

**(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**

**(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual**
Oficina internacional



PCT

**(43) Fecha de publicación internacional
16 de Agosto de 2007 (16.08.2007)**

**(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/090911 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 9/12 (2006.01) *A6IP 43/00* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

4, E-28029 Madrid (ES). **SÁNCHEZ PÉREZ, Isabel** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid, Fundación General, Ctra. Colmenar Viejo, km 15, Pabellón C - 2^a Planta, (Cantoblanco) (ES). **MURGUIA IBÁÑEZ, José Ramón** [ES/ES]; Universidad Politécnica de Valencia, CTT-Edif. I1y I2 CAMINO DE VERA s/n, E-46022 Valencia (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2006/070152

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de presentación internacional:
11 de Octubre de 2006 (11.10.2006)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200502511 14 de Octubre de 2005 (14.10.2005) ES

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitantes (*para todos los Estados designados salvo US*): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID - FUNDACIÓN GENERAL** [ES/ES]; Ctra. Colmenar Viejo, km 15, Pabellón C - 2^a Planta, (Cantoblanco), E-28049 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA** [ES/ES]; CTT-Edif. I1y I2 CAMINO DE VERA s/n, E-46022 Valencia (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **PERONA ABELLÓN, Rosario** [ES/ES]; Insto. de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Arturo Duperier, 4, E-28029 Madrid (ES). **MACHADO PINILLA, Rosario** [ES/ES]; Insto. de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Arturo Duperier, 4, E-28029 Madrid (ES). **ASTRE GARZÓN, Leandro** [ES/ES]; Insto. de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Arturo Duperier,

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: SEQUENCE OF NUCLEOTIDES AND PEPTIDES GSE 24.2 OF DYSKERIN, WHICH CAN INDUCE TELOMERASE ACTIVITY, METHOD FOR OBTAINING SAME, THERAPEUTIC COMPOSITIONS AND APPLICATIONS THEREOF

AI **(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) Abstract: The invention relates to a compound which induces or activates telomerase activity, based on the nucleotide sequence of the GSE 24.2 fragment of dyskerin or the protein or peptide sequence encoded by said nucleotide sequence. The invention also relates to vectors containing said sequence and cells transformed with same and pharmaceutical compositions containing all of the aforementioned elements. Said compositions can be used in the treatment of diseases from the following group: ageing or acceleration of ageing, neurodegenerative diseases and congenital dyskeratosis.

(57) Resumen: 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.

WO 2007/090911 A1

TITULO

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS Y PÉPTIDOS GSE 24.2 DE LA DISQUERINA INDUCTORES DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN, COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS Y SUS APLICACIONES

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.

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 5 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 10 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, 15 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 20 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 25 de la expresión de hTERT (Burger et al., 1997).

DESCRIPCIÓN

Descripción breve

Un objeto de la presente invención lo constituye un 30 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),
- 15 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
- 20 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.

25 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.

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).

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

Otro objeto particular de la presente invención lo 5 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 10 de mamíferos, preferentemente humanos. Un ejemplo de una realización particular lo constituye el vector expresión de la invención pLNCX 24.2 (ver ejemplos).

Además, otro objeto particular de la invención lo constituye una proteína o péptido, en adelante proteína GSE 15 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),
 - 25 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).
- 30 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.

5 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 10 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.

Por lo tanto, otro objeto de la invención lo constituye el uso del compuesto activador GSE 24.2 de la 15 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 20 invención, al siguiente grupo: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y disqueratosis congenita.

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento 25 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 30 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.

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:
5 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.

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:

- 15 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
20 de a) y b), y
- d) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, 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 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.

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.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en 5 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 10 constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la proteína o péptido GSE 24.2 pertenece al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por una secuencia de aminoácidos GSE 24.2 humana (SEQ ID 15 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
- 20 d) 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 25 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 30 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.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención, en adelante uso 5 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 10 dicha composición terapéutica en dosis adecuada que permita la recuperación de la actividad telomerasa en el interior de sus células.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la 15 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 20 o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas, disqueratosis congenita, Cri du chat, ataxia gelangiectasia, el Síndrome de Nijmegen breakage, el Síndrome de Bloom, el Síndrome de Werner, anemia de Fanconi, colitis ulcerosa, envejecimiento vascular, 25 arteriosclerosis y cáncer.

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: 30 enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelosa y degeneración de médula espinal.

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 congenita ligada al cromosoma X.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la 5 invención en un método de tratamiento de la disqueratosis congenita autosómica dominante.

Descripción detallada

10 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 congenita.

15 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 N01), que expresa una secuencia interna de la disquerina (SEQ ID N02), compensa en células de pacientes con disqueratosis congenita y en 20 células VA13 los defectos en la actividad telomerasa (Ejemplo 3). Más concretamente, en las células de pacientes con disqueratosis congénita y en células VA13, al transfectar las mismas con la secuencia 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 péptido 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. 25 Curiosamente, Collins et al habían descrito previamente que en células de estos mismos pacientes se recuperaba la actividad telomerasa sólo sobreexpresando el gen hTERT y no 30

así con la expresión de la disquerina, proteína mutada en estos pacientes (Mitchell et al., 1999).

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 péptido 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. En este sentido, en la presente invención se ha observado que el promotor de la proteína hTERT, pero no hTR, en células transfectadas con el péptido GSE 24.2 se activa de forma constitutiva de una manera dependiente de la expresión c-myc, y más concretamente a través de su unión a la región NHEIII localizada en la región P1 del promotor rica en purinas (Pu27, ver Ejemplo 2) permitiendo un cambio de conformación secundaria del DNA de tal forma que factores de transcripción pueden acceder al DNA. Cualquier cambio en la secuencia de esta región que modifique su estructura secundaria altera la actividad del péptido GSE 24.2.

Igualmente, una secuencia equivalente al péptido humano GSE 24.2 (CBF5 de levadura *S. cerevisiae* CBF5), presenta una actividad similar en la activación de hTERT (datos no mostrados), indicando un alto grado de conservación funcional en la actividad de este dominio de la disquerina, definiendo y ejemplarizando de esta manera las múltiples posibilidades de elementos o secuencias homólogas a GSE 24.2 que pueden utilizarse en la presente invención.

Además, este péptido 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 5 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 la actividad telomerasa (Lemateleur et al., 2004).

10 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 péptido GSE 24-2 podría disminuir la eficacia de estos inhibidores 15 impidiendo o disminuyendo la formación de estos G-quadruplex o quizás simplemente por otro mecanismo, es capaz de aumentar los niveles de hTERT aumentando así la actividad telomerasa.

Los elementos supresores génicos (GSEs) son fragmentos 20 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 30 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 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 5 en la secuencia GSE 24.2, ya que la proteína completa (ver SEQ ID 4) o el fragmento aminoterminal, no tienen actividad alguna. Finalmente, debe indicarse que estos resultados abren nuevas perspectivas terapéuticas de trastornos o enfermedades humanas que se deban a alteraciones del 10 complejo telomerasa (acortamiento de telómeros y enfermedades con envejecimiento celular o células madre) de tal forma que el elemento GSE 24.2 o derivados del mismo pueden utilizarse como un fármaco para recuperar la actividad telomerasa. Además, existen diferentes síndromes 15 diferentes a DC que incluyen entre sus fenotipos celulares un acortamiento de los telómeros y también fallos en la médula ósea, inmunosupresión y predisposición al cáncer. En ninguno de ellos está afectado por mutaciones el gen de la telomerasa, pero si lo está el recambio de los telómeros y 20 la actividad telomerasa.

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 25 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.

Tal como se utiliza en la presente invención el 30 término "compuesto inductor o activador de la telomerasa" se 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, 5 una proteína o una secuencia de nucleótidos.

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 10 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).

En el sentido utilizado en esta descripción, el 25 término "análoga" pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos 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 conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción 30 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, 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.

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%.

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.

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).

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 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 inmunoafinidad: péptidos 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. "Molecular cloning, a Laboratory Manual 2nd 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 comprende una secuencia de nucleótidos GSE 24.2 o una construcción genética GSE 24.2, descritas en la presente 5 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 10 1 y 2).

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*, 15 *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 20 (*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 25 condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos de expresión, vectores virales (DNA o RNA), cósmidos, cromosomas artificiales, etc. que pueden contener, además, marcadores utilizables para seleccionar 30 las células transfectadas o transformadas con el gen o genes de interés. La elección del vector dependerá de la célula huésped y 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, 2nd 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 siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por una secuencia de aminoácidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO2), una secuencia de aminoácidos análoga a la
- b) 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).

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.

5 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
10 10 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
15 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
20 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
25 lo constituye una proteína cuya secuencia de aminoácidos de
c), fragmento de está 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 -
30 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 estípes 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 5 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 10 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, 15 disqueratosis congenita, Cri du chat (CdC, OMIM 123450), ataxia gelangiectasia (AT, OMIM 208900), el Síndrome de Nijmegen breakage (NBS, OMIM 251260), el Síndrome de Bloom (BS, OMIM, 210900), el Síndrome de Werner (WS, OMIM 277900), anemia de Fanconi (FA OMIM 227650, colitis 20 ulcerosa, envejecimiento vascular, arteriosclerosis y cáncer.

Los estudios realizados en los últimos años han puesto de relieve la posible relación entre los defectos en el mantenimiento de la actividad telomerasa y otros síndromes 25 en los que hay fallos en la medula ósea. La razón principal de la muerte para los pacientes con disqueratosis congénita es por un fallo en la médula ósea causada por infecciones oportunistas o hemorragias (en el 70% de los casos). Otras causas de muerte son la enfermedad pulmonar y cáncer.

La enfermedad Cri du chat (CdC, OMIM 123450) es un síndrome congénito hereditario asociado a delecciones del brazo corto del cromosoma 5 y aparece con una frecuencia de 1:20.000 y 1:50.000 y la frecuencia en pacientes afectados

con retardo mental profundo (IQ menor de 20) alcanza el 1%. La ataxia gelangiectasia (AT, OMIM 208900) es un síndrome autosómico recesivo originado por mutaciones en el gen ATM. Los problemas aparecen entre el segundo y quinto año de vida y son una degeneración neuronal progresiva (ataxia cerebral), telangiectasia ocular, inmunodeficiencia, hipogonadismo, inestabilidad genómica, envejecimiento prematuro, diabetes mellitus suave, estatura pequeña, y predisposición al cáncer (linfomas y leucemias).

