

(11) Número de Publicação: **PT 1947175 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 9/12 (2007.10) **A61K 38/17** (2007.10)
A61P 43/00 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2006.10.11**

(30) Prioridade(s): **2005.10.14 ES 200502511**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.07.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.05.26**
170/2010

(73) Titular(es):

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS**
CALLE SERRANO, 117 E-28006 MADRID ES
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID ES
UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA ES

(72) Inventor(es):

ROSARIO PERONA ABELLÓN ES
ROSARIO MACHADO PINILLA ES
LEANDRO SASTRE GARZÓN ES
ISABEL SÁNCHEZ PÉREZ ES
JOSÉ RAMÓN MURGUIA IBÁÑEZ ES

(74) Mandatário:

JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES
AV. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 131, 7º - C 1700-173
LISBOA PT

(54) Epígrafe: **SEQUÊNCIA DE NUCLEÓTIDOS E DE PÉPTIDOS GSE 24.2 DA DISQUERINA, QUE
PODEM INDUZIR A ACTIVIDADE DA TELOMERASE, MÉTODO PARA OS OBTER, COMPOSIÇÕES
TERAPÊUTICAS E SUAS APLICAÇÕES**

(57) Resumo:

RESUMO

**SEQUÊNCIA DE NUCLEÓTIDOS E DE PÉPTIDOS GSE 24.2 DA DISQUERINA,
QUE PODEM INDUZIR A ACTIVIDADE DA TELOMERASE, MÉTODO PARA OS
OBTER, COMPOSIÇÕES TERAPÊUTICAS E SUAS APLICAÇÕES**

A invenção refere-se a um composto que induz ou activa a actividade de telomerase, baseado na sequência de nucleótidos do fragmento GSE 24.2 de disquerina ou a sequência da proteína ou péptido codificada pela referida sequência de nucleótidos. A invenção também se refere a vectores que contêm a referida sequência e células transformadas com a mesma e composições farmacêuticas que contêm a totalidade dos elementos acima mencionados. A referida composição pode ser utilizada no tratamento de doenças a partir do seguinte grupo: envelhecimento ou aceleração do envelhecimento, doenças neurodegenerativas e disqueratose congénita.

DESCRIÇÃO

SEQUÊNCIA DE NUCLEÓTIDOS E DE PÉPTIDOS GSE 24.2 DA DISQUERINA, QUE PODEM INDUZIR A ACTIVIDADE DA TELOMERASE, MÉTODO PARA OS OBTER, COMPOSIÇÕES TERAPÊUTICAS E SUAS APLICAÇÕES

O sector biotecnológico com aplicações relacionadas com a saúde humana e, mais especificamente, compostos biológicos - sequências de nucleótidos, péptidos e células humanas transformadas - com aplicações terapêuticas para seres humanos.

ESTADO DA TÉCNICA

A disquerina (Figura 1) é uma proteína nucleolar de 58-kD que está associada à caixa H/ACA nos SnoRNAs, presentes nas partículas de ribonucleoproteína pequena encarregue de pseudouridinizar o RNA ribossómico. Por outro lado, é também um componente do complexo da telomerase, que é responsável por manter repetições teloméricas nas extremidades do cromossoma. A forma ligada ao cromossoma X de disqueratose congénita (Marrone *et al.*, 2003; Besseler *et al.*, 2004) é uma síndrome congénita que provoca a falência de medula óssea e está associada com maior susceptibilidade para o cancro. Esta forma de disqueratose é provocada por uma mutação específica do gene DKC1, que codifica a disquerina. Existe outra disqueratose congénita autossómica dominante; Neste caso, a doença está associada a mutações na componente de RNA da telomerase (hTR) (Heiss *et al.*, 1998). Nos fibroblastos e linfoblastos dos doentes com disqueratose congénita existe uma perda da actividade de telomerase e os telómeros são mais

curtos do que os das células não afectadas pela doença (Siriniavin *et al.*, 1975; Trowbridge *et al.*, 1977). Nas células dos doentes com a forma de disqueratose congénita ligada ao cromossoma X, os defeitos da telomerase foram superados através da expressão de hTERT ectopicamente (Mitchell *et al.*, 1999). Na disqueratose congénita provocada por mutações em hTR, a única maneira de recuperar a actividade de telomerase é através da re-expressão de hTR (Fu *et al.*, 2003).

