



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 325 431**

(21) Número de solicitud: **200502511**

(51) Int. Cl.:

**C12N 9/12** (2006.01)

**C12N 9/88** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

(12)

## PATENTE DE INVENCION

B1

(22) Fecha de presentación: **14.10.2005**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2009**

Fecha de la concesión: **14.06.2010**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **28.06.2010**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**28.06.2010**

(73) Titular/es:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
c/ Serrano, 117  
28006 Madrid, ES  
Universidad Autónoma de Madrid y  
Universidad Politécnica de Valencia**

(72) Inventor/es: **Perona Abellón, Rosario;  
Machado Pinilla, Rosario;  
Sastre Garzón, Leandro;  
Sánchez Pérez, Isabel y  
Murguía Ibáñez, José Ramón**

(74) Agente: **Pons Ariño, Ángel**

(54) Título: **Secuencia de nucleótidos y péptidos GSE 24.2 de la disquerina inductores de la actividad telomerasa, procedimiento de obtención, composiciones terapéuticas y sus aplicaciones.**

(57) Resumen:

Secuencia de nucleótidos y péptidos GSE 24.2 de la disquerina inductores de la actividad telomerasa, procedimiento de obtención, composiciones terapéuticas y sus aplicaciones.

La presente invención describe un compuesto inductor o activador de la actividad telomerasa basado en la secuencia de nucleótidos del fragmento GSE 24.2 de la disquerina o la secuencia proteínica o peptídica codificado por dicha secuencia de nucleótidos. Igualmente forman parte vectores que comprenden dicha secuencia y células transformadas con la misma, y composiciones farmacéuticas que contienen todos estos elementos. Estas composiciones pueden ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades del siguiente grupo: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y disqueratosis congénita.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Secuencia de nucleótidos y péptidos GSE 24.2 de la disquerina inductores de la actividad telomerasa, procedimiento de obtención, composiciones terapéuticas y sus aplicaciones.

**5 Sector de la técnica**

Sector biotecnológico con aplicaciones en salud humana, y más concretamente compuestos biológicos - secuencias de nucleótidos, péptidos y células humanas transformadas - con aplicaciones terapéuticas para los seres humanos.

**10 Estado de la técnica**

La disquerina (Figura 1) es una proteína nucleolar de 58 Kd que se asocia con la caja H/ACA en los SnoRNAs, presentes en las pequeñas partículas de ribonucleoproteínas que se encargan de pseudouridinizar el ARN ribosómico. Por otra parte, también es un componente del complejo de la telomerasa, la cual es responsable del mantenimiento de las repeticiones teloméricas en los finales cromosómicos. La disqueratosis congénita ligada al cromosoma X (Marrone *et al.*, 2003; Besseler *et al.*, 2004), es un síndrome congénito que provoca fallo de la medula ósea y está asociado con una mayor susceptibilidad al cáncer. Esta forma de disqueratosis está causada por una mutación puntual del gen DKC1 el cual codifica para la disquerina. Hay otra forma de disqueratosis congénita autosómica dominante, en este caso, esta enfermedad está asociada con mutaciones en el ARN componente de la telomerasa (hTR) (Heiss *et al.*, 1998). En los fibroblastos y linfoblastos derivados de los enfermos de disqueratosis congénita, la actividad telomerasa es menor y los telómeros son más cortos que los de células no afectadas por la enfermedad (Siriniavin *et al.*, 1975; Trowbridge *et al.*, 1977). En células de pacientes de Disqueratosis congénita ligada al cromosoma X se ha superado experimentalmente los defectos en la telomerasa expresando hTERT de forma ectópica (Mitchell *et al.*, 1999). En la disqueratosis congénita provocada por mutaciones en hTR la única forma de recuperar la actividad telomerasa es reexpresando hTR (Fu *et al.*, 2003).

Los telómeros están compuestos por 500-2000 repeticiones de la secuencia conservada TTAGGG en el final 3' de los cromosomas y su acortamiento con sucesivas divisiones se convierte en una limitación para la capacidad proliferativa de la célula. Los telómeros son susceptibles de sufrir daño al ADN provocado por agentes exógenos, incluido el cisplatino. Esta descrito que el cisplatino es capaz de inhibir la actividad telomerasa en distintas líneas celulares (Ishibashi *et al.*, 1998; Burger *et al.*, 1997). Hay varias hipótesis acerca de como se puede producir esta inhibición. Una posibilidad es la formación de aductos G-Pt-G, típicos del cisplatino, en la secuencia repetida de los telómeros TTAGGG. Alternativamente, interacciones del cisplatino con grupos sulfidrilos esenciales para la subunidad catalítica transcriptasa reversa (hTERT) e incluso podría deberse a la disminución de la expresión de hTERT (Burger *et al.*, 1997).

**Descripción**

**40 Descripción breve**

Un objeto de la presente invención lo constituye un compuesto inductor o activador de la actividad telomerasa, en adelante compuesto activador de la presente invención, basado en la secuencia de nucleótidos del fragmento GSE 24.2 de la disquerina o la secuencia proteínica o peptídica codificado por dicha secuencia de nucleótidos que es capaz de recuperar la actividad telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humanas.

Un objeto particular de la invención lo constituye una secuencia de nucleótidos, en adelante secuencia génica GSE 24.2 de la presente invención, que permite la expresión de una proteína o péptido inductor de la recuperación de la actividad telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humanas, y que está constituida por una o varias secuencias de nucleótidos GSE 24.2 pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de nucleótidos constituida por una secuencia de nucleótidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO1),
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a),
- c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- d) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

Tal como se utiliza en la presente invención el término "secuencia de nucleótidos" se refiere a una secuencia de DNA, cDNA o mRNA.

Una realización particular de la presente invención lo constituye la secuencia de nucleótidos de la secuencia GSE 24.2 de a) constituida por la SEQ ID NO1.

# ES 2 325 431 B1

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la secuencia de nucleótidos de la secuencia GSE 24.2 de b) constituida por la SEQ ID NO11 ó la SEQ ID NO13, que codifican los dominios peptídicos Trub I y Trub II, respectivamente (Ejemplo 1.7).

5 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una construcción genética GSE 24.2 que comprende la secuencia de nucleótidos GSE 24.2.

10 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye un vector de expresión GSE 24.2 que comprende una secuencia de nucleótidos GSE 24.2 o una construcción genética GSE 24.2, descritas en la presente invención, y que permite la expresión de una proteína o péptido capaz de recuperar la actividad telomerasa en el interior de células de mamíferos, preferentemente humanos. Un ejemplo de una realización particular lo constituye el vector expresión de la invención pLNCX 24.2 (ver ejemplo 1 y 2).

15 Además, otro objeto particular de la invención lo constituye una proteína o péptido, en adelante proteína GSE 24.2 de la presente invención, que presenta actividad recuperadora de telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humanas, y que comprende una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- 20 a) una secuencia de aminoácidos constituida por una secuencia de aminoácidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO2),
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),
- c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

25 Otra realización particular de la presente invención lo constituye una proteína cuya secuencia de aminoácidos de a) está constituida por la SEQ ID NO2.

30 Otra realización particular de la presente invención lo constituye una proteína cuya secuencia de aminoácidos de c), fragmento de está constituida por la SEQ ID NO12 ó la SEQ ID NO14.

35 Por otro lado, otro objeto adicional de la presente invención lo constituyen células, ya sean eucariotas - preferentemente humanas - o procariotas, en adelante células GSE 24.2 de la invención, modificadas genéticamente y que comprenden la secuencia de nucleótidos, la construcción y el vector de expresión GSE 24.2 de la invención y en donde puede expresarse de forma adecuada el péptido o proteína GSE 24.2 de la invención.

40 Por lo tanto, otro objeto de la invención lo constituye el uso del compuesto activador GSE 24.2 de la presente invención en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad causada por una alteración, preferentemente una reducción, de la actividad telomerasa, perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y disqueratosis congénita.

45 Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías que cursan con alteraciones de la actividad telomerasa, preferentemente una reducción de la actividad, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un compuesto ó agente capaz de recuperar la actividad telomerasa, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables y que es capaz de estimular la generación y mantenimiento de la actividad telomerasa.

50 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto o agente capaz de recuperar la actividad telomerasa pertenece al siguiente grupo: secuencia, construcción genética o vector GSE 24.2 que permiten la expresión de una proteína o péptido capaz de recuperar la actividad telomerasa en el interior de células de mamífero, preferentemente humanas.

55 Una realización particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto ó agente capaz de recuperar la actividad telomerasa es una o varias secuencias GSE 24.2 pertenecientes al siguiente grupo:

- 60 a) una secuencia de nucleótidos constituida por una secuencia de nucleótidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO1),
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a),
- c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- d) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

65 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en

la que la secuencia de nucleótidos de a) es la secuencia de nucleótidos GSE 24.2 (SEQ ID NO1).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos de c) es la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO11 o la SEQ ID NO 13.

5 Otra realización particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos es un vector, preferentemente el vector pLNCX 24.2.

10 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto o agente capaz de recuperar la actividad telomerasa es una proteína o un péptido codificado por la secuencia, construcción genética o vector GSE 24.2 de la invención.

15 Una realización particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la proteína o péptido GSE 24.2 pertenece al siguiente grupo:

- 20 a) una secuencia de aminoácidos constituida por una secuencia de aminoácidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO2),  
b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),  
c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y  
d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

25 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos de a) es la secuencia SEQ ID NO2.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos de c) es la secuencia SEQ ID NO12 ó SEQ ID NO14.

30 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto o agente activador de la telomerasa es una célula, preferentemente humana, transformada por la secuencia, construcción o vector GSE 24.2.

35 Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención, en adelante uso de la composición farmacéutica de la invención, en un método de tratamiento o profilaxis de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad, desorden o patología que cursa con alteraciones de la actividad telomerasa consistente en la administración de dicha composición terapéutica en dosis adecuada que permita la recuperación de la actividad telomerasa en el interior de sus células.

40 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o desorden que cursa con alteraciones de la actividad telomerasa que afecta a seres humanos, perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y disqueratosis congénita.

45 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa perteneciente al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelosa y degeneración de médula espinal.

50 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de la disqueratosis congénita ligada al cromosoma X.

55 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de la disqueratosis congénita autosómica dominante.

### Descripción detallada

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades que cursan con alteraciones de la actividad telomerasa, y más concretamente la disqueratosis congénita.

60 La presente invención se basa en que los inventores han demostrado que la expresión de un fragmento de cDNA de la disquerina, el GSE 24.2 (SEQ ID NO1), que se corresponde con una secuencia interna de la disquerina, compensa en células de pacientes con disqueratosis congénita los defectos en la actividad telomerasa (Ejemplo 2). Más concretamente, en las células de pacientes con disqueratosis congénita, al transfectar las mismas con el GSE 24.2 además de recuperar la actividad telomerasa, se produce al mismo tiempo un aumento en los niveles de hTERT y hTR. Efectivamente se observó que la expresión del GSE 24.2 aumentaba la actividad basal del promotor de telomerasa y tras el tratamiento con cisplatino la actividad de las células 24.2 también era mayor. Curiosamente, Collins *et al* habían

# ES 2 325 431 B1

descrito previamente que en células de estos mismos pacientes se recuperaba la actividad telomerasa sólo sobreexpresando el gen hTERT y no así con la expresión de la disquerina, proteína mutada en estos pacientes (Mitchell *et al.*, 1999).