El síndrome de Nijmegen breakage (NBS, OMIM 251260) es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones o pérdidas del gen Nibrina. El síndrome se caracteriza por una microcefalia, apariencia facial destructiva, retardo en el crecimiento, retardo mental progresivo y fuerte predisposición a linfomas e infecciones del tracto respiratorio.

El síndrome de Bloom (BS, OMIM, 210900) y síndrome de Werner (WS, OMIM 277900). BS es un síndrome autosómico recesivo inducido por mutaciones en el gen recQ, una proteína con actividad helicasa. WS es también un síndrome autosómico recesivo causado por mutaciones en la helicasa recQL2. Ambas enfermedades se caracterizan por un envejecimiento acelerado y los síntomas incluyen arterioesclerosis, osteoporosis, diabetes mellitus, cataratas bilaterales, y predisposición a algunos tipos de tumores particularmente sarcomas (WS) y leucemias (BS).

La anemia de Fanconi (FA OMIM 227650) es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por un número alto de defectos en el desarrollo, fallos en la medula ósea y un aumento de mil veces en la incidencia de leucemias mieloides y una alta predisposición a desarrollar tumores sólidos. La frecuencia de desarrollo de la enfermedad entre los portadores de las mutaciones es de 1:100.

La colitis ulcerosa es una enfermedad que afecta uno de cada 100 españoles. Es una enfermedad cuyo origen se piensa es auto-inmune y en la que intervienen factores genéticos y ambientales. La colitis ulcerosa afecta el intestino delgado y se caracteriza por la inflamación crónica de la lámina propia colónica con consecuente ulceración, disrupción de la barrera mucosa y atrofia de la mucosa del colon. El riesgo de cáncer aumenta con la duración de la enfermedad y ocurre en numerosos órganos como colon y linfomas.

Por otro lado, entre las consecuencias de la senescencia celular está la arteriosclerosis. Por una parte la disfunción telomérica está presente en vasos sanguíneos con placas arterioscleróticas. La reactivación de la telomerasa en células progenitoras vasculares aumenta la capacidad de división de estas células y la vasculogénesis. Una pérdida de estas células progenitoras contribuye a una importante disfunción vascular para lo cual una terapia anti-senescencia serviría como nuevo abordaje para paliar los efectos vasculares de el envejecimiento y la arteriosclerosis.

Finalmente, y en relación con otras posibles aplicaciones del elemento GSE 444 de la invención debe indicarse que están pueden ser muy amplias una vez que se conoce el mecanismo, o uno de ellos, por los que este elemento lleva a cabo su actividad biológica, y que se describe por primera vez en la presente invención: uniéndose a la región NHEIII. En este ámbito existen pocos ejemplos de esta secuencia de polipurinas en otros promotores, pero se puede deducir que esta región de poliurinas se encuentra en las regiones promotoras de los genes CCR5 y PDGFA, entre otros. Por otro lado, se conocen pocos factores de transcripción que interactúen con este

dominio NHE, aunque debe destacarse el péptido supresor de metástasis nm23H1 (Yoshiro O et al. 2001; Grand et al. 2004). En este sentido, el elemento GSE 24.2 de la invención podría utilizarse como un factor supresor del crecimiento de tumores y de propagación de metástasis, aplicación que forma parte de la presente invención.

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 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.

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.

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.

5 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
10 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
15 oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia
20 Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

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
25 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:

- 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
- 10 d) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, 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 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.

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.

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 proteína o péptido GSE 24.2 pertenece al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por una secuencia de aminoácidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO2),
- 5 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
- 10 d) 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.

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.

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 5 aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos.

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 10 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, disqueratosis congenita, Cri du chat (CdC, OMIM 123450), ataxia gelangiectasia (AT, OMIM 208900), el Síndrome de Nijmegen breakage (NBS, OMIM 251260), el Síndrome de Bloom (BS, OMIM, 210900), el Síndrome de Werner (WS, OMIM 277900), anemia de Fanconi (FA OMIM 227650), colitis ulcerosa, envejecimiento vascular, 15 arteriosclerosis y cáncer.

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: 25 enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelosa y degeneración de médula espinal.

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 congenita 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 congenita autosómica dominante.

Referencias bibliográficas

- 5 Bednarek A, Shilkaitis A, GreenA, 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-
- 10 Bessler M, Wilson DB, Mason PJ. 2004. Dyskeratosis congenita and telomerase. Curr Opin Pediatr. Feb;16(1):23-8. Review.
- 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.
- 15 Cesare AJ and Griffith JD. 2004. Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. Mol. Cell. Biol. 24(22): 9948-9957.
- 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.
- 20 Fu D, Collins K. 2003 Distinct biogenesis pathways for human telomerase RNA and H/ACA small nucleolar RNAs Mol Cell. 11(5): 1361-72.
- 25 Grand CL, Powell TJ, Naglee RB, Bearss BJ, Tye D, Gleason-Guzman M, Hurley LH. Mutations in the G-quadruplex silencer element and their relationship to c-MYC overexpression, NM23 repression, and therapeutic rescue. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004, 101(16): 6140-6145.
- 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.
- 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.* 373(Pt 2): 523-9.
- 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.
- 15 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 20 cell carcinoma cell line. *Chemotherapy.* 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.
- Mochizuki Y, He J, Kulkarni S, Bessler M, Mason PJ. 2004. 25 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.
- Oh S, Song YH, Kim UJ, Yim J, Kim TK. 1999. In vivo and in 30 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.

- 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.* 5 28;100(22):12648-53.
- Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. 2001. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene.* 16;269(1-2): 1-12. Review.
- Redon S, Bombard S, Elizondo-Riojas MA, Chottard JC. 2001 10 Platination of the (T2G4)4 telomeric sequence: a structural and cross-linking study. *Biochemistry.* 24; 40(29): 8463-70.
- 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 15 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.
- Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH. 2002. 20 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.
- Sirinavin,C. & Trowbridge,A. 1975. Dyskeratosis congenita: clinical features and genetic aspects. *J. Med. Genet.* 12, 25 339-354.
- 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.
- 30 Trowbridge,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.
- 5 Yoshiro O, Tanaka M, Yoshii S, Nakaya NK, Sugimura H. Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 G interaction with Tiam1. Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98 (8): 4385-4390.
- Zhang RG, Zhang RP, Wang XW, Xie H. 2002. Effects of cisplatin on telomerase activity and telomere length in
- 10 BEL-7404 human hepatoma cells. Cell Res. 12(1): 55-62.
- 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.
- 15 Int J Mol Med. 11(6): 697-704.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1.- Estructura esquemática del complejo telomerasa.** Las proteínas hTERT, disquerina, p23, hsp90 y TEP1 junto con el ARN hTR constituyen el complejo ribonucleoproteico de la telomerasa.
- 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** 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 µg/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-1.

5 **Figura 3.- 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 nucleótido 268 al 433; también se muestra la
10 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.- Viabilidad de las líneas celulares 293T: pLNCX,
15 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 la disquerina (DSK).
20 La viabilidad se determinó como indica la figura 1 A. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuatriPLICADO.

Figura 5.- Actividad telomerasa de las líneas celulares 293T: pLNCX y 24.2 tras el tratamiento con cisplatino. Las
25 células fueron sembradas en placas de 60 mm, pretratadas con 0,5 µg/ml de cisplatino durante 3 días y posteriormente fueron tratadas con cisplatino a la dosis de 3 µg/ml (células sin pretratar). La actividad telomerasa fue medida mediante el ensayo TRAPeze de Intergen. El experimento se
30 realizó 3 veces con resultados similares.

Figura 6.- Viabilidad celular y actividad telomerasa de las líneas celulares 293T: pLNCX y 24.2 tratadas con el Inhibidor de la telomerasa I. A) Viabilidad celular. Tras

sembrar las células 293T: pLNCX y 24.2 en placas de 24 pocillos fueron incubadas con concentraciones entre 0-20 μ M de Inhibidor de la Telomerasa I. La viabilidad celular se midió mediante la técnica del cristal violeta tras 72 horas 5 de exposición a la droga. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuatriuplicado. 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 10 la telomerasa I (5-7 μ 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 15 tratamiento con el Inhibidor de la Telomerasa I. Actividad telomerasa en presencia de TI I (5 μ M) a 1 y 5 días. Las células fueron sembradas como en B. Posteriormente fueron tratadas con 5 μ M del Inhibidor a los tiempos indicados.

Figura 7.- Niveles de expresión de distintos genes 20 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 μ g/ml de cDDP tras un pretratamiento de 0,5 μ g/ml de cisplatino durante 3 días y posteriormente se recogieron a los tiempos indicados 25 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.

30

Figura 8.- Actividad del promotor de hTERT en las líneas celulares 293T: pLNCX y 24.2 y en células 293T

transfектadas de forma transitoria con la construcción pLNCX-24.2 y el plásmido pLNCX vacío. 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 luciférica de 10 µg de proteína total. Como control de transfección se cotransfектaron las células con un vector reportero, CMV-Renilla. B) Las 10 células 293T fueron transfectadas con el vector pLNCX y el plásmido 24.2 (5 µg) y ambas se cotransfектaron con 0,25 µg de vector reportero hTERT-luc. Tras sembrar las células como en A, se transfecaron con pLNCX y 24-2 y cotransfectarón con del vector reportero hTERT-luc, 15 posteriormente se trataron al igual que en A. Como control de transfección se utilizó el vector reportero CMV-Renilla. Los datos corresponden a la relación unidades relativas de luciférica con respecto a células no transfectadas. Cada punto representa con ± la desviación estandar obtenida de 3 experimentos independientes. C) Las células 293T fueron 20 transfectadas con las distintas construcciones GSE 24.4, DSK, TRUB I, TRUB II y el plásmido pLNCX vacío (5 µg) y se cotransfectoron con 0,25 µg de vector reportero hTERT-luc. Las células se sembraron en placas de 60 mm 24 horas 25 después de la transfección se lisaron las células y cuantificó la actividad luciférica de 10 µg de proteína total. Como control de transfección se cotransfectoron las células con un vector reportero CMV-Renilla. Los datos corresponden a la relación unidades relativas de luciférica 30 con respecto a células no transfectadas. Cada punto representa con ± la desviación estandar obtenida de 3 experimentos independientes.