Os telómeros são compostos por 500-2 000 repetições da sequência conservada TTAGGG na extremidade 3' do cromossoma e o seu encurtamento através de sucessivas divisões torna-se uma limitação para a capacidade de proliferação da célula. Os telómeros são susceptíveis de sofrer lesão do DNA provocada por agentes exógenos, incluindo a cisplatina. Foi descrito que a cisplatina é capaz de inibir a actividade de telomerase em diferentes linhas celulares (Ishibashi *et al.*, 1998; Burger *et al.*, 1997). Existem várias hipóteses sobre o modo como esta inibição pode ocorrer. Uma possibilidade é a formação de aductos G-Pt-G, típicos da cisplatina, na sequência repetida de telómeros TTAGGG. Alternativamente, as interacções da cisplatina com grupos sulfidrilo essenciais para a subunidade catalítica da transcriptase reversa (hTERT) e pode ser ainda devido à redução na expressão de hTERT (Burger *et al.*, 1997).

DESCRIÇÃO

BREVE DESCRIÇÃO

Um objecto desta invenção é um composto que induz ou activa a actividade de telomerase, de aqui em diante denominado composto activador desta invenção, com base na sequência de nucleótidos do fragmento GSE 24.2 de disquerina ou a proteína ou sequência peptídica codificada pela referida sequência de nucleótidos que é capaz de recuperar a actividade de telomerase no interior das células de um mamífero, preferencialmente humano.

Um objecto particular da invenção é uma sequência de nucleótidos, de aqui em diante sequência do gene GSE 24.2 desta invenção, que permite a expressão de uma proteína ou péptido que induz a actividade de telomerase no interior das células de um mamífero, preferencialmente humano, e que consiste em uma ou várias sequências de nucleótidos de GSE 24.2 que pertencem ao seguinte grupo:

- a) uma sequência de nucleótidos compostas por uma sequência de nucleótidos de GSE 24.2 humana (SEQ ID N°:1),
- b) uma sequência de nucleótidos análogos à sequência de a),
- c) um fragmento de qualquer uma das sequências a) e b), e

d) uma sequência de nucleótidos, construção genética, que compreende qualquer sequência que pertence a a), b) e c).

Como utilizado nesta invenção, o termo "sequência de nucleótidos" refere-se a uma sequência de DNA, cDNA ou mRNA.

Uma forma de realização particular desta invenção é a sequência de nucleótidos da sequência de GSE 24.2 de a) composto da SEQ ID N°:1.

Outra forma de realização particular desta invenção é a sequência de nucleótidos da sequência de GSE 24.2 de b) composto de SEQ ID N°:11 ou SEQ ID N°:13, que codifica os domínios do péptido Trub I e Trub II, respectivamente (Exemplo 1.7).

Outro objecto particular desta invenção é uma construção genética de GSE 24.2 que compreende a sequência de nucleótidos de GSE 24.2.

Outro objecto particular desta invenção é um vector de expressão de GSE 24.2 que compreende uma sequência de nucleótidos de GSE 24.2 ou uma construção genética de GSE 24.2, descrita nesta invenção, e que permite a expressão de uma proteína ou péptido capaz de recuperar a actividade de telomerase no interior das células de mamíferos, preferencialmente humanos. Um exemplo desta forma de realização particular é o vector de expressão pLNCX 24.2 da invenção (ver exemplos).

Adicionalmente, outro objecto particular da invenção é uma proteína ou péptido, de aqui em diante denominada proteína GSE 24.2 desta invenção, que exibe actividade destinada a recuperar telomerase no interior das células de um mamífero, preferencialmente humano, e que compreende uma ou várias sequências de aminoácidos que pertencem ao seguinte grupo:

- a) uma sequência de aminoácidos composta por uma sequência de aminoácidos de GSE 24.2 humana (SEQ ID N°:2),
- b) uma sequência de aminoácidos análogos à sequência de a),
- c) um fragmento de qualquer uma das sequências de a) e b), e
- d) uma sequência de aminoácidos que compreende qualquer sequência que pertence a a), b) e c).