5 En la literatura se ha descrito que mutaciones en la disquerina podrían afectar a la acumulación del ARN de la telomerasa (Mochizuki *et al.*, 2004) luego los efectos provocados por el GSE 24-2 podrían deberse a un aumento en los niveles de hTERT y a una mayor estabilización de hTR, ya que el aumento de los niveles de hTERT podría estabilizar la formación del complejo telomerasa impidiendo la degradación de hTR.

10 Además, este GSE 24.2 confiere capacidad de supervivencia a cisplatino en líneas celulares humanas (Ejemplo 1). La línea celular 24.2 aumenta la viabilidad frente al inhibidor de la telomerasa 1. Este inhibidor tiene un mecanismo de acción similar al cisplatino formando G-quadruplex en los telómeros y disminuyendo la actividad telomerasa (Sun *et al.*, 1997). También se ha descrito la existencia de secuencias que forman G-quadruplex en un intrón de hTERT, y por tanto cabe la posibilidad de que este inhibidor también disminuya los niveles de hTERT disminuyendo así también 15 la actividad telomerasa (Lemateleur *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta que tanto el cisplatino como el inhibidor de la telomerasa estabilizan la formación de G-quadruplex (Redon *et al.*, 2001) los cuales a su vez podría bloquear la actividad telomerasa, el GSE-24-2 podría disminuir la eficacia de estos inhibidores impidiendo o disminuyendo la formación de estos G-quadruplex o quizás 20 simplemente por otro mecanismo, es capaz de aumentar los niveles de hTERT aumentando así la actividad telomerasa.

Los elementos supresores génicos (GSEs) son fragmentos de cDNA biológicamente activos que codifican para péptidos o ARNs antisentidos inhibidores, que actúan de forma dominante sobre la expresión génica en células de mamíferos. El GSE 24.2 es un fragmento de 165 pb que abarca desde el nucleótido 268 al 433 y corresponde a una 25 secuencia formada por dos dominios altamente conservados en distintas especies, denominados TRUB (Figura 2b, ver SEQ ID NO12 y 14, respectivamente). Estos dominios parecen tener una función importante en la pseudouridinilización de los snoRNA (Zucchini *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2003) y, lo que es más sorprendente, secuencias de nucleótidos elaboradas con dichos dominios clonados por separado aumentaban la actividad basal del promotor de telomerasa al igual que la secuencia entera inicialmente descrito de 55 aminoácidos (Ejemplo 1.7, Figura 8c). Es interesante que 30 esta actividad inductora de resistencia a cisplatino y compensadora de los defectos en la actividad telomerasa está únicamente localizada en la región de la disquerina que se encuentra en la secuencia GSE 24.2, ya que la proteína completa (ver SEQ ID 4) o el fragmento aminoterminal, no tienen actividad alguna.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención lo constituye un compuesto inductor o activador de la actividad telomerasa, en adelante compuesto activador de la presente invención, basado en la secuencia de nucleótidos del fragmento GSE 24.2 de la disquerina o la secuencia proteínica o peptídica codificado por dicha secuencia de nucleótidos que es 35 capaz de recuperar la actividad telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humanas.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “compuesto inductor o activador de la telomerasa” se 40 refiere a una molécula que incrementa la intensidad o prolonga la duración de la actividad biológica de la misma. En esta definición se incluye además aquellos compuestos o moléculas que permiten la expresión de una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína GSE 24.2. Un compuesto activador puede estar constituido por un péptido, una proteína o una secuencia de nucleótidos.

45 Así, un objeto particular de la invención lo constituye una secuencia de nucleótidos, en adelante secuencia génica GSE 24.2 de la presente invención, que permite la expresión de una proteína o péptido inductor de la recuperación de la actividad telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humanas, y que está constituida por una o varias secuencias de nucleótidos GSE 24.2 pertenecientes al siguiente grupo:

- 50 e) una secuencia de nucleótidos constituida por una secuencia de nucleótidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO1),  
f) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a),  
g) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y  
55 h) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos 60 que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia mostrada en la presente memoria, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos

65 conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que permita la codificación de un péptido o proteína capaz de mimetizar la actividad de la secuencia GSE 24.2 (SEQ ID NO2) o de fragmentos de los mismos (SEQ ID NO12 y SEQ ID NO14).

La enzima disquerina pertenece a una familia de pseuridina sintasa presente en varios organismos (ver Figura 3B,

# ES 2 325 431 B1

Mitchel *et al*, 1999). A partir de la información descrita en la presente invención y de distintos organismos existentes en la naturaleza un técnico experto en el sector de la técnica puede aislar o construir una secuencia de nucleótidos análoga a las descritas en la presente invención.

5 En general, una secuencia de nucleótidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 30%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

10 Tal como se utiliza en la presente invención el término “secuencia de nucleótidos” se refiere a una secuencia de DNA, cDNA o mRNA.

Una realización particular de la presente invención lo constituye la secuencia de nucleótidos de la secuencia GSE 24.2 de a) constituida por la SEQ ID NO1.

15 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la secuencia de nucleótidos de la secuencia GSE 24.2 de b) constituida por la SEQ ID NO11 ó la SEQ ID NO13, que codifican los dominios peptídicos Trub I y Trub II, respectivamente (Ejemplo 1.7).

20 La secuencia de nucleótidos GSE 24.2 identificada como d) se corresponde con una construcción génica GSE 24.2. Esta construcción génica GSE 24.2 de la invención, también puede comprender, en caso necesario y para permitir un mejor aislamiento, detección o secreción al citoplasma del péptido expresado, a una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento, detección o secreción de dicho péptido. Por tanto, otro objeto particular de la presente invención lo constituye una construcción genética GSE 24.2 que 25 comprende, además de la secuencia de nucleótidos GSE 24.2, cualquier otra secuencia de nucleótidos codificante de un péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento, la detección o la secreción al citoplasma celular del péptido expresado, por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, una secuencia de polihistidina (6xHis), una secuencia peptídica reconocible por un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, para su identificación, o cualquier otra que sirva para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafluoridad: péptidos 30 etiqueta tales como c-myc, HA, E-tag) (Using antibodies: a laboratory manual. Ed. Harlow and David Lane (1999). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Capítulo: Tagging proteins. Pp. 347-377).

La secuencia de nucleótidos GSE 24.2 y la construcción genética GSE 24.2 descritas previamente pueden obtenerse por un experto mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook *et al.* 35 “Molecular cloning, a Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 vol 1-3). Dichas secuencias de nucleótidos pueden estar integradas en un vector de expresión génica que permite la regulación de la expresión de la misma en condiciones adecuadas en el interior de las células.

Por tanto, otro objeto particular de la presente invención lo constituye un vector de expresión GSE 24.2 que 40 comprende una secuencia de nucleótidos GSE 24.2 o una construcción genética GSE 24.2, descritas en la presente invención, y que permite la expresión de una proteína o péptido capaz de recuperar la actividad telomerasa en el interior de células de mamíferos, preferentemente humanos. Un ejemplo de una realización particular lo constituye el vector expresión de la invención pLNCX 24.2 (ver ejemplo 1 y 2).

45 En general, un vector de expresión comprende, además de la secuencia de nucleótidos GSE 24.2 ó de la construcción genética 24.2. descritos en la invención, un promotor que dirige su transcripción (por ejemplo, *pT7*, *plac*, *ptrc*, *ptac*, *PBAD*, *ret*, etc.), al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan dicha transcripción y, en su caso, la traducción del producto de interés, por ejemplo, señales de inicio y terminación de transcripción (*tlt2*, etc.), señal de poliadenilación, origen de replicación, secuencias de unión a ribosomas (RBS), secuencias codificantes de reguladores transcripcionales, (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), represores, etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos de expresión, vectores virales (DNA o RNA), cós-midos, cromosomas artificiales, etc. que pueden contener, además, marcadores utilizables para seleccionar las células transfectadas o transformadas con el gen o genes de interés. La elección del vector dependerá de la célula huésped y 50 del tipo de uso que se quiera realizar. Por tanto, según un modo de realización particular de la presente invención dicho vector es un plásmido o un vector viral. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia al igual que para la transformación de microorganismos y células eucariotas se pueden utilizar diferentes métodos ampliamente conocidas - transformación química, electroporación, microinyección, etc. - descritos en diversos manuales [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.].

Además, otro objeto particular de la invención lo constituye una proteína o péptido, en adelante proteína GSE 24.2 de la presente invención, que presenta actividad recuperadora de telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humanas, y que comprende una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al 65 siguiente grupo:

# ES 2 325 431 B1

- e) una secuencia de aminoácidos constituida por una secuencia de aminoácidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO2),
- f) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),
- 5 g) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- h) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de aminoácidos que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia mostrada en la presente memoria, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más aminoácidos, la adición de uno o más aminoácidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más aminoácidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que mimetize la actividad recuperadora de telomerasa de la SEQ ID NO2.

La enzima disquerina pertenece a una familia de pseuridina sintasa presente en varios organismos (ver Figura 3B, Mitchel *et al*, 1999). A partir de la información descrita en la presente invención y de distintos organismos existentes en la naturaleza un técnico experto en el sector de la técnica puede aislar o construir una secuencia de aminoácidos análoga a las descritas en la presente invención.

En general, una secuencia de aminoácidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de aminoácidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 30%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye una proteína cuya secuencia de aminoácidos de a) está constituida por la SEQ ID NO2.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye una proteína cuya secuencia de aminoácidos de c), fragmento de ésta constituida por la SEQ ID NO12 ó la SEQ ID NO14.

Por otro lado, otro objeto adicional de la presente invención lo constituyen células, ya sean eucariotas - preferentemente humanas - o procariotas, en adelante células GSE 24.2 de la invención, modificadas genéticamente y que comprenden la secuencia de nucleótidos, la construcción y el vector de expresión GSE 24.2 de la invención y en donde puede expresarse de forma adecuada el péptido o proteína GSE 24.2 de la invención. Estas células pueden ser transformadas, infectadas o transfectadas mediante dichas secuencias de nucleótidos por técnicas de ingeniería genética conocidas por un experto en la materia. [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención. Estas células pueden ser útiles para la producción de los péptidos con actividad recuperadora de la actividad telomerasa que pueden ser la base de una composición farmacéutica, para la amplificación recombinante de dichas secuencias de nucleótidos o pueden ser útiles *per se* como células en terapia génica, etc. Una realización particular sería una célula humana transformada mediante estas secuencias de nucleótidos GSE 24.2, de distintas estíples celulares, que puede utilizarse como células regeneradoras de tejidos humanos.