Figura 9.- Actividad del promotor de hTERT tras el tratamiento con cisplatino. 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 60mm 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 cotransfектaron 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 cotransfектaron 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.- Actividad telomerasa y niveles de expresión de hTERT y hTR en células de pacientes de disqueratosis congenita y en células VA13 transfectados de forma transitoria con el plásmido 24.2 o con el vector vacío pLNCX. 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

vacio 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. (C) Actividad telomerasa en células VA13. Las 5 células fueron transfectadas de forma transitoria con 16 µg del vector control vacío pLNCX, expresando DKC o el péptido GSE 24.2 por millón de células. 24 horas más tarde, la actividad telomerasa se analizó como se ha descrito anteriormente utilizando diluciones de los extractos de 10 proteínas de cada transfección. (D) Los niveles de expresión de hTERT y hTR en células VA13 transfectadas con 16 µg de las diferentes construcciones por millón de células. Los niveles de RNA fueron detectados como se ha descrito anteriormente. GAPDH se utilizó como control. En 15 A, B, C, y D se repitieron los experimentos tres veces con resultados similares. (E) Actividad del promotor de hTERT en células VA13. Las células fueron cotransfектadas con las construcciones indicadas (10 µg por millón de células) y con el reportero hTERT-luc (1 µg por millón de células). 20 Después de 24 hrs de transfección se analizó la actividad luciferasa como se ha descrito anteriormente. CMV-Renilla (0,1 µg/ml por millón de células) fue utilizada como control de la eficiencia de la transfección. Los datos representan la media de dos experimentos realizados en 25 cuadruplicados.

Figura 11.- El péptido GSE 24.2 incrementa la actividad del promotor hTERT regulado por c- MYC. (A) Las células 293T fueron cotransfектadas con diferentes construcciones (10 µg/DNA por millón de células) y reportero hTERT-luc (1 µg por millón de células). (B) Las líneas celulares indicadas fueron co-transfектadas con el reportero hTERT-luc y diferentes cantidades del vector de expresión Mad/myc. (C) Las líneas celulares indicadas fueron co-transfектadas con

el reportero HIV-luc y con diferentes cantidades del vector de expresión Mad/myc. Después de 24 hrs de la transfección las células fueron estimuladas con 50 ng/ml de TNF- α durante 6 horas y se analizó la actividad luciferasa al igual que lo descrito anteriormente. CMV-Renilla (0,1 μ g/ml por millón de células) fue utilizado como un control de la eficiencia de la transfección. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuadruplicados.

Figura 12.- La actividad promotora de c-MYC es inducida por el péptido GSE 24.2. (A) representación esquemática del promotor c-MYC indicando las diferentes construcciones utilizadas en los experimentos. (B) Células 293T fueron cotransfектadas con los plásmidos que se indican (10 μ g/DNA por millón de células) y con el reportero px3.2 c-MYC-luc (1 μ g por millón de células). (C) Las líneas celulares indicadas fueron transfectadas con el reportero px3.2 c-MYC-luc (1 μ g por millón de células). (D) Las líneas celulares indicadas fueron transfectadas con las diferentes construcciones del reportero c-MYC-luc (1 μ g por millón de células). Después de 24 horas de la transfección se analizó la actividad luciferasa como se ha indicado anteriormente. CMV-Renilla (0,1 μ g/ml por millón de células) fue utilizado como un control de la eficiencia de la transfección. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuadruplicados.

Figura 13.- La actividad del promotor c-MYC inducida por el péptido GSE 24.2 es dependiente del elemento NHE III. (A) Representación esquemática de las mutaciones generadas en el elemento NHE III. (B) Las células 293T fueron cotransfектadas con diferentes construcciones (10 μ g/DNA por millón de células) y con los diferentes mutantes del plásmido reportero px3.2 (1 μ g por millón de células). (C) Las líneas celulares indicadas en la figura fueron

transfектadas con los distintos mutantes del reportero px3.2 (1 µg por millón de células). Después de 24 hrs de la transfección la actividad luciférica se analizó como se ha indicado anteriormente. CMV-Renilla (0,1 µg/ml por millón de células) fue utilizado como un control de la eficiencia de la transfección. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuadruplicados.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

10 **Ejemplo 1.- Identificación y actividad biológica de la secuencia GSE 24.2**

11 **1.1.- Identificación de la secuencia GSE denominada 24.2**

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 transfecaron de nuevo para asegurarnos de que conferían resistencia. Uno de estos GSEs era un fragmento de 165 pb denominado 24.2 (ver SEQ ID N01) que correspondía con una secuencia interna de la disquerina humana.

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 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 esta 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 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.

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 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 5 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 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 10 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 15 cisplatino está restringido a la secuencia de cDNA comprendida en el fragmento GSE 24.2.

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

Como ya se ha dicho anteriormente el cisplatino inhibe 20 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 25 celular que 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 30 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 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 5 inhibición de la actividad telomerasa, mientras que para la línea celular 24.2 no se observó inhibición a ese tiempo. (Figura 4). Se 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 10 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 15 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 20 líneas celulares pLNCX y 24.2 fueron tratadas con concentraciones crecientes de inhibidor de la telomerasa I (0-20 μ M) 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 25 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. 30 También se estudió la actividad telomerasa tratando las células pLNCX y pLNCX 4.2 con una dosis (5 μ M) y en varios 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 5 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.

10 **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 15 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 20 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 25 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 30 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 5 la actividad del promotor de hTERT

Puesto que se observaron cambios en los niveles de expresión de hTERT en las células que expresaban el péptido GSE 24.2 en respuesta a cisplatino se decidió estudiar si la expresión de la secuencia GSE 24.2 y secuencias de 10 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. El dominio TRUB pseudouridina sintasa de la disquerina comprende dos subdominios estructurales: motivo Trub I y II (Zucchini et 15 al., 2003). Estos dos dominios son críticos para mantener la estructura proteica global de la disquerina. Además, el motivo II contiene al menos un residuo (asp125) esencial para la actividad enzimática. Para ello se transfeció el vector reportero hTERT-luc que contiene una secuencia de 20 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 25 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 30 los 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.

5 Además, se subclonó la secuencia del gene CBF5 de la levadura *S. cerevisiae* CBF5, secuencia equivalente a la de GSE24-2 (Figura 3b) en el vector pLNCX, y se observó que la expresión de dicha construcción incrementaba además la actividad de hTERT, pero no la del promotor hTR (datos no mostrados), indicando un alto grado de conservación funcional en la actividad de este dominio de la disquerina.

10

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 transfecaron 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 transfecadas 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.

25

30

Ejemplo 2.- El fragmento NHEIII del promotor del gen c-MYC es la diana del péptido GSE 24-2.

El promotor hTERT contiene dos regiones E-boxes (CACGTG), puntos de unión a heterodímeros myc/max (Oh et al., 1999; Wu et al., 1999) así como cinco regiones spl. Para estudiar si la activación del promotor de hTERT por parte del péptido GSE24-2 se lleva a cabo a través de este E-box, se realizó una transfección de una molécula híbrida que contiene este dominio de unión a DNA de c-myc y el dominio de transactivación de mad, que fue capaz de inhibir la unión a esta caja E-box, inhibiendo la transcripción dependiente de c-myc. Se llevó a cabo una transfección de las células control y de células que expresan la proteína disquerina (DKC) y el péptido GSE24-2 con cantidades incrementales de dicha molécula híbrida. La expresión de la proteína de fusión mad/myc inhibió la actividad basal del promotor hTERT de forma dependiente de la dosis, tanto en el grupo control como en las células DKC. Más aún, la expresión de la proteína de fusión myc/mad fue capaz de bloquear la transcripción mediada por el péptido GSE 24.2 en las células GSE24-2, indicando que la activación de la transcripción hTERT inducida por GSE 24-2 es dependiente de c-myc (Figura 11b). Esta inhibición fue específica ya que la transfección de la construcción myc/mad conjuntamente con un promotor dependiente de NF κ B (HIVLuc) no afectó la transcripción después de la estimulación con TNF α en ninguna de las líneas celulares (Figura 11c).

La transcripción del gen c-myc es controlada por dos distintos promotores y parece que es reprimida por un dominio hipersensible a DNase localizado entre el promotor P0 y P1 (NHEIII). Así, se utilizaron cuatro diferentes construcciones conteniendo 3.2 Kb. del punto de inicio de transcripción de c-myc unida al gen luciferasa (Figura 12a). Este plásmido (px3.2myc) fue transfectado en las células control y en las células GSE24-2 observando un

incremento de tres veces en la actividad en el último grupo de células (Figura 12b). Un resultado similar se obtuvo al transfectar células en células 293T con el vector pLNCX vector o con el plásmido que expresa el péptido GSE 24-2 conjuntamente con el reportero px3.2myc (Figura 12c).

Ambos resultados indicaron que este fragmento interno de la disquerina (GSE 24-2) fue capaz de activar la transcripción del gen c-myc. Este factor de transcripción, c-myc, por tanto debería activar la transcripción de hTERT. Así, se utilizaron tres mutantes seleccionados en el promotor de c-myc para definir la región necesaria para que el péptido GSE24-2 lleve a cabo su actividad inductora. De todos los mutantes utilizados, sólo aquellos que contiene la región distal de los promotores P1 y P0, que incluyen el dominio NHEIII, fueron capaces de mantener la transcripción en las células GSE24-2 pero no en las células control (Figura 12d), indicando que la región proximal del promotor P2 no es necesario para la actividad del péptido GSE24-2.

