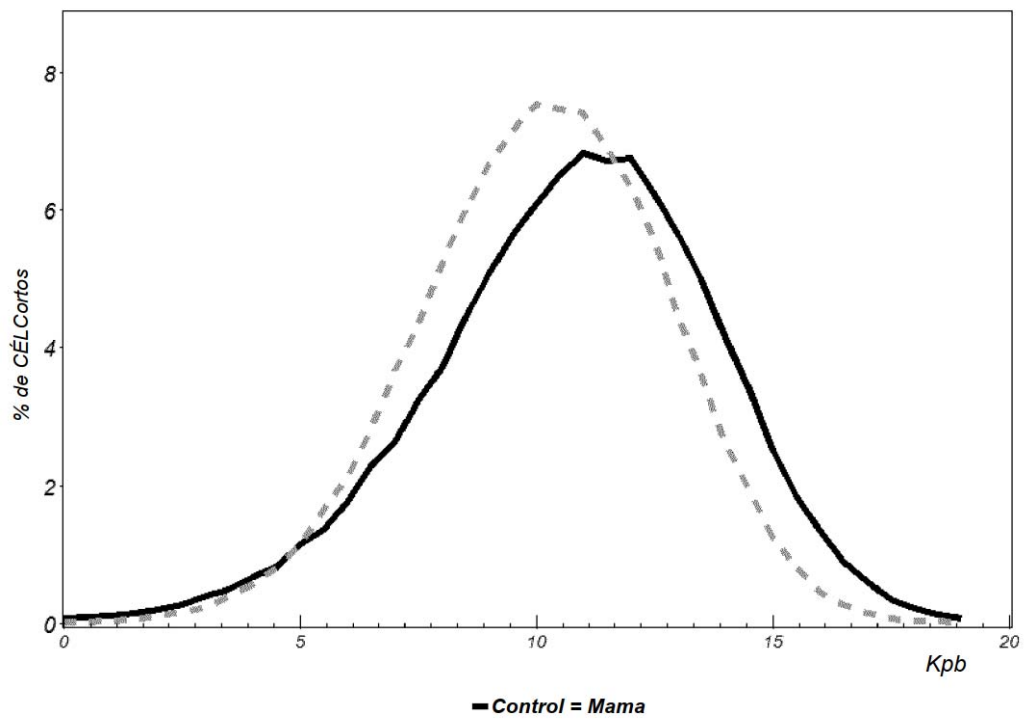


FIG. 23B

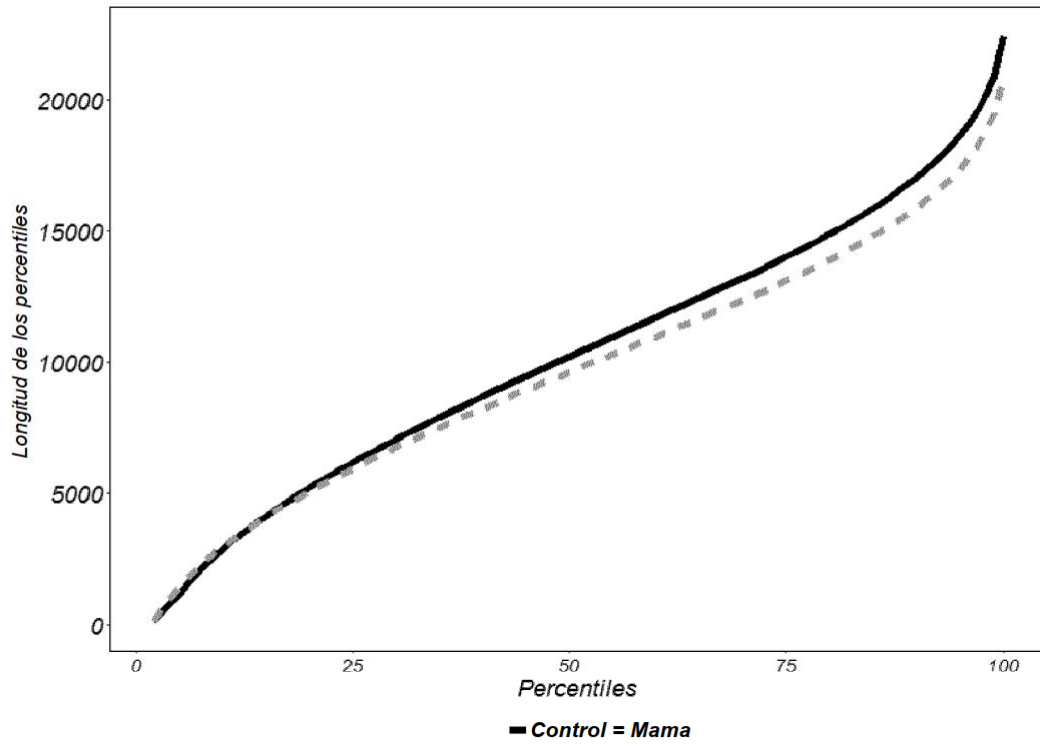


FIG. 23C