Los sistemas de expresión génica pueden permitir o no la integración del nuevo material genético en el genoma de la célula huésped. De esta forma, tanto la secuencia de nucleótidos, construcción génica o el vector de expresión GSE 24.2 pueden utilizarse como un medicamento para proteger células huésped, preferentemente células humanas afectadas de una alteración en la actividad telomerasa, en un procedimiento de tratamiento y profilaxis de terapia génica de un ser humano afectado por una enfermedad que cursa con alteraciones de la actividad telomerasa. De igual forma las células GSE 24.2 de la invención pueden utilizarse como un medicamento para la regeneración o implante de tejidos o células en seres humanos. Las herramientas biofarmacéuticas y los procedimientos de terapia génica son suficientemente conocidas por un experto del sector de la técnica de tal forma que con la información descrita en la presente invención pueden desarrollarse sin excesivo esfuerzo. Además, las proteínas o péptidos y las propias células pueden convertirse en biofármacos.

Por lo tanto, otro objeto de la invención lo constituye el uso del compuesto activador GSE 24.2 de la presente invención en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad causada por una alteración, preferentemente una reducción, de la actividad telomerasa, perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y disqueratosis congénita.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “enfermedad neurodegenerativa” se refiere una enfermedad perteneciente, entre otras a título ilustrativo, al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelosa y degeneración de médula espinal.

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías que cursan con alteraciones de la actividad telomerasa, preferentemente una reducción de la actividad, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un

# ES 2 325 431 B1

compuesto ó agente capaz de recuperar la actividad telomerasa, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables y que es capaz de estimular la generación y mantenimiento de la actividad telomerasa.

5 Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

10 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de recuperar la actividad telomerasa, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

15 En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos 20 y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

25 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto o agente capaz de recuperar la actividad telomerasa pertenece al siguiente grupo: secuencia, construcción genética o vector GSE 24.2 que permiten la expresión de una proteína o péptido capaz de recuperar la actividad telomerasa en el interior de células de mamífero, preferentemente humanas.

30 Una realización particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto ó agente capaz de recuperar la actividad telomerasa es una o varias secuencias GSE 24.2 pertenecientes al siguiente grupo:

- e) una secuencia de nucleótidos constituida por una secuencia de nucleótidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO1),
- f) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a),
- 35 g) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- h) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

40 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos de a) es la secuencia de nucleótidos GSE 24.2 (SEQ ID NO1).

45 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos de c) es la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO11 o la SEQ ID NO 13.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos es un vector, preferentemente el vector pLNCX 24.2.

50 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto o agente capaz de recuperar la actividad telomerasa es una proteína o un péptido codificado por la secuencia, construcción genética o vector GSE 24.2 de la invención.

Una realización particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la 55 proteína o péptido GSE 24.2 pertenece al siguiente grupo:

- e) una secuencia de aminoácidos constituida por una secuencia de aminoácidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO2),
- f) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),
- 60 g) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- h) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos de a) es la secuencia SEQ ID NO2.

5 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos de c) es la secuencia SEQ ID NO12 ó SEQ ID NO14.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto o agente activador de la telomerasa es una célula, preferentemente humana, transformada por la secuencia, construcción o vector GSE 24.2.

10 Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención, en adelante uso de la composición farmacéutica de la invención, en un método de tratamiento o profilaxis de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad, desorden o patología que cursa con alteraciones de la actividad telomerasa consistente en la administración de dicha composición terapéutica en dosis adecuada que permita la recuperación de la actividad telomerasa en el interior de sus células.

La composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse en un método de tratamiento de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos.

20 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o desorden que cursa con alteraciones de la actividad telomerasa que afecta a seres humanos, perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y disqueratosis congénita.

25 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa perteneciente al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelosa y degeneración de médula espinal.

30 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de la disqueratosis congénita ligada al cromosoma X.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de la disqueratosis congénita autosómica dominante.

35

## Referencias bibliográficas

40 **Bednarek A, Shilkaitis A, Green A, Lubet R., Kelloff G, Christov K and Aldaz M.** 1999. Suppression of cell proliferation and telomerase activity in 4-(hydroxyphenyl) retinamide-treated mammary tumors. *Carcinogenesis*. 20 (5): 879-

**Bessler M, Wilson DB, Mason PJ.** 2004. Dyskeratosis congenita and telomerase. *Curr Opin Pediatr*. Feb;16(1):23-8. Review.

45 **Burger A.M J.A. Double' and D.R. Newell'** 1997. Inhibition of Telomerase Activity by Cisplatin in Human Testicular Cancer Cells. *Eur J Cancer*. 33(4): 638-44.

50 **Cheng H, Wu Z, Zheng J, Lu G, Yan J, Liu M, Huang D, Lin J.** 2003. Inhibition on telomerase activity and cytotoxic effects by cisplatin in cultured human choroidal melanoma cells. *Yan Ke Xue Bao*. 19(1): 54-9.

**Fu D, Collins K.** 2003 Distinct biogenesis pathways for human telomerase RNA and H/ACA small nucleolar RNAs *Mol Cell*. 11(5): 1361-72.

55 **Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauck SM, Wiemann S, Mason PJ, Poustka A, Dokal I.** 1998. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet*. 19(1): 32-8.

60 **Ishibashi T, Lippard SJ.** 1998. Telomere loss in cells treated with cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14; 95(8): 4219-23.

**Jun Hyun KIM, Joo Hee KIM, Gun Eui Lee, Sang Woong KIM and In Kwon CHUNG.** 2003. Identification of a quinoxaline derivative that is a potent telomerase inhibitor leading to cellular senescence of human cancer cells. *Biochem J*. 15; 373(Pt 2): 523-9.

65 **Lemarteleur T, Gomez D, Paterski R, Mandine E, Mailliet P, Riou JF.** 2004. Stabilization of the c-myc gene promoter quadruplex by specific ligands' inhibitors of telomerase. *Biochem Biophys Res Commun*. 22; 323(3): 802-8.

# ES 2 325 431 B1

**Marrone A, Mason PJ.** 2003. Dyskeratosis congenita. *Cell Mol Life Sci* 60(3): 507-17. Review.

**Mese H, Ueyama Y, Suzuki A, Nakayama S, Sasaki A, Hamakawa H, Matsumura T.** 2001. Inhibition of telomerase activity as a measure of tumor cell killing by cisplatin in squamous cell carcinoma cell line. *Cancer Chemotherapy*. 5 47(2): 136-42.

**Mitchell JR, Wood E, Collins K.** 1999 A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*. Dec 2; 402(6761): 551-5.

10 **Mochizuki Y, He J, Kulkarni S, Bessler M, Mason PJ.** 2004. Mouse dyskerin mutations affect accumulation of telomerase RNA and small nucleolar RNA, telomerase activity, and ribosomal RNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20; 101(29): 10756-61.

15 **Oh S, Song YH, Kim UJ, Yim J, Kim TK.** 1999. *In vivo* and *in vitro* analyses of Myc for differential promoter activities of the human telomerase (hTERT) gene in normal and tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 263 (2):361-5.

20 **Pan H, Agarwalla S, Moustakas DT, Finer-Moore J, Stroud RM.** 2003. Structure of tRNA pseudouridine synthase TruB and its RNA complex: RNA recognition through a combination of rigid docking and induced fit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28;100(22):12648-53.

**Poole JC, Andrews LG, Tollefson TO.** 2001. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene*. 16;269(1-2): 1-12. Review.

25 **Redon S, Bombard S, Elizondo-Riojas MA, Chottard JC.** 2001 Platination of the (T2G4)4 telomeric sequence: a structural and cross-linking study. *Biochemistry*. 24; 40(29): 8463-70.

30 **Roninson IB, Gudkov AV, Holzmayer TA, Kirschling DJ, Kazarov AR, Zelnick CR, Mazo IA, Axenovich S, Thimmapaya R.** 1995 Genetic suppressor elements: new tools for molecular oncology. *Cancer Res*. 15; 55(18): 4023-8.

**Sanchez-Perez I, Murguia JR, Perona R.** 1998. Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene*. 29; 16(4): 533-40.

35 **Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH.** 2002. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3;99 (18):11593-8.

40 **Sirinavin, C. & Trowbridge, A.** 1975. Dyskeratosis congenita: clinical features and genetic aspects. *J. Med. Genet.* 12, 339-354.

**Sun D, Thompson B, Cathers BE, Salazar M, Kerwin SM, Trent JO, Jenkins TC, Neidle S, Hurley LH.** 1997. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J Med Chem*. 4; 40(14):2113-6.

45 **Trowbridge, A. A., Sirinavin, C. & Linman, J. W.** 1977 Dyskeratosis congenita: hematologic evaluation of a sibship and review of the literature. *Am. J. Hematol.* 3, 143-152.

**Wright WE, Shay JW, Piatyszek MA.** 1995. Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acids Res*. 25; 23(18): 3794-5.

50 **Zhang RG, Zhang RP, Wang XW, Xie H.** 2002. Effects of cisplatin on telomerase activity and telomere length in BEL-7404 human hepatoma cells. *Cell Res*. 12(1): 55-62.

55 **Zucchini C, Strippoli P, Biolchi A, Solmi R, Lenzi L, D'Addabbo P, Carinci P, Valvassori L.** 2003. The human TruB family of pseudouridine synthase genes, including the Dyskeratosis Congenita 1 gene and the novel member TRUB1. *Int J Mol Med*. 11(6): 697-704.

## Descripción de las figuras

60 Figura 1

*Estructura esquemática del complejo telomerasa*

65 Las proteínas hTERT, disquerina, p23, hsp90 y TEP1 junto con el ARN hTR constituyen el complejo ribonucleoproteico de la telomerasa.

# ES 2 325 431 B1

Figura 2

*Viabilidad celular y activación de las vías de muerte JNK y p38 en las líneas celulares 293T: pLNCX y 24.2, tratadas con cisplatino*

- 5 A) *Viabilidad celular.* Tras sembrar las células 293T: expresando el vector vacío (pLNCX) y el GSE 24.2 {24.2} en placas de 24 pocillos, se incubaron con concentraciones entre 0-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cisplatino. La viabilidad celular se midió mediante la técnica del cristal violeta, tras 72 horas de exposición al fármaco. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuatriplicado. B) *Cinética de activación.* Tratamiento de ambas líneas celulares a las concentraciones de cisplatino indicadas en la figura durante 6 horas. Posteriormente, se estudió la activación de JNK y p38 mediante el uso de anticuerpos que reconocen específicamente las formas activas. Como control de carga se detectaron los niveles de JNK-I.
- 10 10

Figura 3

15 *Esquema de las secuencias de la DSK contenidas en las construcciones utilizadas y secuencia de genes homólogos a la DSK*

- A) Esquema del cDNA de la disquerina donde se muestra a que región corresponde el GSE 24.2 que abarca del 20 nucleótido 268 al 433; también se muestra la localización de la construcción DSK 5'. B) Secuencia comparativa en aminoácidos del GSE 24.2 con secuencias de pseudouridina sintetasas de otros organismos. Se indican los dominios conservados TRUB I y TRUB II.