Dado que la región NHEIII ha sido descrita como inhibidor de la transcripción de c-myc, se construyeron varios mutantes de la región NHEIII mediante modificación de Guaninas de la región rica en purinas. Las 27 Guaninas presentes en la región de NHEIII están involucradas en el mantenimiento de la estructura secundaria de los G-quadruplexos de la región rica en purina (Pu27)). Se mutó la G12A que se encuentra en la segunda guanina del segundo cuarteto, la G17A en el segundo triplete de Guaninas y finalmente dos Guaninas consecutivas (G26A/G27A) al final de la región rica de purina (Figura 13a). Estas construcciones promotoras fueron transfectadas en células que expresan ya sea el vector vacío, o los vectores que contienen la proteína DKC o el péptido GSE24-2. Los resultados indican que únicamente el promotor WT px3,2 myc

fue capaz de ser activado cuando se transfeció con GSE24-2. Los tres mutantes de la región Pu27 fueron activados mediante GSE24-2, aunque en niveles muy bajos (Figura 13b).

Interesantemente la transfección del doble mutante de G en las células control o que expresan DKC fue capaz de mostrar una actividad incrementada en el promotor, indicando que esta región es importante para mantener una conformación represora del promotor. Resultados similares se obtuvieron en ensayos de transfección transitorias en células 293T cuando se transfecionaron los distintos mutantes con el vector vacío, con la proteína DKC o el péptido GSE 24-2 (Figura 13c). En conjunto estos resultados sugieren que el péptido GSE24-2 es capaz de modificar la estructura secundaria de la región Pu27 región hacia una conformación activa, permitiendo así la transcripción del gen c-myc.

Ejemplo 3.- Expresión del GSE 24.2 en células de pacientes de disqueratosis congénita ligada al cromosoma X y en células VA13.

Puesto que en la disqueratosis congénita ligada al cromosoma X hay defectos en la actividad telomerasa, con bajos niveles de RNA de telomerasa, se probó el efecto de la expresión de este GSE 24.2 en células de pacientes con disqueratosis congenita. Para ello, se transfeció con el vector GSE 24.2 o con el vector vacío células de pacientes de disqueratosis congénita (DC-1, DC-2, DC-3) y células de la madre portadora (DC-C) disponibles comercialmente. Estas células son mortales y normalmente envejecen en cultivo. 24 horas después de la transfección se midió la actividad telomerasa y se observó, tanto en las células de la madre portadora como en las de los pacientes de disqueratosis congénita, un aumento de la actividad telomerasa al expresar el fragmento GSE 24.2 (Figura 10a). Curiosamente,

no se observó un incremento de la actividad telomerasa mediante la expresión de la disquerina completa (datos no mostrados). Por otro lado, los niveles de hTR son bajos en las células DC que expresan una forma mutada del gen de la disquerina (Mochizuki et al., 2004). 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.

Más aún, la expresión del péptido de la invención GSE24-2 en la línea celular deficiente de telomerasa VA13 (Cesare and Griffith, 2004), fue capaz de recuperar la actividad telomerasa (Figura 10c), y la expresión de los RNAs de hTERT y hTR (Figura 10d). En esta línea celular, la expresión del motivo I del péptido GSE24-2 (con una menor eficiencia), y el fragmento del gen CBF5 de levadura además 20 activó el promotor hTERT (Figura 10e). En conjunto los resultados indican que la expresión del péptido GSE24-2 fue capaz de recuperar la actividad telomerasa en ambas líneas celulares.

25 MATERIALES Y MÉTODOS

Construcciones y líneas celulares. Las líneas celulares de pacientes de Disqueratosis congénita ligada al cromosoma X se obtuvieron del Corriell Cell Repository y mantenidas en 30 RPMI 20% FBS. La línea VA13 fue obtenida de Dr. M Serrano. 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) 5 y 2 mM de Glutamina.

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 10 ID N01) se clonaron en el sitio ClaI del plásmido pLNCX (BD Biosciences Clontech).

Las células derivadas de pacientes con DC y su respectivo control fueron transfectadas de forma transitoria mediante electroporación utilizando 3 µg de la 15 construcción pLNCX o pLNCX 24.2 por millón de células.

La línea celular 293T se obtuvo del American Type Culture Collection y las células se crecieron en DMEM (Medio de Cultivo Eagle modificado por Dulbeco) (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 2 mM 20 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 cotransfектaron con pBABEpur 1 µg de vector por millón de células. 24 horas después de la transfección las células 25 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).

La construcción hTERT-luc fue clonada en el plásmido 30 pGL3 basic (Promega) y ha sido cedida por Tae Kook Kim (Kim et al., 1999).

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.

5 **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
10 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 desnaturizantes y tras ello se tiñó durante 30 minutos con bromuro de Etidio.

15 **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, 20 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.

25 **Western Blot y anticuerpos.** 20 µg de proteína se separaron en geles SDS-poliacrilamida, posteriormente se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore) mediante transferencia en húmedo. Las membranas se 30 bloquearon en una solución de BSA al 5% ó en 5% de leche desnatada 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.

5 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).

10 **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:

Oligo A: 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3' (SEQ ID NO5) y

Oligo B: 5'- GGATGAAGCGGAGTCGGA -3' (SEQ ID NO6) para hTERT;

20 Oligo C: 5'- TCTAACCTAACTGAGAAGGGCGTAG -3' (SEQ ID NO7) y

Oligo D: 5'- GTTGCTCTAGAATGAACGGTGGAAAG -3' (SEQ ID NO8) para hTR;

Oligo E: 5'- ATGGCGGATGCGGAAGTAATT- 3' (SEQ ID NO9) y

Oligo F: 5'- CCCCTTCAATAGCATTGTGC - 3' (SEQ ID NO10) para

25 Disquerina

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 30 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).

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 5 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 10 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.

Curvas de crecimiento. La viabilidad celular se estudió 15 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 20 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 25 viabilidad con respecto a las células sin tratamiento, representándose la media de 2 experimentos realizados en cuatriplicado con sus desviaciones correspondientes.

Mutagénesis dirigida. Las mutaciones puntuales de guanina 30 en la región NHEIII del promotor del gen c-myc, px3.2, se llevaron a cabo usando el Kit de mutagénesis dirigida de Quickchange X-L (Strategene) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

REIVINDICACIONES

- 1.- Compuesto inductor o activador de la actividad telomerasa caracterizado porque es una secuencia de nucleótidos GSE 24.2 de la disquerina o porque es la 5 secuencia proteínica o peptídica codificada por dicha secuencia de nucleótidos.
- 2.- Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 caracterizada porque permite la expresión de una proteína o péptido inductor de la recuperación de la actividad 10 telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humanas, y porque está constituida por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:
 - a) una secuencia de nucleótidos constituida por 15 una secuencia de nucleótidos GSE 24.2 humana (SEQ ID N01),
 - b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a),
 - c) un fragmento de una cualquiera de las 20 secuencias de a) y b), y
 - d) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).
- 3.- Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 25 caracterizada porque es una secuencia de DNA, cDNA o mRNA.
- 4.- Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 2 caracterizada porque la secuencia de GSE 24.2 de a) está constituida por la SEQ ID N01.
- 5.- Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 30 caracterizada porque la secuencia GSE 24.2 de b) está constituida por la SEQ ID N011 ó la SEQ ID N013.

- 6.- Construcción genética caracterizada porque comprende una o varias de las secuencias de nucleótidos según las reivindicaciones 3 a la 5.
- 7.- Vector de expresión caracterizado porque comprende una 5 secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 3 a la 5 ó una construcción genética según la reivindicación 6.
- 8.- Vector de expresión según la reivindicación 7 caracterizado porque el vector expresión es el plásmido pLNCX 24.2.
- 10 9.- Proteína o péptido caracterizado porque induce la actividad telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humanas, y porque comprende una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:
- 15 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),
- 20 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 10.- Proteína según reivindicación 9 caracterizado porque la secuencia de aminoácidos de a) está constituida por la SEQ ID NO2.
- 11.- Proteína según reivindicación 9 caracterizado porque la secuencia de aminoácidos de c), es la SEQ ID NO12 ó la 30 SEQ ID NO14.
- 12.- Células, eucariotas - preferentemente humanas - o procariotas modificadas genéticamente caracterizadas porque comprenden la secuencia de nucleótidos según las

reivindicaciones 2 a la 5, la construcción según la reivindicación 6 o el vector de expresión según las reivindicaciones 7 y 8 y donde puede expresarse de forma adecuada el péptido o proteína según las reivindicaciones 9
5 a la 11.

13.- Célula según la reivindicación 12 caracterizado porque es una célula humana.

14.- Uso del compuesto inductor, la secuencia de nucleótidos, la construcción, el vector, la proteína o la
10 célula según las reivindicaciones 1 a la 13 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.

15 15.- Uso según la reivindicación 14 caracterizado porque la enfermedad pertenece al siguiente grupo: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y disqueratosis congenita.

16.- Composición farmacéutica o medicamento para el
20 tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías que cursan con alteraciones de la actividad telomerasa, preferentemente una reducción de la actividad caracterizada porque comprende un compuesto ó agente capaz de recuperar la actividad telomerasa según la reivindicación 1.

25 17.- Composición farmacéutica según la reivindicación 16 caracterizado porque el compuesto o agente inductor de la actividad telomerasa pertenece al siguiente grupo: secuencia de nucleótidos, construcción genética, vector de expresión, proteína o célula según las reivindicaciones 2 a
30 la 13.

18.- Composición farmacéutica según la reivindicación 17 caracterizado porque el compuesto es una o varias secuencias pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de nucleótidos constituida por una secuencia de nucleótidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO1),
5 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 que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y
10 c).
- 19.- Composición farmacéutica según la reivindicación 18 caracterizada porque la secuencia de nucleótidos de a) es la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO1.
- 20.- Composición farmacéutica según la reivindicación 18
15 caracterizada porque la secuencia de nucleótidos de c) es la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO11 ó SEQ ID NO 13.
- 21.- Composición farmacéutica según la reivindicación 17 caracterizada porque el compuesto es una construcción genética según la reivindicación 6.
- 20 22.- Composición farmacéutica según la reivindicación 17 caracterizada porque el compuesto es un vector de expresión según las reivindicaciones 7 y 8.
- 23.- Composición farmacéutica según la reivindicación 22 caracterizada porque el vector es el plásmido pLNCX 24.2.
- 25 24.- Composición farmacéutica según la reivindicación 17 caracterizada porque el compuesto es una proteína según las reivindicaciones 9 a la 11.
- 25.- Composición farmacéutica según la reivindicación 24 caracterizada porque la proteína pertenece al siguiente
30 grupo:
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
- 5 d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

26.- Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención 10 en la que la secuencia de aminoácidos de a) es la secuencia SEQ ID NO2.