Outra forma de realização particular desta invenção é uma proteína cuja sequência de aminoácidos de a) é composta de SEQ ID N°:2.

Outra forma de realização particular desta invenção é uma proteína cuja sequência de aminoácidos de c), cujo fragmento é composto por SEQ ID N°:12 ou SEQ ID N°:14.

Por outro lado, outro objecto adicional desta invenção são células geneticamente modificadas, sejam eucarióticas - preferencialmente humanas - ou procarióticas, de aqui em

diante denominadas células de GSE 24.2 da invenção, que compreende a sequência de nucleótidos, construção e vector de expressão de GSE 24.2 da invenção e em que o péptido ou proteína GSE 24.2 da invenção pode ser adequadamente expresso.

Por isso, outro objecto da invenção é a utilização do composto activador de GSE 24.2 desta invenção na preparação de um fármaco ou composição de farmacêutica para o tratamento de uma doença provocada por uma alteração de, preferencialmente uma redução na actividade de telomerase, pertencendo, para efeitos ilustrativos e sem esta limitação do âmbito da invenção, ao seguinte grupo: envelhecimento ou aceleração do envelhecimento, doenças neurodegenerativas e disqueratose congénita.

Outro objecto desta invenção é uma composição farmacêutica ou fármaco para o tratamento de doenças, distúrbios ou patologias que se desenvolvem com alterações da actividade de telomerase, preferencialmente uma redução na actividade, de aqui em diante composição farmacêutica desta invenção, que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto ou agente capaz de recuperar a actividade de telomerase juntamente com, opcionalmente, um ou mais adjuvantes farmaceuticamente aceitáveis e/ou veículos, e que é capaz de estimular a criação e manutenção da actividade de telomerase.

Outro objecto particular desta invenção é uma composição farmacêutica da invenção em que o composto ou agente capaz de recuperar a actividade de telomerase pertence ao seguinte grupo: sequência, construção genética ou vector de GSE 24.2

que permite a expressão de uma proteína ou péptido capaz de recuperar a actividade de telomerase no interior das células de um mamífero, preferencialmente humano.

Uma forma de realização particular da invenção é uma composição farmacêutica da invenção em que o composto ou agente capaz de recuperar a actividade de telomerase é uma ou várias sequências de GSE 24.2 que pertencem ao seguinte grupo:

- a) uma sequência de nucleótidos composta por uma sequência de nucleótidos de GSE 24.2 humana (SEQ ID N°:1),
- b) uma sequência de nucleótidos análoga à sequência de a),
- c) um fragmento de qualquer uma das sequências de a) e b), e
- d) uma sequência de nucleótidos, construção genética, que compreende qualquer sequência que pertence a a), b) e c).

Outra forma de realização particular desta invenção é a composição farmacêutica da invenção em que a sequência de nucleótidos de a) é a sequência de nucleótidos de GSE 24.2 (SEQ ID N°:1).

Outra forma de realização particular desta invenção é a composição farmacêutica da invenção em que a sequência de

nucleótidos de c) é a sequência de nucleótidos SEQ ID N°:11 ou SEQ ID N°: 13.

Outra forma de realização particular desta invenção é uma composição farmacêutica da invenção em que a sequência de nucleótidos é um vector, preferencialmente o vector pLNCX 24.2.

Outro objecto particular desta invenção é uma composição farmacêutica da invenção em que o composto ou agente capaz de recuperar a actividade de telomerase é uma proteína ou um péptido codificado pela sequência de GSE 24.2, construção genética ou vector da invenção.