Figura 4

25 *Viabilidad de las líneas celulares 293T: pLNCX, 24.2, DSK5' y DSK tratadas con cisplatino*

- Se han utilizado las líneas celulares anteriormente descritas (pLNCX y 24.2), la línea celular DSK 5' que expresa un fragmento de la disquerina descrito en la figura anterior y una cuarta que sobreexpresa el cDNA completo de 30 la disquerina (DSK). La viabilidad se determinó como indica la figura 1 A. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuatriplicado.

Figura 5

- 35 *Actividad telomerasa de las líneas celulares 293T: pLNCX y 24.2 tras el tratamiento con cisplatino*

Las células fueron sembradas en placas de 60 mm, pretratadas con 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cisplatino durante 3 días y posteriormente fueron tratadas con cisplatino a la dosis de 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (células sin pretratar). La actividad telomerasa fue medida mediante el ensayo TRAPeze de Intergen. El experimento se realizó 3 veces con resultados similares.

40 Figura 6

*Viabilidad celular y actividad telomerasa de las líneas celulares 293T: pLNCX y 24.2 tratadas con el Inhibidor de la telomerasa I*

- 45 A) *Viabilidad celular.* Tras sembrar las células 293T: pLNCX y 24.2 en placas de 24 pocillos fueron incubadas con concentraciones entre 0-20  $\mu\text{M}$  de Inhibidor de la Telomerasa I. La viabilidad celular se midió mediante la técnica del cristal violeta tras 72 horas de exposición a la droga. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuatriplicado. B) *Actividad telomerasa a distintas dosis del Inhibidor de la Telomerasa I.* Actividad telomerasa de las células 293T: 24.2 y pLNCX en presencia de distintas concentraciones de inhibidor de la telomerasa I (5-7  $\mu\text{M}$ ) durante 3 días. Las células fueron sembradas en placas de 60 mm y posteriormente fueron tratadas a las concentraciones y tiempos indicados. La actividad telomerasa fue medida mediante el ensayo TRAPeze de Intergen. C) *Actividad telomerasa a distintos tiempos de tratamiento con el Inhibidor de la Telomerasa I.* Actividad telomerasa en presencia de TII (5  $\mu\text{M}$ ) a 1 y 5 días. Las células fueron sembradas como en B. Posteriormente fueron tratadas con 5  $\mu\text{M}$  del Inhibidor a los tiempos indicados.

Figura 7

- 60 *Niveles de expresión de distintos genes relacionados con la telomerasa en células 293T: pLNCX y 24.2 tras el tratamiento con cisplatino*

Se sembraron las células en placas de 60 mm se trataron con 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cDDP tras un pretratamiento de 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cisplatino durante 3 días y posteriormente se recogieron a los tiempos indicados en la figura (3 y 7 Días). Tras la extracción de ARN se realizó la RT-PCR con oligos específicos para hTERT, hTR y disquerina para estudiar los niveles de expresión de los ARN mensajeros. Como control de ARN de partida se usaron los oligos para la amplificación de la GAPDH.

# ES 2 325 431 B1

Figura 8

*Actividad del promotor de hTERT en las líneas celulares 293T: pLNCX y 24.2 y en células 293T transfectadas de forma transitoria con la construcción pLNCX-24.2 y el plásmido pLNCX vacío*

5 A) Tanto las células pLNCX como las células 24.2 fueron transfectadas transitoriamente con 0,25 µg del vector reportero hTERT-luc. Las células se sembraron en placas de 60 mm 24 horas después de la transfección se lisaron las células y cuantificó la actividad luciferasa de 10 µg de proteína total. Como control de transfección se cotransfectaron las células con un vector reportero, CMV-Renilla. B) Las células 293T fueron transfectadas con el vector pLNCX y el plásmido 24.2 (5 µg) y ambas se cotransfectaron con 0,25 µg de vector reportero hTERT-luc. Tras sembrar las células como en A, se transfectaron con pLNCX y 24-2 y cotransfectaron con del vector reportero hTERT-luc, posteriormente se trataron al igual que en A. Como control de transfección se utilizo el vector reportero CMV-Renilla. Los datos corresponden a la relación unidades relativas de luciferasa con respecto a células no transfectadas. Cada punto representa con ± la desviación estándar obtenida de 3 experimentos independientes. C) Las células 293T fueron transfectadas con las distintas construcciones GSE 24.4, DSK, TRUB I, TRUB II y el plásmido pLNCX vacío (5 µg) y se

10 20 15 cotransfectaron con 0,25 µg de vector reportero hTERT-luc. Las células se sembraron en placas de 60 mm 24 horas después de la transfección se lisaron las células y cuantificó la actividad luciferasa de 10 µg de proteína total. Como control de transfección se cotransfectaron las células con un vector reportero CMV-Renilla. Los datos corresponden a la relación unidades relativas de luciferasa con respecto a células no transfectadas. Cada punto representa con ± la desviación estandar obtenida de 3 experimentos independientes.

Figura 9

25 *Actividad del promotor de hTERT tras el tratamiento con cisplatino*

30 35 A) Tanto la línea celular pLNCX como la línea celular 24.2 fueron transfectadas transitoriamente con 0,25 µg del vector reportero hTERT-luc. 24 horas después de la transfección se trataron con 3 µg/ml de cisplatino durante 8 horas. Las células se sembraron en placas de 60 mm 24 horas después de la transfección y tras el tratamiento con cDDP se lisaron las células y cuantificó la actividad luciferasa de 10 µg de proteína total. Como control de transfección se cotransfectaron las células con un vector reportero CMV-Renilla. B) Células 293T que transfectadas con el pLNCX y el 24.2 de forma transitoria fueron cotransfectadas con 0,25 µg de vector reportero hTERT-luc y tratadas igual que en A. Tras sembrar las células como en A, se transfectaron con pLNCX y 24-2 y cotransfectaron con del vector reportero hTERT-luc, posteriormente se trataron al igual que en A. Como control de transfección se utilizo el vector reportero CMV-Renilla. Los datos corresponden a la relación unidades relativas de luciferasa con respecto a células no transfectadas. Cada punto representa con ± la desviación estándar obtenida de 3 experimentos independientes.

Figura 10

40 *Actividad telomerasa y niveles de expresión de hTERT y hTR en células de pacientes de disqueratosis congénita transfectados de forma transitoria con el plásmido 24.2 o con el vector vacío pLNCX*

45 A) Actividad telomerasa medida por ensayo TRAP en células de pacientes con disqueratosis congénita (DC-1, DC-2 y DC-3) y en la madre portadora (DC-C) tras la electroporación de 45 µg del plásmido pLNCX vacío (-) o el vector pLNCX 24.2 (+) por 15 millones de células. B) RT-PCR a partir de ARN de células de uno de los pacientes de Disqueratosis congénita, DC3 transfectadas con el vector vacío y DC3 transfectadas con el plásmido 24.2 utilizando oligos específicos de hTERT y hTR. Como control de ARN de partida se usaron los oligos para la amplificación de la GAPDH.

50

## Ejemplos de realización

### Ejemplo 1

55 *Identificación y actividad biológica de la secuencia GSE 24.2*

#### 1.1 Identificación de la secuencia GSE denominada 24.2

60 La resistencia a quimioterapia es una de las mayores limitaciones en el tratamiento del cáncer. Con el fin de estudiar los mecanismos de resistencia a cisplatino se aislaron secuencias de una librería de cADN que conferían resistencia a cisplatino por medio de un rastreo de elementos supresores génicos. Esta metodología descrita previamente (Roninson *et al.*, 1995) consiste en la expresión de construcciones de cADN de una librería de placenta humana, normalizada para igualar la abundancia en expresión de genes. Se aislaron cerca de 100 clones diferentes que conferían resistencia a cisplatino. Tras amplificar los insertos de cDNA, se subclonaron en el plásmido pLNCX y se transfectaron de nuevo para asegurarnos de que conferían resistencia. Uno de estos GSEs era un fragmento de 165 pb denominado 24.2 (ver SEQ ID NO1) que correspondía con una secuencia interna de la disquerina humana.

# ES 2 325 431 B1

## 1.2 Viabilidad de las líneas celulares 293T: pLNCX y 24.2 frente al cisplatino y activación de las vías mediadoras de muerte celular JNK y p38

El plásmido pLNCX24-2 conteniendo el GSE del mismo nombre se transfeció de forma estable en las células 293T y como control se transfeció el vector vacío pLNCX. Tras verificar por PCR, que la línea celular 24.2 contenía este inserto (datos no mostrados) se procedió a estudiar la respuesta a cisplatino realizando una curva de viabilidad con este fármaco. En la figura 2a se muestra la curva de viabilidad de las dos líneas celulares frente a distintas dosis de cisplatino después de 72 horas. En ella se observa como las células que expresan el GSE 24.2 de forma estable presentan una mayor viabilidad frente al cisplatino en relación a las que expresan el vector vacío, especialmente a 5 dosis bajas cercanas a la dosis de selección de los GSEs. JNK y p38 son MAPK activadas en respuesta a agentes genotóxicos (Sánchez-Perez *et al.*, 1998). La cinética de activación de estas dos proteínas en respuesta a cisplatino está relacionada con la capacidad de inducción de la muerte celular, por ello se estudió la activación de estas quinasas en las dos líneas celulares (Figura 2b) y se observó que se requiere una mayor dosis de cisplatino para activar ambas 10 quinasas en aquellas células que expresan de manera estable el GSE 24.2 sugiriendo que la expresión del GSE 24-2 atenúa la señal de daño celular que activa ambas quinasas.

15

## 1.3 Viabilidad de las líneas celulares 293T: pLNCX, DSK (Gene Bank NM 001363.2), DSK-5' y 24.2 frente al cisplatino

Con el fin de estudiar si la sobreexpresión de la disquerina podría reproducir el aumento de la viabilidad celular 20 frente al cisplatino inducido por el GSE 24.2 se generó una línea celular que sobreexpresaba de manera estable el cDNA completo de la disquerina (pLNCX DSK). También se transfeció una construcción conteniendo un fragmento de la disquerina descrito en la Figura 3 a) que incluye la secuencia del GSE 24.2 con el fin de estudiar si el efecto es exclusivo de la región comprendida en el 24.2 o de una región mayor de la disquerina (pLNCX DSK-5'). La Figura 25 4 muestra la curva de viabilidad de las cuatro líneas celulares frente a distintas dosis de cisplatino. En ella se observa como las células que expresan la construcción 24.2 (SEQ ID NO1) de forma estable presentan una mayor viabilidad frente al cisplatino comparada con las que expresan el vector vacío, la disquerina completa (DSK) o el fragmento 5' de la disquerina (SEQ ID NO3). Por lo que podemos decir que el aumento de la viabilidad frente a cisplatino está restringido a la secuencia de cDNA comprendida en el fragmento GSE 24.2.

30

## 1.4 Actividad telomerasa de las líneas celulares pLNCX y 24.2 tratadas con cisplatino

Como ya se ha dicho anteriormente el cisplatino inhibe la actividad telomerasa por un mecanismo aún sin definir. Como el GSE 24.2 se corresponde con una secuencia interna de la disquerina y esta forma parte del complejo ribonucleoproteico de la telomerasa, se estudió el efecto del cisplatino sobre la actividad telomerasa en la línea celular que 35 expresaba el GSE 24.2 y si este efecto variaba con respecto a la línea celular que expresa en vector vacío.