27.- Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención 15 en la que la secuencia de aminoácidos de c) es la secuencia SEQ ID NO12 y SEQ ID NO14.

28.- Composición farmacéutica según la reivindicación 17 caracterizada porque el compuesto es una célula, preferentemente humana, transformada por la secuencia, construcción o vector según las reivindicaciones 2 a la 8.

20 29.- Uso de la composición farmacéutica según las reivindicaciones 16 a la 25 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, preferentemente una reducción, de la 25 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.

30 30.- Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 29 caracterizado porque la enfermedad que cursa con alteraciones de la actividad telomerasa que afecta a seres humanos, pertenece al siguiente grupo: envejecimiento o aceleración del envejecimiento,

58

enfermedades neurodegenerativas, disqueratosis congenita, Cri du chat, ataxia gelangiectasia, el Síndrome de Nijmegen breakage, el Síndrome de Bloom, el Síndrome de Werner, anemia de Fanconi, colitis ulcerosa, envejecimiento vascular, arteriosclerosis y cáncer.

5 31.- Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 30 caracterizado porque la enfermedad neurodegenerativa pertenece al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelosa y
10 degeneración de médula espinal.

32.- Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 30 caracterizado porque la enfermedad es el cáncer.

15 33.- Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 30 caracterizado porque la disqueratosis congénita es la disqueratosis congenita ligada al cromosoma X ó la disqueratosis congenita autosómica dominante.

20

25

1/11

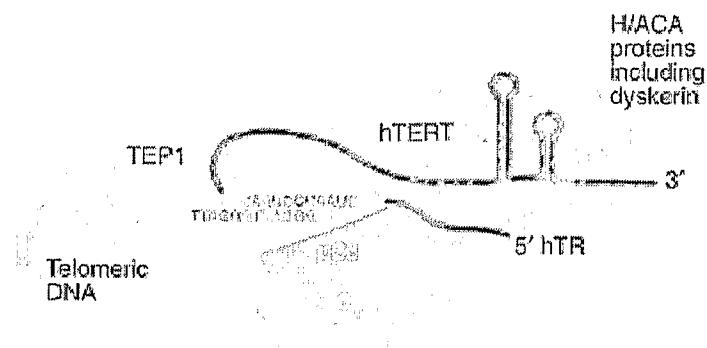


Figura 1

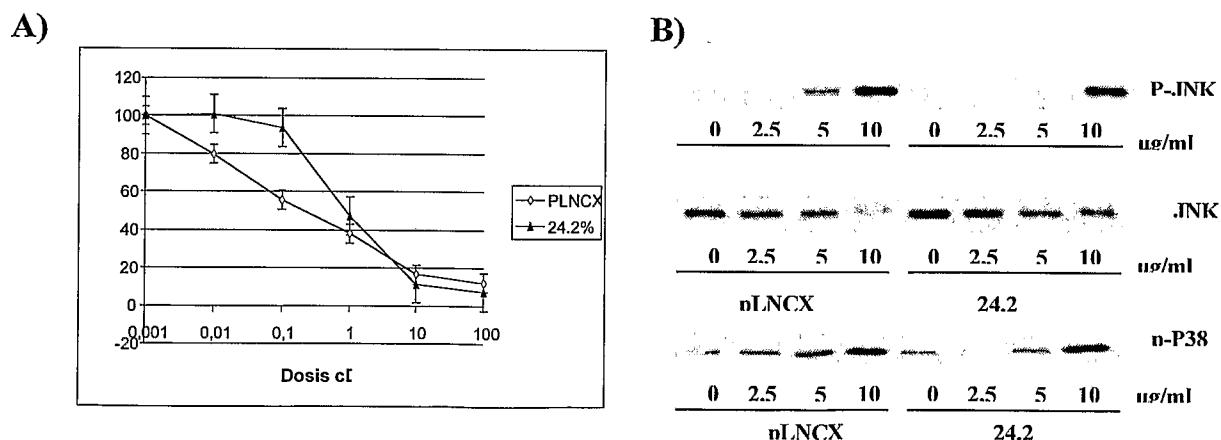
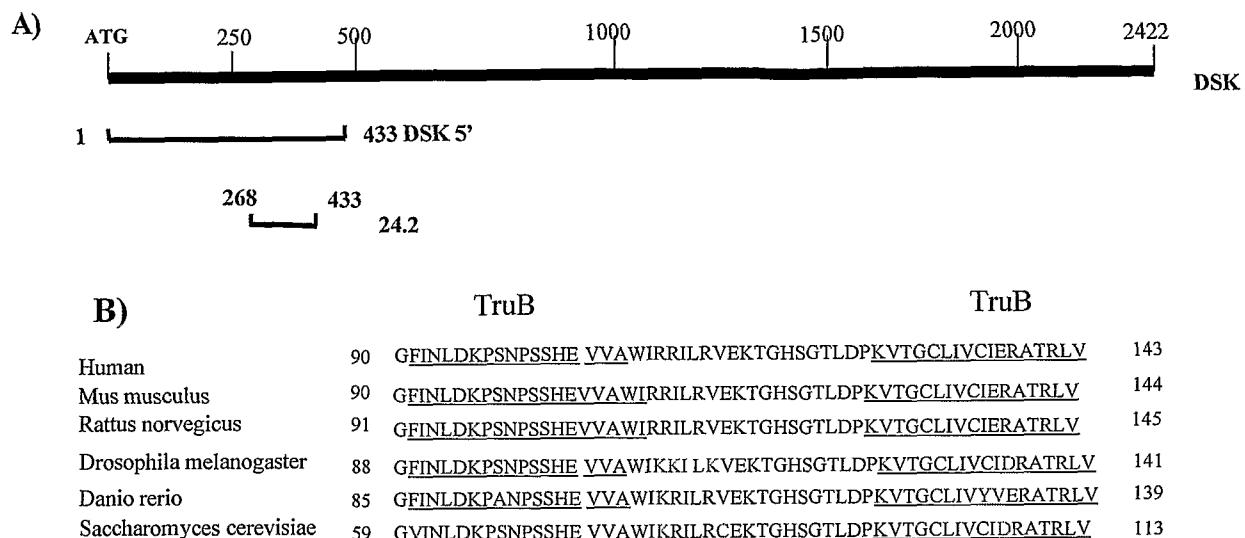
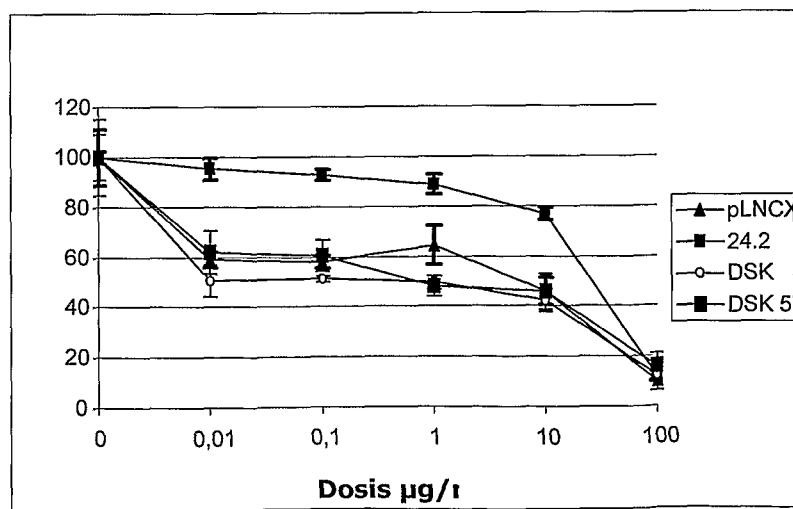
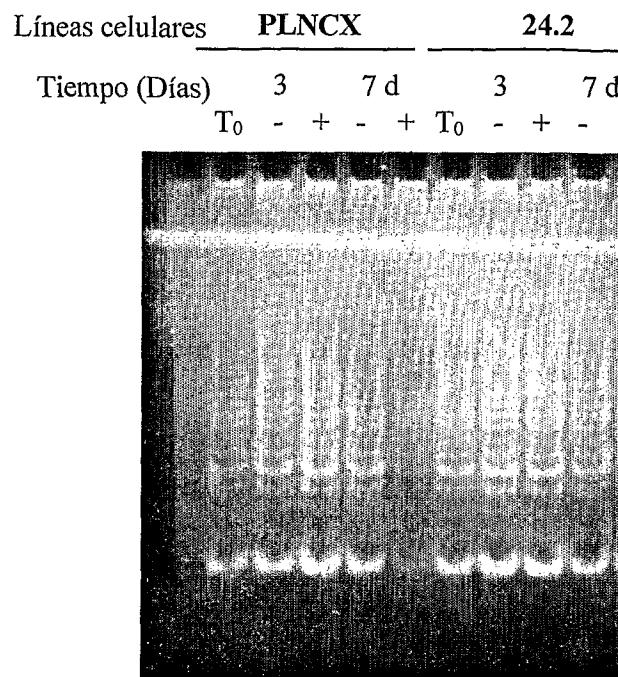
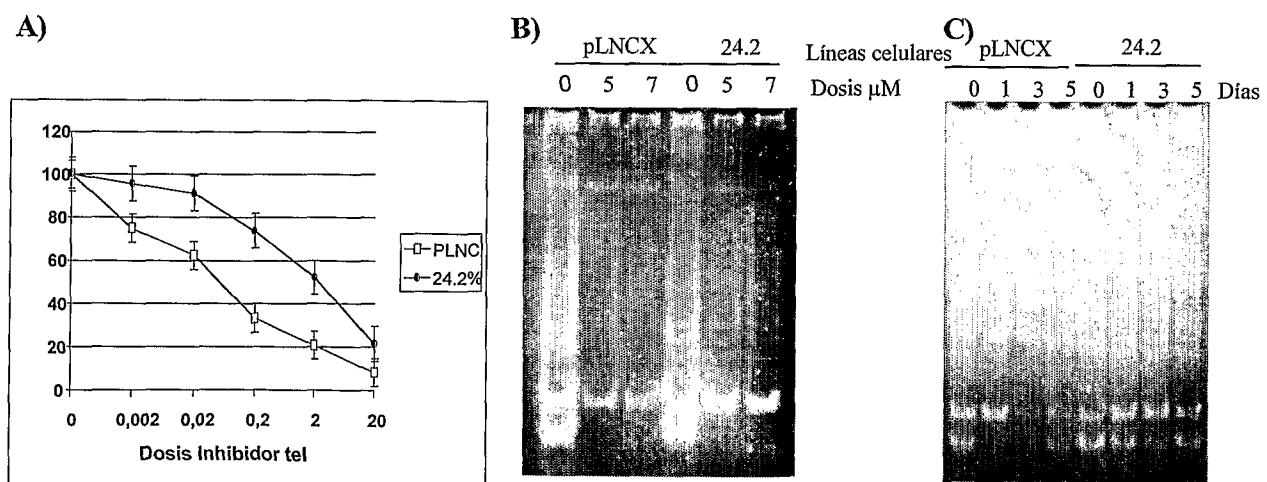