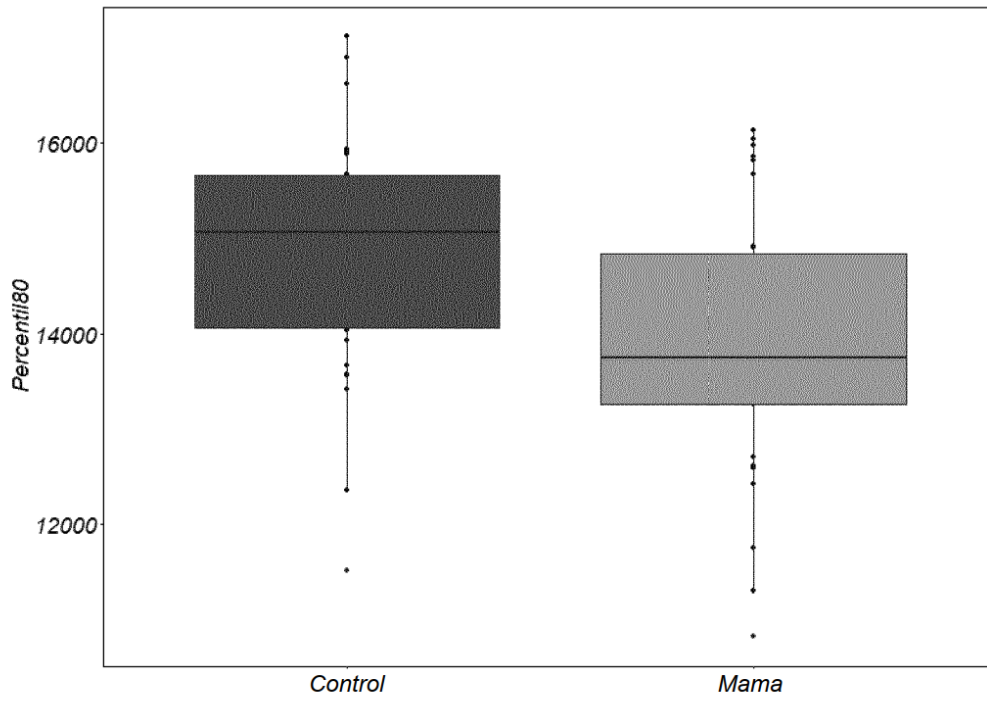


FIG. 24A

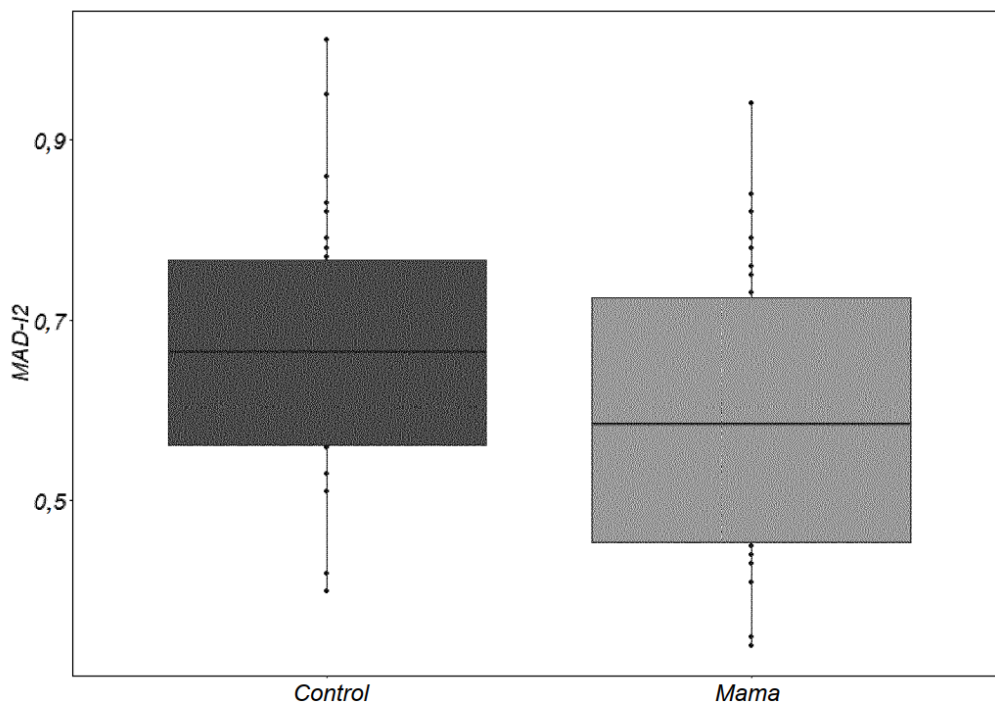


FIG. 24B