Para ello se realizó un ensayo de actividad telomerasa utilizando el método TRAP con las líneas celulares pLNCX y pLNCX24.2 (Figura 5) pretratándolas durante 3 días con 0.5 µg/ml de cisplatino, tras lo cual se trató con 3 µg/ml de 40 cisplatino durante 3 y 7 días. El tratamiento durante tres días se realizó ya que estaba descrito que un inhibidor específico de telomerasa necesitaba actuar durante este tiempo para una inhibición eficiente del enzima (Kim *et al.*, 2003), (Bednarek *et al.*, 1999), (Gowan *et al.*, 2002). El tratamiento de 7 días en las células 293T pLNCX provocó inhibición de la actividad telomerasa, mientras que para la línea celular 24.2 no se observó inhibición a ese tiempo. (Figura 4). Se 45 puede concluir que la expresión del GSE 24.2 confiere resistencia a la inhibición de la actividad telomerasa provocada por el cisplatino y probablemente esta inhibición sea responsable de la mayor capacidad de supervivencia de estas células al fármaco.

## 1.5 Efecto del inhibidor de la Telomerasa I en células pLNCX y 24.2

El Inhibidor de la Telomerasa I es un compuesto que forma G-quadruplex en los telómeros inhibiendo la actividad telomerasa (Thompson *et al.*, 1997). Se quiso estudiar el efecto del GSE 24.2 frente al inhibidor de la telomerasa I. Para ello se realizó una curva de viabilidad en la que las líneas celulares pLNCX y 24.2 fueron tratadas con concentraciones crecientes de inhibidor de la telomerasa I (0-20 µM) durante 72 horas. En la Figura 6a) se observa como las células 24.2 son más resistentes al inhibidor de la telomerasa I que las parentales. Para comprobar si esta protección iba acompañada de cambios en la sensibilidad en la actividad telomerasa se estudió dicha actividad en las células pLNCX y pLNCX24.2 tratadas con distintas dosis de Inhibidor de la telomerasa I durante 3 días (Figura 6b). Se observa como la inhibición de la actividad telomerasa en la línea celular pLNCX es mayor que en las células pLNCX 24.2. También se estudió la actividad telomerasa tratando las células pLNCX y pLNCX 4.2 con una dosis (5 µM) y en varios 55 tiempos (0-5 días). Figura 6c) en este caso también se demostró que las células pLNCX24.2 necesitan una mayor exposición al inhibidor para que haya disminución de la actividad telomerasa. Por tanto, los efectos observados para la actividad telomerasa y supervivencia celular en ambas líneas celulares son comunes para cisplatino y el inhibidor de la telomerasa I sugiriendo que el fragmento GSE 24.2 podría tener un papel importante en el mantenimiento de la estructura de los telómeros, al menos en parte, ya que es capaz de prevenir la inhibición provocada por el inhibidor I de la telomerasa.

60

65

# ES 2 325 431 B1

## 1.6 Efectos de cisplatino en los niveles de expresión de hTR, hTERT y Disquerina en las líneas celulares pLNCX y 24.2

Una de las explicaciones a la menor sensibilidad de las células pLNCX24.2 a cisplatino podría ser un cambio en los niveles de alguno de los componentes del complejo de telomerasa. Por tanto se estudiaron los niveles de expresión de distintos genes implicados en el complejo de la telomerasa y el efecto que tenía el cisplatino sobre su expresión. Para ello se pretrataron las células pLNCX y pLNCX 24.2 con 0.5 µg/ml y se trataron con 3 µg/ml de cisplatino durante 3 y 7 días. Utilizando oligos específicos para hTR, hTERT y disquerina se estudiaron los niveles de expresión de estos genes y el efecto del cisplatino sobre dicha expresión. Se pudo comprobar que el cisplatino no tiene ningún efecto sobre la expresión de la disquerina y hTR (Figura 7), en cambio se puede observar como tras 3 días de tratamiento hay una disminución en la expresión de hTERT en las células pLNCX; en cambio en las células pLNCX 24.2 no hay disminución de la expresión hasta los 7 días de tratamiento. Por tanto, las células pLNCX 24.2 necesitan una mayor exposición al cisplatino para que se observe inhibición de la expresión de hTERT. Este cambio en la sensibilidad a cisplatino podría explicar al menos parcialmente la diferencia en sensibilidad en los ensayos de actividad telomerasa.

## 1.7 Efecto de la expresión del GSE 24.2 y fragmentos Trub I y Trub II tanto de forma estable como transitoria sobre la actividad del promotor de hTERT

Puesto que se observaron cambios en los niveles de expresión de hTERT en las células que expresaban el GSE 24.2 en respuesta a cisplatino se decidió estudiar si la expresión de la secuencia GSE 24.2 y secuencias de fragmentos del mismo - que contienen el dominio Trub I (SEQ ID NO11) y Trub II (SEQ ID NO 13) - tenían algún efecto sobre la actividad del promotor de hTERT. Para ello se transfeció el vector reportero hTERT-luc que contiene una secuencia de 3402 pb (Song *et al.*, 1999) del promotor de hTERT humano en las líneas celulares: pLNCX 24.2 y pLNCX. En la Figura 8a) se puede observar como en la línea celular pLNCX 24.2 la actividad del promotor de hTERT es mayor que en las células que expresan el vector vacío (pLNCX). Se llevó a cabo el mismo experimento expresando el GSE 24.2 de forma transitoria en las células 293T (Figura 8b) y se pudo observar como la expresión del GSE 24.2 de forma transitoria también aumenta la actividad del promotor de hTERT en relación a las células transfectadas con el vector vacío. Por otro lado, este experimento se llevó a cabo con dos fragmentos del GSE 24.2 que contienen cada uno de los dominios Trub I (SEQ ID NO11) y Trub II (SEQ ID NO13), respectivamente, con el objeto de identificar la secuencia menor con actividad similar a la del fragmento GSE 24.2 (Figura 8c). Los resultados muestran que la secuencia contenida en el GSE 24.2, las secuencias con dominios TruB actúan activando la expresión del promotor de hTERT.

## 1.8 Efecto de la expresión del GSE 24.2 sobre el promotor de hTERT en células tratadas con cisplatino

Tras observar que la expresión del GSE 24.2 retrasaba la inhibición de la expresión de hTERT inducida por el cisplatino se estudió si el tratamiento con cisplatino tenía algún efecto sobre el promotor de dicho gen y si la expresión del GSE 24.2 influiría sobre éste. Para ello, se transfecionaron las células pLNCX y pLNCX 24.2 con el vector reportero hTERT-luc. 24 horas después de la transfección se trataron con 3 µg/ml de cisplatino durante 8 horas y se ensayó la actividad telomerasa (Figura 9a). Se puede observar como en las células pLNCX 24.2 hay una inducción de 4 veces sobre la actividad del promotor de las células pLNCX tras el tratamiento con cisplatino. Se realizó el mismo experimento expresando el GSE 24.2 de forma transitoria y comparándolas con las células 293T transfectadas con el vector pLNCX vacío. En este caso la actividad de las células que expresaban el GSE 24.2, era mayor que la basal tras el tratamiento con cisplatino.

## Ejemplo 2

### Expresión del GSE 24.2 en células de pacientes de disqueratosis congénita ligada al cromosoma X

Puesto que en la disqueratosis congénita ligada al cromosoma X hay defectos en la actividad telomerasa se probó el efecto de la expresión de este GSE 24.2 en células de pacientes con disqueratosis congénita. Para ello, se transfeció el GSE 24.2 en células de pacientes de disqueratosis congénita (DC-1, DC-2, DC-3) y células de la madre portadora (DC-C). 24 horas después de la transfección se midió la actividad telomerasa y se observó que tanto en las células de la madre portadora como en la de los pacientes de disqueratosis congénita un aumento de la actividad telomerasa al expresar el fragmento GSE 24.2 (Figura 10a). Se investigó si este aumento en la actividad era consecuencia de un aumento en la expresión de alguno de los componentes del complejo telomerasa, hTERT y hTR. Para ello se hizo un ensayo de RT-PCR 24 horas después de la transfección utilizando oligos específicos de hTER h y hTR. (Figura 10b) y en ambos casos se observa un aumento en los niveles de expresión tras la expresión del GSE 24.2.

## 60 Materiales y métodos

**Construcciones y líneas celulares.** Las líneas celulares de pacientes de Disqueratosis congénita ligada al cromosoma X se obtuvieron del Coriell Cell Repository. La familia DKC fue descrita clínicamente (Sirinavin *et al.*, 1975; Trowbridge *et al.*, 1977) y los individuos afectados presentan sustitución de un aminoácido T66A (datos no mostrados) (DC-1, DC-2, DC-3). La línea celular de la madre portadora (DC-C) expresa un ARN mensajero sin mutación (datos no mostrados). Estas células se crecieron en RPMI (Gibco) suplementado con 20% de suero fetal bovino (Gibco) y 2 mM de Glutamina.

# ES 2 325 431 B1

La construcción DSK contiene el cDNA completo de la disquerina humana y la construcción DSK 5' (SEQ ID N05) contiene los primeros 500 nucleótidos de la disquerina humana. Ambas construcciones al igual que el GSE 24.2 (SEQ ID NO1) se clonaron en el sitio ClaI del plásmido pLNCX (BD Biosciences Clontech).

5 Las células derivadas de pacientes con DC y su respectivo control fueron transfectadas de forma transitoria mediante electroporación utilizando 3 µg de la construcción pLNCX o pLNCX 24.2 por millón de células.

10 La línea celular 293T se obtuvo del American Type Culture Collection y las células se crecieron en DMEM (Medio de Cultivo Eagle modificado por Dulbecco) (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 2 mM de Glutamina. Esta línea celular se transfeció de forma estable utilizando el método de cloruro cálcico, 10 µg de plásmido por millón de células. Estas células se cotransfectoron con pBABEpur 1 µg de vector por millón de células. 24 horas después de la transfección las células fueron tratadas con puromicina para seleccionar clones estables. Se confirmó que las células expresaban el fragmento GSE 24.2, de forma estable mediante PCR del ADN genómico (Datos no mostrados).

15 15 La construcción hTERT-luc fue clonada en el plásmido pGL3 basic (Promega) y ha sido cedida por Tae Kook Kim (Kim *et al.*, 1999).

20 20 **Fármacos.** Tanto el cisplatino como el Inhibidor de la Telomerasa I se obtuvieron de Calbiochem y se usaron a las dosis indicadas en cada figura.

25 *Ensayo de actividad telomerasa basado en el método TRAP* (Wright *et al.*, 1995). La actividad telomerasa se midió usando el kit de detección de telomerasa TRAPeze (Intergen) de acuerdo al manual de instrucciones. Se cuantificó la concentración de proteína de cada extracto mediante el método Bradford usando el reactivo de BIORAD y tras realizar una PCR según las instrucciones del manual, con los productos de reacción se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes y tras ello se tiñó durante 30 minutos con bromuro de Etidio.