Figura 2

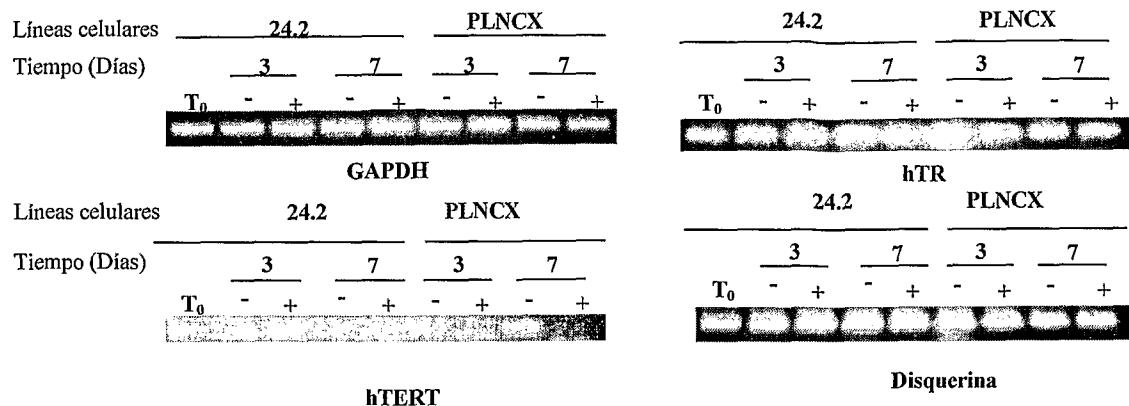
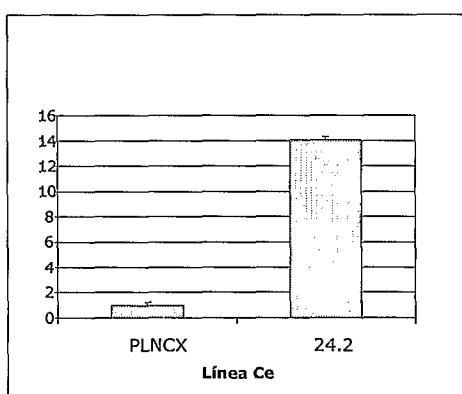
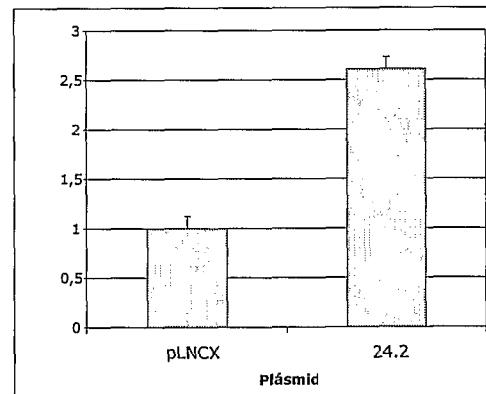
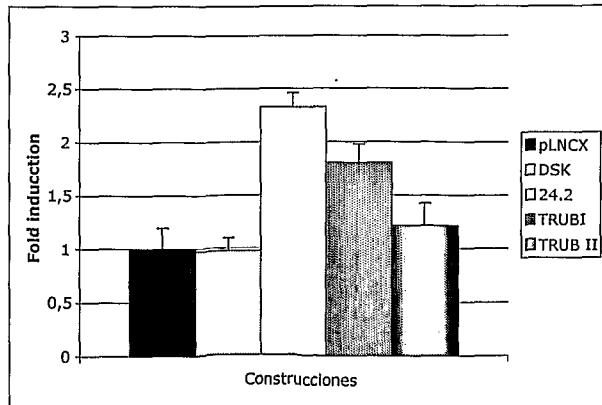
2/11

**Figura 3****Figura 4**

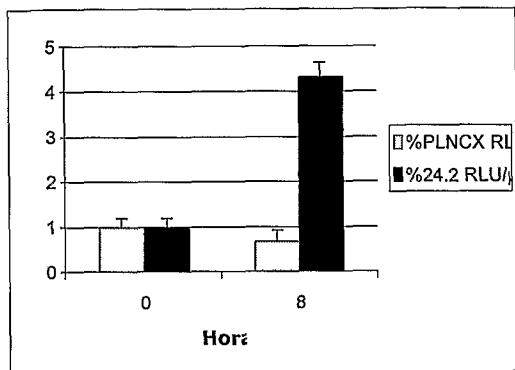
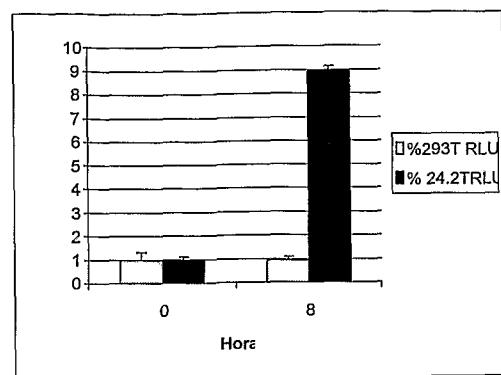
3/11