Uma forma de realização particular da invenção é uma composição farmacêutica da invenção em que a proteína ou péptido de GSE 24.2 pertence ao seguinte grupo:

- a) uma sequência de aminoácidos composta por uma sequência de aminoácidos de GSE 24.2 humana (SEQ ID N°:2),
- b) uma sequência de aminoácidos análoga à sequência de a),
- c) um fragmento de qualquer uma das sequências de a) e b), e
- d) uma sequência de aminoácidos que comprehende qualquer sequência que pertence a a), b) e c).

Outra forma de realização particular desta invenção é a composição farmacêutica da invenção em que a sequência de aminoácidos de a) é a sequência SEQ ID N°:2.

Outra forma de realização particular desta invenção é uma composição farmacêutica da invenção em que a sequência de aminoácidos de c) é uma sequência SEQ ID N°:12 ou SEQ ID N°:14.

Outro objecto particular desta invenção é uma composição farmacêutica da invenção em que o composto de activação da telomerase ou agente é uma célula, preferencialmente humana, transformada pela sequência, construção ou vector de GSE 24.2.

Outro objecto da invenção é a utilização da composição farmacêutica da invenção, de aqui em diante designada utilização da composição farmacêutica da invenção, num método de tratamento ou profilaxia para um mamífero, preferencialmente um ser humano, afectado por uma doença, distúrbio ou patologia que desenvolve com alterações da actividade de telomerase, consistindo na administração da referida composição terapêutica numa dose adequada que permite a recuperação da actividade de telomerase no interior das suas células.

Outro objecto particular desta invenção é a utilização da composição farmacêutica da invenção num método de tratamento para uma doença ou distúrbio que se desenvolve com alterações da actividade da telomerase e que afecta seres humanos, que pertencem, para objectivos ilustrativos e sem esta limitação do âmbito da invenção, ao seguinte grupo:

envelhecimento ou aceleração de envelhecimento, doenças neurodegenerativas, disqueratose congénita, Cri du chat, ataxia telangiectasia, Síndrome de Quebra de Nijmegen, Síndrome de Bloom, Síndrome de Werner, anemia de Fanconi, colite ulcerosa, envelhecimento vascular, aterosclerose e cancro.

Outra forma de realização particular desta invenção é a utilização da composição farmacêutica da invenção num método de tratamento para uma doença neurodegenerativa que pertence ao seguinte grupo: doença de Alzheimer, doença de Parkinson, ataxia cerebelar e degeneração da medula espinal.

Outra forma de realização particular desta invenção é a utilização da composição farmacêutica da invenção num método de tratamento para uma forma de disqueratose congénita ligada ao cromossoma X

Outra forma de realização particular desta invenção é a utilização da composição farmacêutica da invenção num método de tratamento para disqueratose congénita autossómica dominante.

DESCRICAÇÃO DETALHADA

Esta invenção aborda o problema de proporcionar novas ferramentas terapêuticas para o tratamento de doenças que se desenvolvem com alterações da actividade de telomerase e, mais especificamente, disqueratose congénita.

Esta invenção baseia-se no facto de os inventores terem provado que a expressão de um fragmento de cDNA de

disquerina, o fragmento GSE 24.2 (SEQ ID N°:1), que expressa uma sequência interna da disquerina (SEQ ID N°:2), compensa os defeitos na actividade de telomerase nas células de doentes com disqueratose congénita e em células VA13 (Exemplo 3). Mais especificamente, quando as células de doentes com disqueratose congénita e células VA13 são transfectadas com a sequência de GSE 24.2, além de recuperar a actividade de telomerase, há um aumento nos níveis de hTERT e de hTR. De facto, observou-se que a expressão do péptido GSE 24.2 aumenta a actividade da linha de base do promotor da telomerase e, após tratamento com cisplatina, as células 24.2 também possuem maior actividade. Curiosamente, Collins *et al.* tinham previamente descrito que, nas células destes mesmos doentes, a actividade de telomerase foi apenas recuperada através da sobre-expressão do gene hTERT, e não pela expressão da disquerina, uma proteína que está mutada nestes doentes (Mitchell *et al.*, 1999).