30 30 *Extracción de proteína total.* Las células se lisaron después de lavarlas con PBS para eliminar restos de medio. El buffer de lisis se preparó de acuerdo con protocolos estándar y se añadieron los inhibidores de proteínas: ABSF, ortovanadato, Leupeptina, pepstatina A, aprotinina y DTT (Sigma). Posteriormente los extractos fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. El contenido de proteína total se determinó mediante el método Bradford usando el reactivo de BIORAD.

35 35 *Western Blot y anticuerpos.* 20 µg de proteína se separaron en geles SDS-poliacrilamida, posteriormente se transferieron a membranas de Immobilon-P (Millipore) mediante transferencia en húmedo. Las membranas se bloquearon en una solución de BSA al 5% ó en 5% de leche desnataada en TBS (20 mM Tris-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl) 0,1% Tween-20 (Sigma). Las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-ratón/conejo (Biorad), conjugado directamente con peroxidasa. La detección se realizó mediante el método ECL (Pharmacia) como indica el manual de instrucciones.

40 40 Los anticuerpos utilizados para los ensayos fueron: anti-pJNK (V7391, Promega), anti-JNK1 (C-17, Santa Cruz Biotechnologies), anti p-P38 (C20, Santa Cruz technologies).

45 45 *Expresión de genes mediante RT-PCR.* La extracción del ARN total de las células se realizó usando el reactivo Trizol (Life technologies) siguiendo las instrucciones de fabricante. En cada reacción 2 µg de ARN total fue transcrita a cDNA usando la transcriptasa reversa M-Mlv (Promega).

Los oligos utilizados fueron los siguientes:

50 50 Oligo A: 5'-CGGAAGAGTGCTGGAGCAA-3' (SEQ ID N05) y

Oligo B: 5'- GGATGAAGCGGAGTCGGA -3' (SEQ ID N06) para hTERT;

Oligo C: 5'- TCTAACCTAACTGAGAAGGGCGTAG -3' (SEQ ID N07) y

Oligo D: 5'- GTTGCTCTAGAACGACGGTGGAAAG -3' (SEQ ID N08) para hTR;

Oligo E: 5'- ATGGCGGATGCGGAAGTAATT- 3' (SEQ ID N09) y

65 65 Oligo F: 5'- CCCCTCAATAGCATTGTGC- 3' (SEQ ID N010) para Disquerina

## ES 2 325 431 B1

Las condiciones de PCR para la amplificación de hTERT fueron las siguientes: 94°C, 45s; 60°C, 45s; 72°C, 90s durante 31 ciclos. Las condiciones de PCR para hTR fueron: 94°C, 45 segundos; 55°C, 45 segundos; 72°C, 90 segundos durante 28 ciclos. Las condiciones para la disquerina fueron: 94°C 40 segundos, 60°C 60 segundos, 72°C 120 segundos durante 28 ciclos (Zhang *et al.*, 2002).

5 *Ensayo luciferasa.* La regulación transcripcional de hTERT se midió mediante el gen reportero Luciferasa, precedido de una secuencia de 3402 pb del promotor de hTERT. A las 24 horas de la transfección, las células se lisaron con el tampón comercial Reporter Lysis Buffer (Promega). Los lisados celulares se centrifugaron y con 10 µg de proteína del sobrenadante se cuantificó la expresión de luciferasa usando un luminómetro Berthold. Como control de transfección se usó una construcción del promotor de CMV seguido del gen renilla. La actividad luciferasa expresa por microgramo de proteína y se normaliza con la luminiscencia de la renilla en el mismo extracto.

10 *Curvas de crecimiento.* La viabilidad celular se estudió mediante la técnica del cristal violeta. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se trataron con diferentes concentraciones del fármaco correspondiente, indicadas en las figuras. Tras 72 horas de incubación se fijaron las células con 1% de glutaraldehido, durante 15 minutos y tras ser lavadas con PBS, se tiñeron con 0,1% del colorante cristal violeta. El colorante asociado a las células se desprendió con una solución de ácido acético al 10%. El número de células se determinó estimando la absorbancia a 595 nm. En las figuras se muestra el % de viabilidad con respecto a las células sin tratamiento, representándose la media de 2 experimentos realizados en cuatriplicado con sus desviaciones correspondientes.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, variantes o fragmentos biológicamente activos de la misma.  
5
2. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 1, que consiste en la SEQ ID NO: 1.
3. Secuencia nucleotídica aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la secuencia aminoacídica del fragmento biológicamente activo consiste en la SEQ ID NO: 12.  
10
4. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 3, que consiste en la SEQ ID NO: 11.
5. Secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la secuencia aminoacídica del fragmento biológicamente activo consiste en la SEQ ID NO: 14.  
15
6. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 3, que consiste en la SEQ ID NO: 13.
7. Secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es una secuencia de DNA, cDNA o mRNA.  
20
8. Péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2, variantes o fragmentos biológicamente activos de los mismos.
- 25 9. Péptido según la reivindicación 8, donde la secuencia aminoacídica del fragmento biológicamente activo consiste en la SEQ ID NO: 12.
10. Péptido según la reivindicación 4, donde la secuencia aminoacídica del fragmento biológicamente activo consiste en la SEQ ID NO: 14.  
30
11. Construcción genética que comprende:
  - a. una secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o combinaciones de las mismas, o
  - b. la secuencia nucleotídica de (a) en un vector de expresión unido, operativamente a, al menos, un promotor.  
35
12. Vector de expresión **caracterizado** porque comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o una construcción genética de acuerdo con la reivindicación 11.  
40
13. Vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado** porque el vector de expresión es el plásmido pLNCX 24.2.
- 45 14. Célula procariota genéticamente modificada, **caracterizada** porque comprende una secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, la construcción genética según la reivindicación 11, o el vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 12-13.
15. Célula eucariota no humana genéticamente modificada, **caracterizada** porque comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, la construcción genética según la reivindicación 11, o el vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 12-13.  
50
16. Célula eucariota humana genéticamente modificada, obtenida por métodos que no impliquen la destrucción de embriones humanos, **caracterizada** porque comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, la construcción genética según la reivindicación 11, o el vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 12-13.  
55
17. Uso de:
  - a. una secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-4,
  - b. una construcción genética según la reivindicación 11,
  - c. un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 10-11,
  - d. una célula procariota genéticamente modificada según la reivindicación 14,  
60
- 65

# ES 2 325 431 B1

- e. una célula eucariota no humana genéticamente modificada según la reivindicación 15,  
f. una célula eucariota humana genéticamente modificada según la reivindicación 16,  
5 para la elaboración de un medicamento.

18. Uso de:

- 10 a. una secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-4,  
b. una construcción genética según la reivindicación 11,  
c. un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 10-11,  
15 d. una célula procariota genéticamente modificada según la reivindicación 14,  
e. una célula eucariota no humana genéticamente modificada según la reivindicación 15,  
20 f. una célula eucariota humana genéticamente modificada según la reivindicación 16,

para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, desorden o patología que cursa con alteraciones de la actividad telomerasa.

25 19. Uso según la reivindicación anterior, donde la alteración de la actividad telomerasa es una reducción de su actividad.

30 20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 18-19, donde la enfermedad se selecciona del grupo que comprende: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y disqueratosis congénita.

21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 18-19, donde la enfermedad se selecciona del grupo que comprende: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelosa y degeneración de médula espinal.

35 22. Uso según la reivindicación 20, donde a disqueratosis congénita es la disqueratosis congénita ligada al cromosoma X o la disqueratosis congénita autosómica dominante.

23. Composición que comprende:

- 40 a. una secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-4,  
b. una construcción genética según la reivindicación 11,  
c. un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 10-11,  
45 d. una célula procariota genéticamente modificada según la reivindicación 14,  
e. una célula eucariota no humana genéticamente modificada según la reivindicación 15,  
f. una célula eucariota humana genéticamente modificada según la reivindicación 16,  
50 o cualquiera de sus combinaciones.

55 24. Composición según la reivindicación anterior, que es una composición farmacéutica.

25. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 23-24 para la elaboración de un medicamento.

60 26. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 23-24 para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, desorden o patología que cursa con alteraciones de la actividad telomerasa.

27. Uso de una composición según la reivindicación 26, donde la alteración de la actividad telomerasa es una reducción de su actividad.

65 28. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 26-27, donde la enfermedad se selecciona del grupo que comprende: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas, disqueratosis congénita, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelosa y degeneración de médula espinal.

## ES 2 325 431 B1

29. Uso de una composición según la reivindicación 28, donde la disqueratosis congénita es la disqueratosis congénita ligada al cromosoma X o la disqueratosis congénita autosómica dominante.

5 30. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 25-29, donde la composición se administra en la dosis adecuada que permita la recuperación de la actividad telomerasa.

10

15

20

25

30

35

40

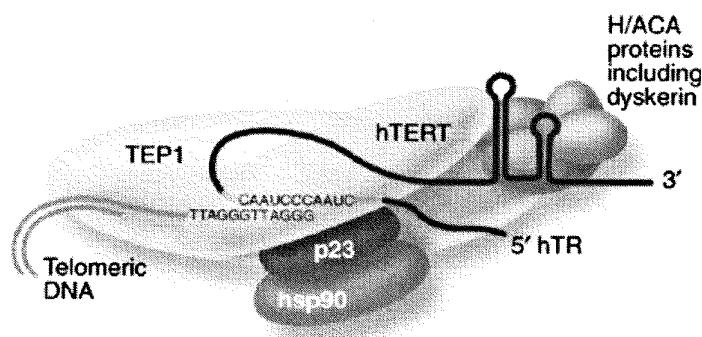
45

50

55

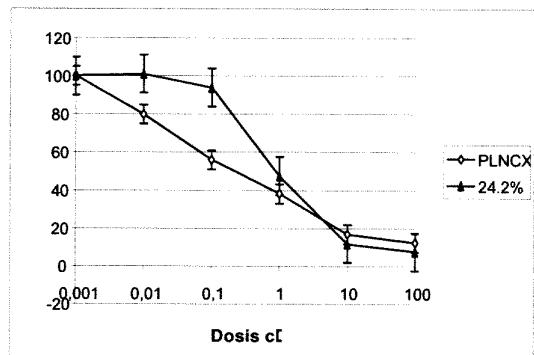
60

65

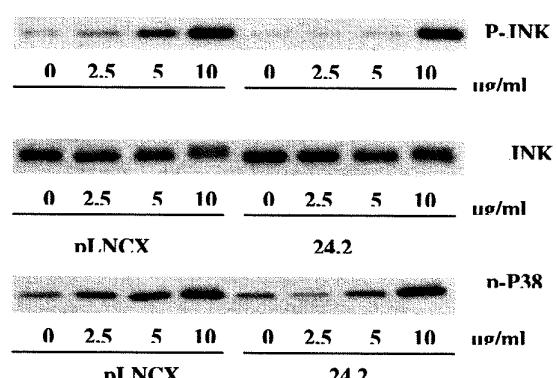


**Figura 1**

A)