**Figura 5****Figura 6**

4/11

**Figura 7****A)****B)****C)****Figura 8**

5/11

A)**B)****Figura 9**

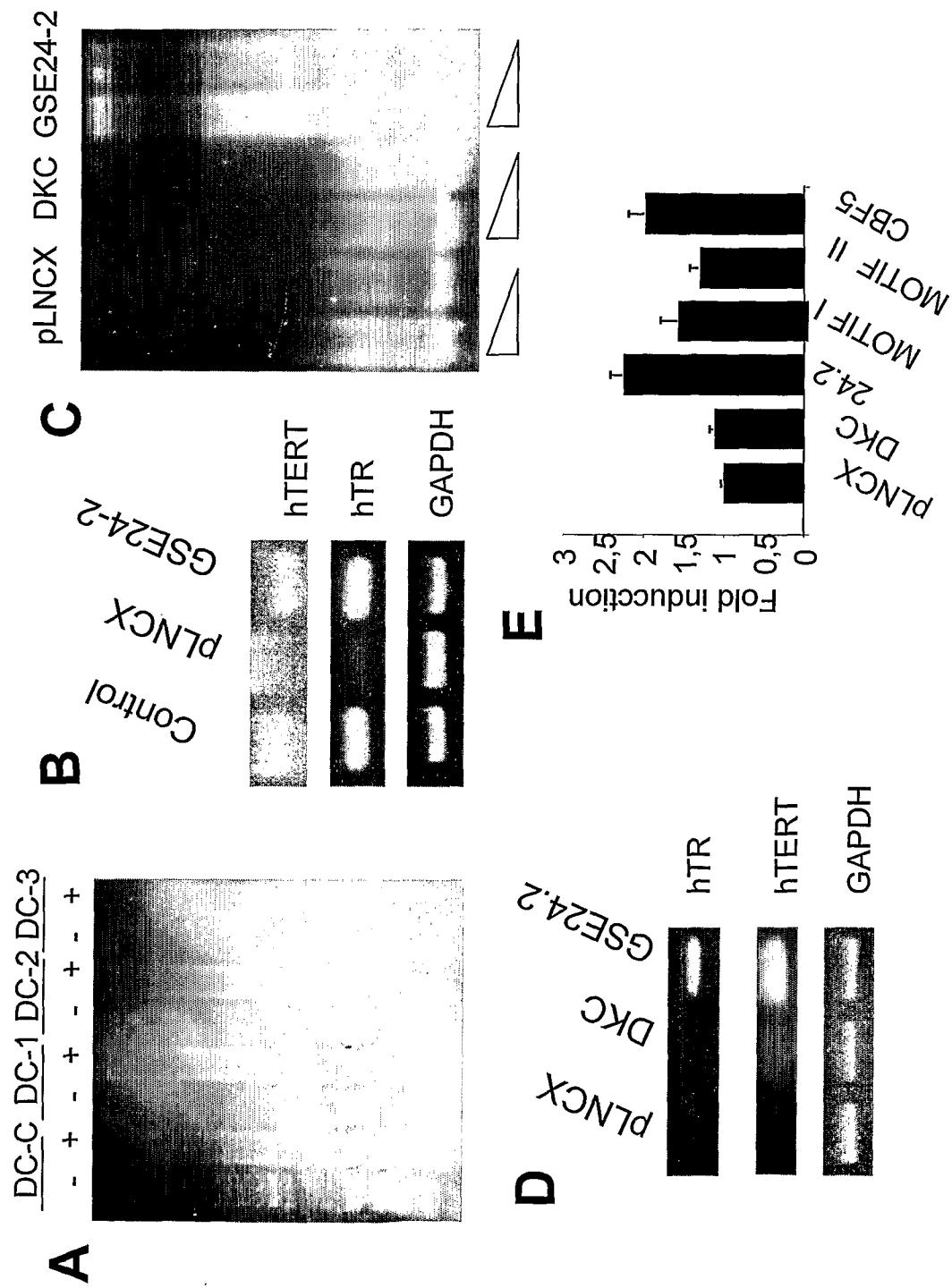


Figura 10

7/11

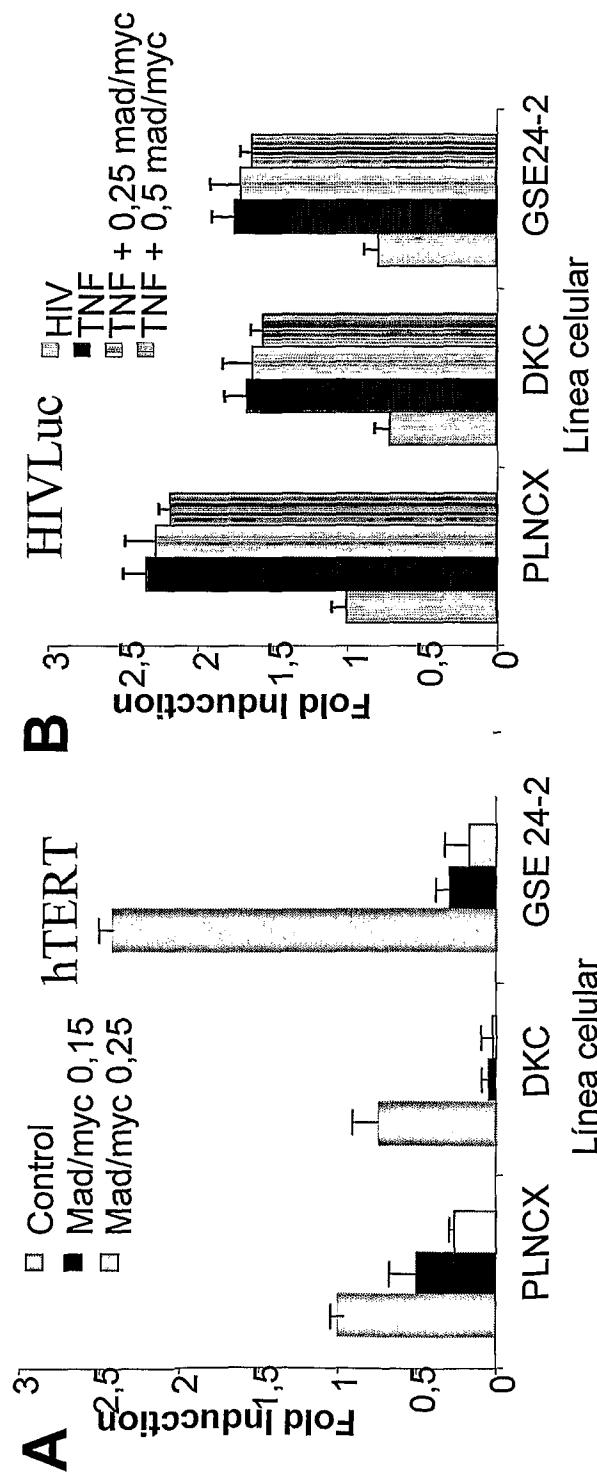


Figura 11

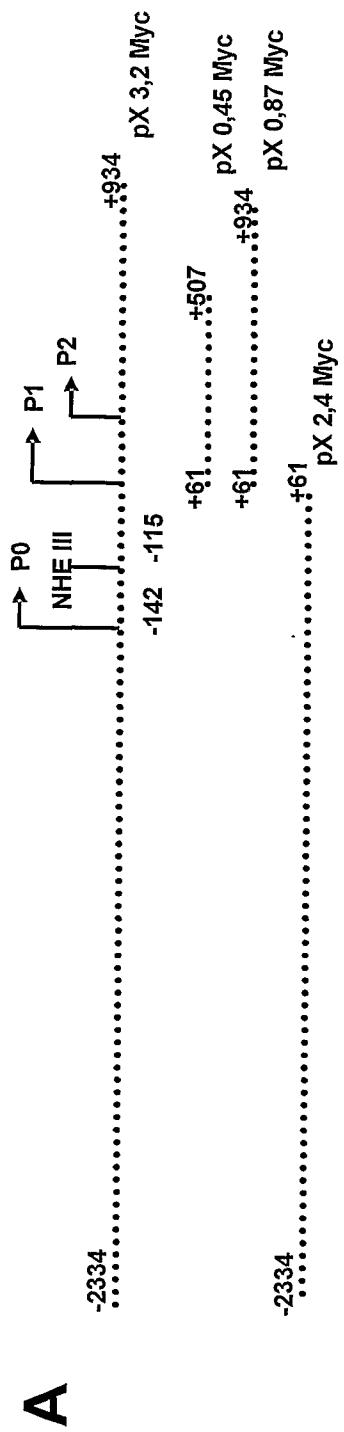
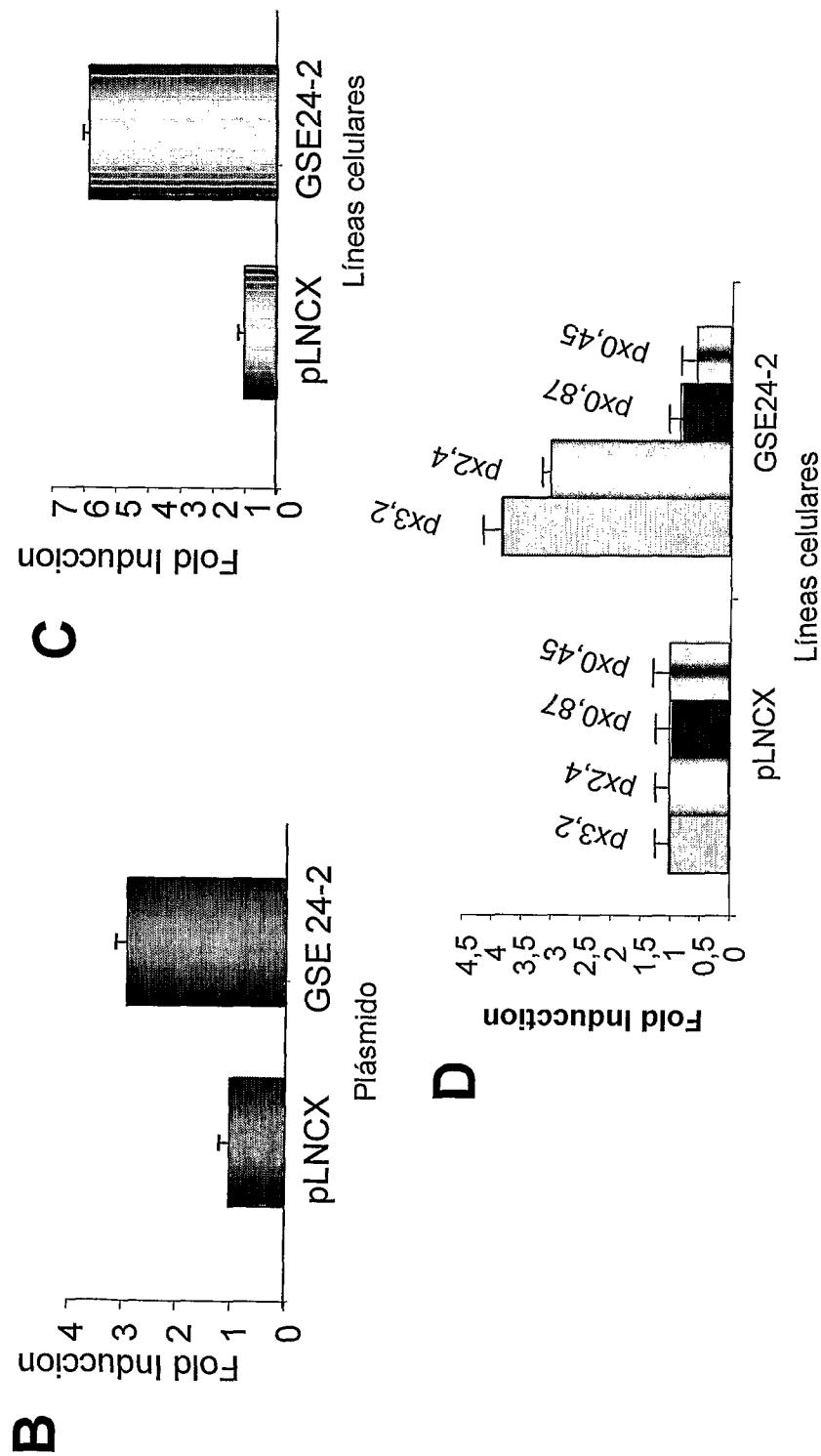
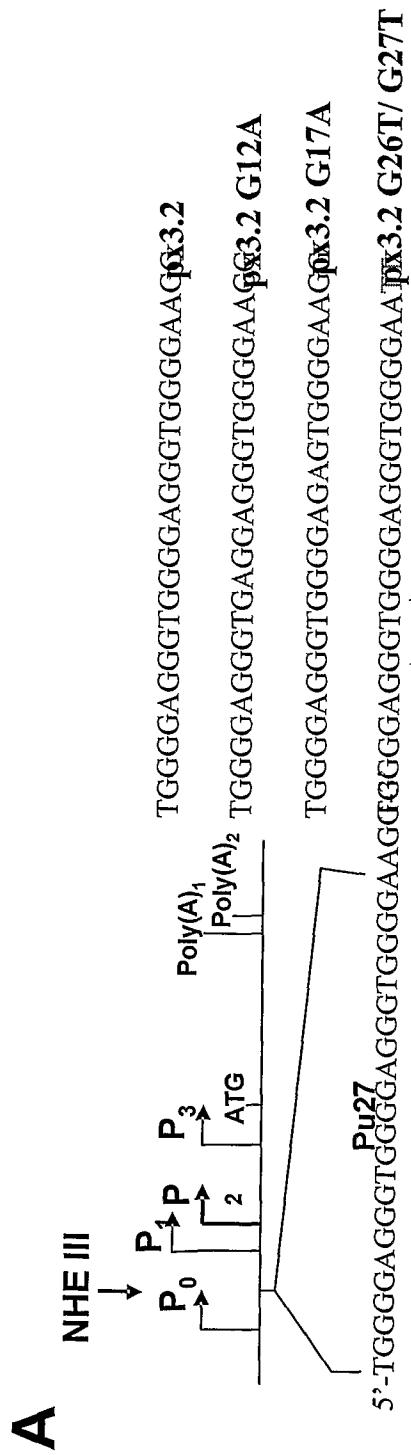
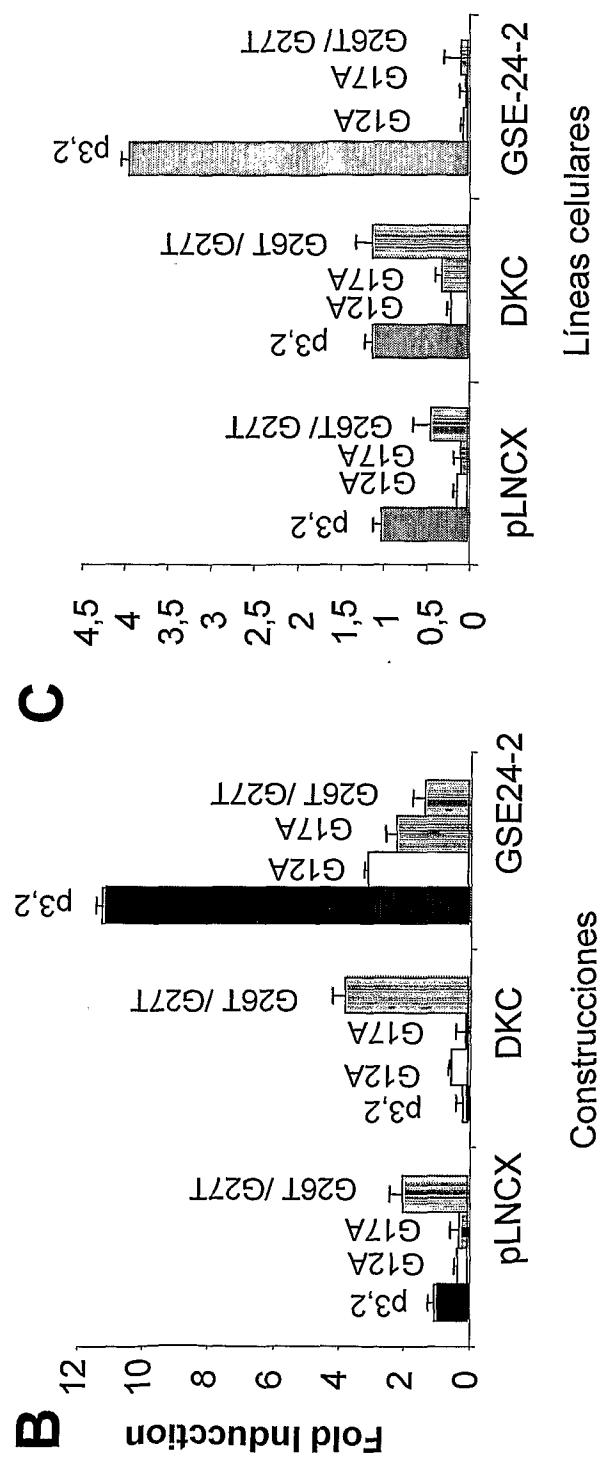