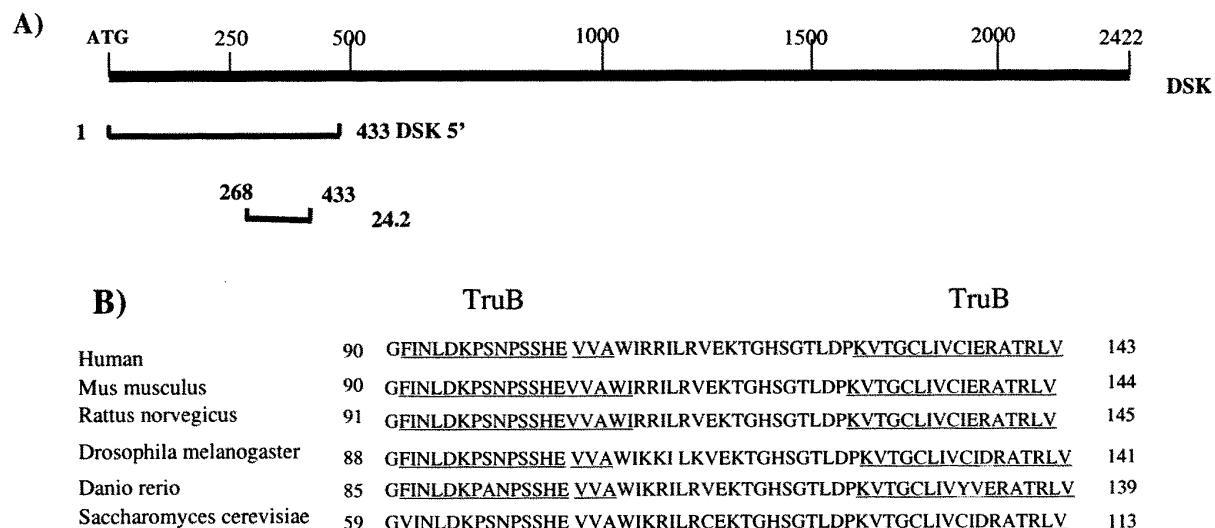


B)

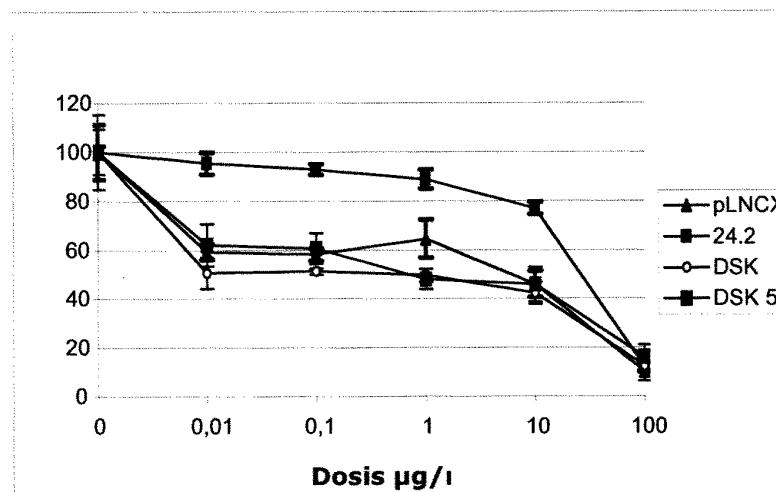


**Figura 2**

# ES 2 325 431 B1

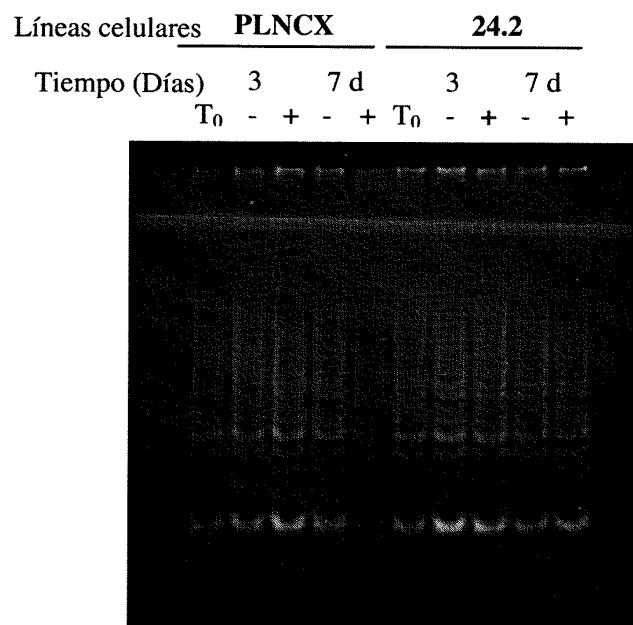


**Figura 3**

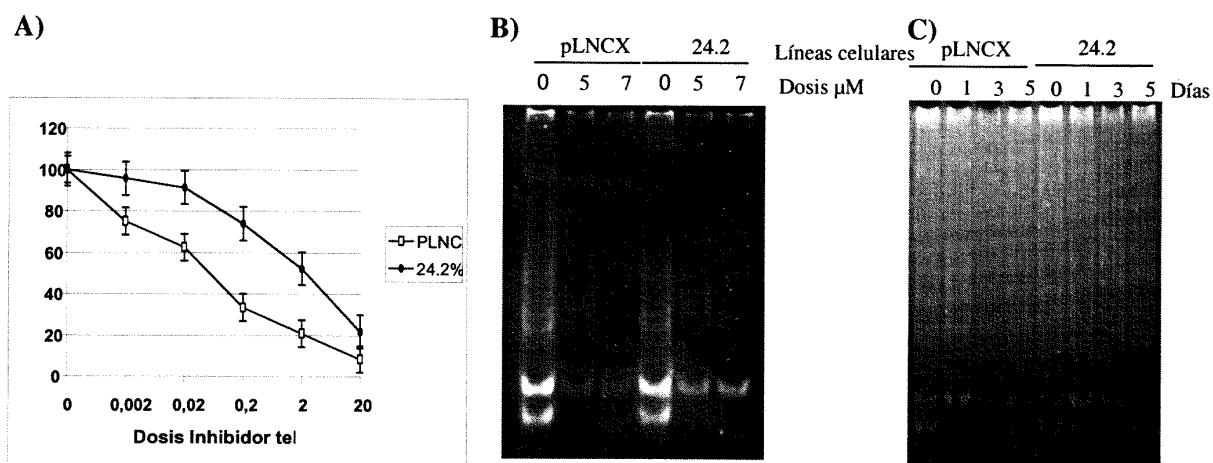


**Figura 4**

# ES 2 325 431 B1

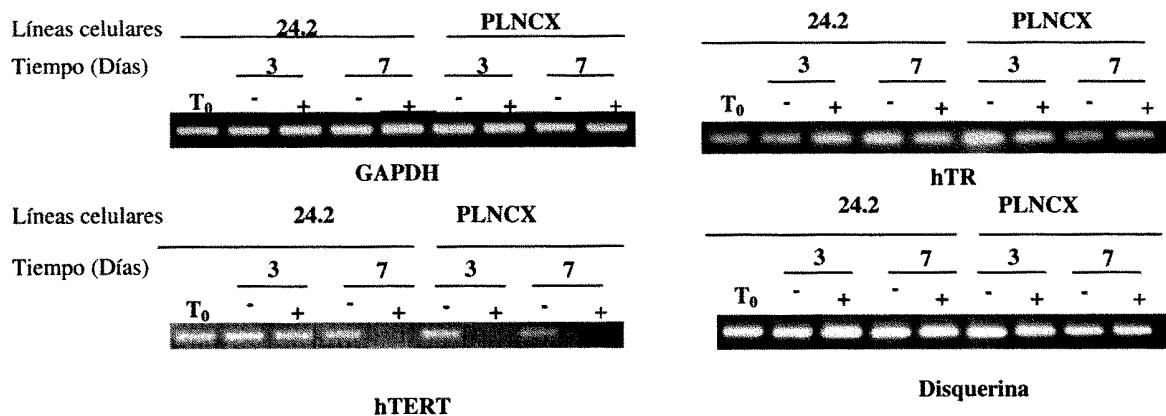


**Figura 5**

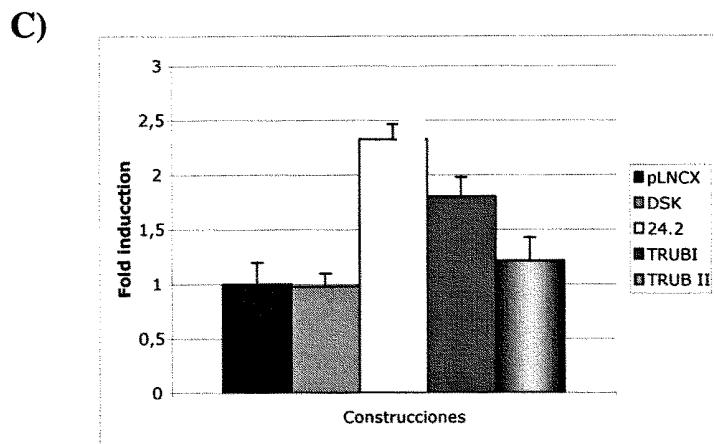
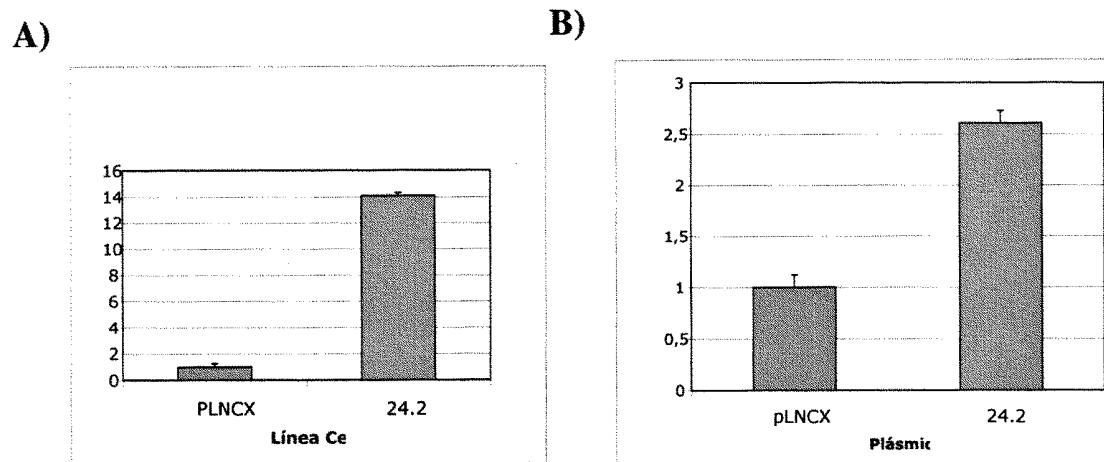


**Figura 6**

# ES 2 325 431 B1

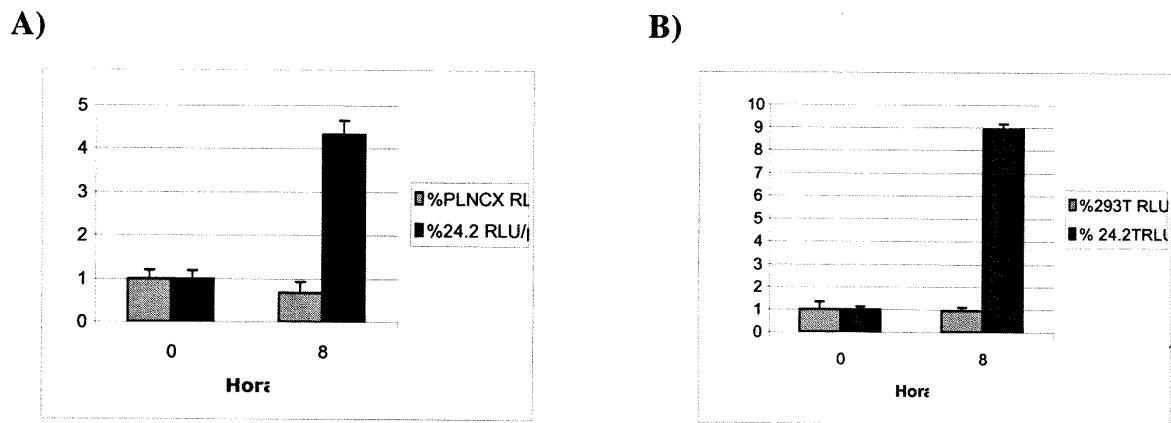


**Figura 7**

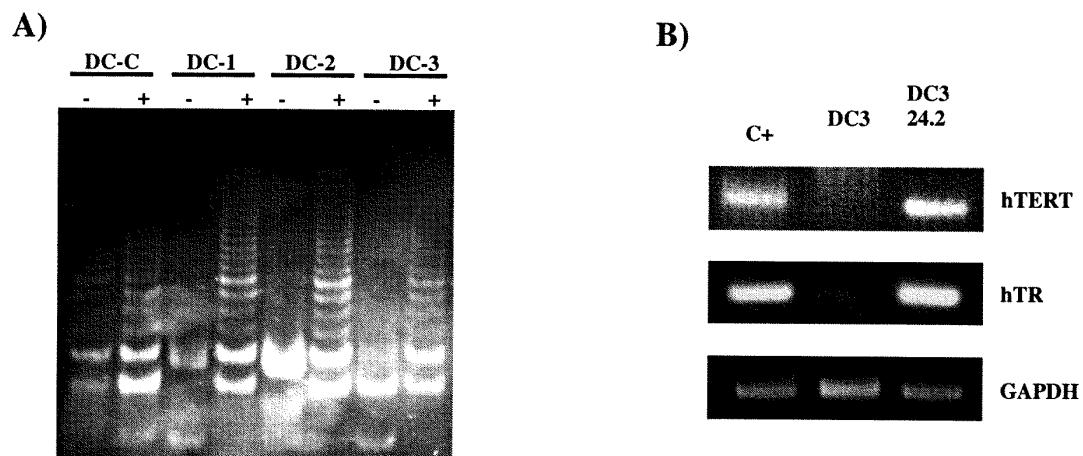


**Figura 8**

# ES 2 325 431 B1



**Figura 9**



**Figura 10**

# ES 2 325 431 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS,  
5 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID y  
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

<120> SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS Y PÉPTIDOS GSE 24.2 DE LA DISQUERINA INDUCTORES DE LA  
10 ACTIVIDAD TELOMERASA, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN, COMPOSICIONES TERAPÉUTI-  
CAS Y SUS APLICACIONES

<130> GSE 24.2

15 <160> 14

<170> PatentIn version 3.3

20 <210> 1

<211> 165

<212> DNA

25 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

30 <222> (1)..(165)

<223> Secuencia GSE 24.2

<400> 1

35 ggt ttc att aat ctt gac aag ccc tct aac ccc tct tcc cat gag gtg 48  
Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val  
1 5 10 15

40 gta gcc tgg att cga cgg ata ctt cgg gtg gag aag aca ggg cac agt 96  
Val Ala Trp Ile Arg Arg Ile Leu Arg Val Glu Lys Thr Gly His Ser  
20 25 30

45 ggt act ctg gat ccc aag gtg act ggt tgt tta atc gtg tgc ata gaa 144  
Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val Thr Gly Cys Leu Ile Val Cys Ile Glu  
35 40 45

50 cga gcc act cgc ttg gtg aag 165  
Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys  
50 55

<210> 2

<211> 55

55 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

60 Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val 15  
1 5 10 15

65 Val Ala Trp Ile Arg Arg Ile Leu Arg Val Glu Lys Thr Gly His Ser  
20 25 30

ES 2 325 431 B1

Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val Thr Gly Cys Leu Ile Val Cys Ile Glu  
 35 40 45  
 5  
 Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys  
 50 55  
 <210> 3  
 10 <211> 496  
 <212> DNA  
 <213> *Homo sapiens*  
 15 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(495)  
 20 <400> 3  
 atg gcg gat gcg gaa gta att att ttg cca aag aaa cat aag aag aaa  
 Met Ala Asp Ala Glu Val Ile Ile Leu Pro Lys Lys His Lys Lys Lys  
 1 5 10 15  
 25 aag gag cgg aag tca ttg cca gaa gat gta gcc gaa ata caa cac  
 Lys Glu Arg Lys Ser Leu Pro Glu Glu Asp Val Ala Glu Ile Gln His  
 20 25 30  
 30 gct gaa gaa ttt ctt atc aaa cct gaa tcc aaa gtt gct aag ttg gac  
 Ala Glu Glu Phe Leu Ile Lys Pro Glu Ser Lys Val Ala Lys Leu Asp  
 35 40 45  
 35 acg tct cag tgg ccc ctt ttg cta aag aat ttt gat aag ctg aat gta  
 Thr Ser Gln Trp Pro Leu Leu Lys Asn Phe Asp Lys Leu Asn Val  
 50 55 60  
 40 agg aca aca cac tat aca cct ctt gca tgt ggt tca aat cct ctg aag  
 Arg Thr Thr His Tyr Thr Pro Leu Ala Cys Gly Ser Asn Pro Leu Lys  
 65 70 75 80  
 45 aga gag att ggg gac tat atc agg aca ggt ttc att aat ctt gac aag  
 Arg Glu Ile Gly Asp Tyr Ile Arg Thr Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys  
 85 90 95  
 50 ccc tct aac ccc tct tcc cat gag gtg gta gcc tgg att cga cg<sub>g</sub> ata  
 Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val Val Ala Trp Ile Arg Arg Ile  
 100 105 110  
 55 ctt cgg gtg gag aag aca ggg cac agt ggt act ctg gat ccc aag gtg  
 Leu Arg Val Glu Lys Thr Gly His Ser Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val  
 115 120 125  
 60 act ggt tgt tta atc gtg tgc ata gaa cga gcc act cgc ttg gtg aag  
 Thr Gly Cys Leu Ile Val Cys Ile Glu Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys  
 130 135 140  
 65 tca caa cag agt gca ggc aaa gag tat gtg ggg att gtc cgg ctg cac  
 Ser Gln Gln Ser Ala Gly Lys Glu Tyr Val Gly Ile Val Arg Leu His  
 145 150 155 160

# ES 2 325 431 B1

	aat gct att gaa ggg g	496
	Asn Ala Ile Glu Gly	
	165	
5	<210> 4	
	<211> 165	
	<212> PRT	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 4	
15	Met Ala Asp Ala Glu Val Ile Ile Leu Pro Lys Lys His Lys Lys Lys 1 5 10 15	
20	Lys Glu Arg Lys Ser Leu Pro Glu Glu Asp Val Ala Glu Ile Gln His 20 25 30	
25	Ala Glu Glu Phe Leu Ile Lys Pro Glu Ser Lys Val Ala Lys Leu Asp 35 40 45	
	Thr Ser Gln Trp Pro Leu Leu Leu Lys Asn Phe Asp Lys Leu Asn Val 50 55 60	
30	Arg Thr Thr His Tyr Thr Pro Leu Ala Cys Gly Ser Asn Pro Leu Lys 65 70 75 80	
35	Arg Glu Ile Gly Asp Tyr Ile Arg Thr Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys 85 90 95	
40	Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val Val Ala Trp Ile Arg Arg Ile 100 105 110	
45	Leu Arg Val Glu Lys Thr Gly His Ser Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val 115 120 125	
50	Thr Gly Cys Leu Ile Val Cys Ile Glu Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys 130 135 140	
55	Ser Gln Gln Ser Ala Gly Lys Glu Tyr Val Gly Ile Val Arg Leu His 145 150 155 160	
	Asn Ala Ile Glu Gly	
	165	
60	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

ES 2 325 431 B1

# ES 2 325 431 B1

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Oligo F para disquerina

<400> 10

ccccttcaat agcattgtgc

10 <210> 11

<211> 54

<212> DNA

15 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

20 <222> (1)..(54)

<220>

<221> misc\_feature

25 <222> (4)..(50)

<223> Dominio TrubI

<400> 11

ggt ttc att aat ctt gac aag ccc tct aac ccc tct tcc cat gag gtg  
Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val  
1 5 10 15

30 <210> 12

35 <211> 54

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 12

Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val  
1 5 10 15

45 <210> 13

50 <211> 75

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

55 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(75)

60 <220>

<221> misc\_feature

<222> (4)..(50)

ES 2 325 431 B1

<223> Dominio Trub II

<400> 13

```

5      cac agt ggt act ctg gat ccc aag gtg act ggt tgt tta atc gtg tgc 48
      His Ser Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val Thr Gly Cys Leu Ile Val Cys
      1          5             10            15

```

10           ata gaa cga gcc act cgc ttg gtg aag           75  
       Ile Glu Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys  
                  20                   25

<210> 14

15 <211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 14

His Ser Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val Thr Gly Cys Leu Ile Val Cys  
 1 5 10 15

25

Ile Glu Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys  
20 25

30

35

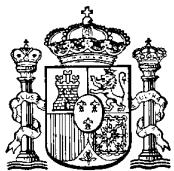
40

45

50

•

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

- (11) ES 2 325 431  
(21) N° de solicitud: 200502511  
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 14.10.2005  
(32) Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

- (51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9954449 A2 (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS) 28.10.1999, todo el documento.	1-30
A	KNIGHT, S.W., et al. "X-linked dyskeratosis congenita is predominantly caused by missense mutations in the DKC1 gene". AM. J. HUM. GENET. 27.05.1999. Vol. 65, páginas 50-58, todo el documento.	1-30
A	VULLIAMY, T.J., et al. "Dyskeratosis congenita caused by a 3' deletion: Germline and somatic mosaicism in a female carrier". BLOOD. 15.08.1999. Vol. 94, nº 4, páginas 1254-1260, todo el documento.	1-30

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 05.02.2007	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 1/2
--	---------------------------------	---------------

**INFORME DEL ESTADO DE LA TÉCNICA**

Nº de solicitud: 200502511

**CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD**

**C12N 9/12** (2006.01)

**C12N 9/88** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)