Figura 12

**Figura 12**

**Figura 13**

**Figura 13**

Listado de Secuencias

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

<120> Secuencia GSE 24.2

<130> GSE 24.2

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 165

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

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

<223> Secuencia GSE 24.2

<400> 1

gg 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

48

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

96

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

144

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

165

<210> 2

<211> 55

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val Thr Gly Cys Leu Ile Val Cys Ile Glu
35 40 45

Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys
50 55

```
<210> 3
<211> 496
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(495)

<400> 3
atg gcg gat gcg gaa gta att att ttg cca aag aaa cat aag aag aaa 48
Met Ala Asp Ala Glu Val Ile Ile Leu Pro Lys Lys His Lys Lys Lys
1 5 10 15

aag gag cggtt aag tca ttg cca gaa gaa gat gta gcc gaa ata caa cac 96
Lys Glu Arg Lys Ser Leu Pro Glu Glu Asp Val Ala Glu Ile Gln His
20 25 30

gct gaa gaa ttt ctt atc aaa cct gaa tcc aaa gtt gct aag ttg gac 144
Ala Glu Glu Phe Leu Ile Lys Pro Glu Ser Lys Val Ala Lys Leu Asp
35 40 45

acg tct cag tgg ccc ctt ttg cta aag aat ttt gat aag ctg aat gta 192
Thr Ser Gln Trp Pro Leu Leu Lys Asn Phe Asp Lys Leu Asn Val
50 55 60

agg aca aca cac tat aca cct ctt gca tgt ggt tca aat cct ctg aag 240
Arg Thr Thr His Tyr Thr Pro Leu Ala Cys Gly Ser Asn Pro Leu Lys
65 70 75 80

aga gag att ggg gac tat atc agg aca ggt ttc att aat ctt gac aag 288
Arg Glu Ile Gly Asp Tyr Ile Arg Thr Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys
85 90 95

ccc tct aac ccc tct tcc cat gag gtg gta gcc tgg att cga cgg ata 336
Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val Val Ala Trp Ile Arg Arg Ile
100 105 110

ctt cgg gtg gag aag aca ggg cac agt ggt act ctg gat ccc aag gtg 384
Leu Arg Val Glu Lys Thr Gly His Ser Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val
115 120 125

act ggt tgt tta atc gtg tgc ata gaa cga gcc act cgc ttg gtg aag 432
Thr Gly Cys Leu Ile Val Cys Ile Glu Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys
130 135 140

tca caa cag agt gca ggc aaa gag tat gtg ggg att gtc cgg ctg cac 480
Ser Gln Gln Ser Ala Gly Lys Glu Tyr Val Gly Ile Val Arg Leu His
145 150 155 160

aat gct att gaa ggg g
Asn Ala Ile Glu Gly
165

```

<210> 4
<211> 165
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Asp Ala Glu Val Ile Ile Leu Pro Lys Lys His Lys Lys Lys
1 5 10 15

Lys Glu Arg Lys Ser Leu Pro Glu Glu Asp Val Ala Glu Ile Gln His
20 25 30

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 Lys Asn Phe Asp Lys Leu Asn Val
50 55 60

Arg Thr Thr His Tyr Thr Pro Leu Ala Cys Gly Ser Asn Pro Leu Lys
65 70 75 80

Arg Glu Ile Gly Asp Tyr Ile Arg Thr Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys
85 90 95

Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val Val Ala Trp Ile Arg Arg Ile
100 105 110

Leu Arg Val Glu Lys Thr Gly His Ser Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val
115 120 125

Thr Gly Cys Leu Ile Val Cys Ile Glu Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys
130 135 140

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

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Oligo A para hTERT

<400> 5

cggaagagtg tctggagcaa 20

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Oligo B para hTERT

<400> 6
ggatgaagcg gagtcgga 18

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Oligo C para hTR

<400> 7
tctaacccta actgagaagg gcgtag 26

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Oligo D para hTR

<400> 8
gtttgctcta gaatgaacgg tggaag 26

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Oligo E para disquerina

<400> 9
atggcggatg cggaagtaat t 21

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Oligo F para disquerina

<400> 10

ccccttcaat agcattgtgc 20

<210> 11
<211> 54
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(54)

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(50)
<223> Dominio TrubI

<400> 11
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

gta gcc 54
Val Ala

<210> 12
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val
1 5 10 15

Val Ala

<210> 13
<211> 75
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(75)

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(50)
<223> Dominio Trub II

<400> 13
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

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

<210> 14

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

Ile Glu Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys
20 25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2006/070152

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, EMBL, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9954449 A2 (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES OFFENTLICHEN RECHTS) 28.10.1999, the whole document.	1-33
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, pages 50-58, the whole document.	1-33
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, n° 4, pages 1254-1260, the whole document.	1-33

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05.February.2007 (05.02.2007)

Date of mailing of the international search report

(12-02-2007)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. +34 91 3495304

Authorized officer

M. Novoa Sanjurjo

Telephone No. +34 91 349 84 66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 29-33
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

These claims are subject to the provisions of PCT Rule 67.1(iv), concerning methods for treatment by surgery or therapy (PCT Rule 39.1(iv)). The search was based on the effects of the compound or composition.

2. Claims Nos.: 2b), c), d) and 9b), c), d); 26, 27
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 2b), c), d) and 9b), c) and d) do not clearly define the subject matter of the invention and do not specify the exact technical features of the hypothetical sequences. The search was limited to the sequences SEQ ID NOs: 1, 2, 11, 12, 13 and 14.
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2006/070152

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9954449 A	28.10.1999	DE 19817118 C AU 4358699 A	28.10.1999 08.11.1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2006/070152

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/12 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2006/070152

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, EMBL, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 9954449 A2 (DEUTSCHE KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS) 28.10.1999, todo el documento.	1-33
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.	1-33
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.	1-33

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

05.Febrero.2007 (05.02.2007)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

12 febrero 2007 (12-02-2007)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado

M. Novoa Sanjurjo

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Nº de teléfono +34 91 349 84 66

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2006/070152

Recuadro II	Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)
-------------	--

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones n°s: 29-33
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
Dichas reivindicaciones están afectadas por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) PCT, sobre métodos de tratamiento quirúrgico o terapéutico Regla 39.1.iv PCT. La búsqueda se ha realizado sobre los efectos del compuesto/composición.
2. Las reivindicaciones n°s: 2.b),c),d) y 9.b)c)d) ; 26, 27
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
En las reivindicaciones 2.b)c)d) y 9.b)c)d) no está claramente definido el objeto de la invención y no se aportan las características técnicas exactas de las hipotéticas secuencias. La búsqueda se ha limitado a las secuencias SEQ ID 1,2,11,12,13 y 14.
3. Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III	Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)
--------------	--

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s.

Indicación en cuanto a la protesta	<input type="checkbox"/> Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta. <input type="checkbox"/> Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello. <input type="checkbox"/> El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.
------------------------------------	--

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2006/070152

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9954449 A	28.10.1999	DE 19817118 C AU 4358699 A	28.10.1999 08.11.1999

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2006/070152

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 9/12 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)