Foi descrito na literatura que as mutações na disquerina podem afectar a acumulação do RNA da telomerase (Mochizuki *et al.*, 2004); por isso, os efeitos provocados pelo péptido GSE 24.2 podem ser devidos a um aumento nos níveis de hTERT e a uma maior estabilização de hTR, uma vez que o aumento nos níveis de hTERT pode estabilizar a formação do complexo da telomerase, evitando desse modo a degradação de hTR. A este respeito, nesta invenção foi observado que, em células transfectadas com o péptido GSE 24.2, o promotor da proteína hTERT, mas não hTR, é activado constitutivamente de um modo dependente da expressão de c-myc, mais especificamente através da sua ligação à região NHEIII, localizada na região do promotor rica em purina P1 (Pu27, ver Exemplo 2), permitindo desse modo uma alteração na conformação secundária

do DNA, de modo a que os factores de transcrição possam ter acesso ao DNA. Qualquer alteração na sequência desta região que modifica a sua estrutura secundária, altera a actividade do péptido GSE 24.2.

De um modo semelhante, uma sequência equivalente ao péptido GSE 24.2 humano (CBF5 de levedura, *S. cerevisiae* CBF5) apresenta uma actividade semelhante na activação de hTERT (resultados não apresentados), indicando um grau mais elevado de conservação funcional na actividade deste domínio de disquerina, definindo desse modo e ilustrando as múltiplas possibilidades de elementos ou sequências homólogas a GSE 24.2 que podem ser utilizadas nesta invenção.

Além disso, este péptido de GSE 24.2 proporciona linhas celulares humanas com uma capacidade de sobrevivência à cisplatina (Exemplo 1). A linha celular 24.2 aumenta a viabilidade face ao inibidor da telomerase 1. Este inibidor possui um mecanismo de acção que é semelhante à cisplatina, formando G-quadruplexos nos telómeros e reduzindo a actividade de telomerase (Sun *et al.*, 1997). Foram também descritas sequências que formam G-quadruplexos num intrão hTERT; por isso, é possível que este inibidor também reduza os níveis de hTERT, reduzindo também desse modo a actividade de telomerase (Lemateleur *et al.*, 2004).

Tendo em conta que ambos a cisplatina e o inibidor de telomerase estabilizam a formação de G-quadruplexos (Redon *et al.*, 2001), o que pode, por sua vez bloquear a actividade de telomerase, o péptido de GSE 24.2 pode reduzir a eficácia destes inibidores prevenindo ou reduzindo a formação destes G-quadruplexos, ou talvez seja capaz de aumentar os níveis de

hTERT, aumentando desse modo a actividade de telomerase, através de outro mecanismo.

Os elementos de supressão de genes (GSEs) são fragmentos de cDNA biologicamente activos que codificam péptidos ou inibidores de RNA anti-sentido inibidores e actuam de um modo dominante na expressão genética em células de mamífero. GSE 24.2 é um fragmento de 165-pb que compreende os nucleótidos 268 a 433, e corresponde a uma sequência formada por dois domínios altamente conservados em diferentes espécies, denominados TRUB (Figura 2b, ver SEQ ID N°:12 e 14, respectivamente). Estes domínios parecem possuir uma função importante na pseudouridinização de snoRNAs (Zucchini *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2003) e, o que é mais surpreendente, sequências de nucleótidos preparadas com esses domínios, clonadas separadamente, aumentaram a actividade da linha de base do promotor da telomerase como inicialmente descrito, a sequência inteira de 55 aminoácidos (Exemplo 1.7, Figura 8c). É interessante notar que esta actividade, que induz resistência à cisplatina e compensa os defeitos na actividade da telomerase, está apenas localizada na região da disquerina encontrada nesta sequência de GSE 24.2, uma vez que a proteína completa (ver SEQ ID 4) ou o fragmento aminoterminal não possuem qualquer actividade. Finalmente, deve salientar-se que estes resultados abrem novas perspectivas terapêuticas para distúrbios ou doenças humanas provocadas pelas alterações do complexo da telomerase (encurtamento de telómeros e doenças com envelhecimento celular ou células estaminais), de modo que o elemento GSE 24.2 ou seus derivados possam ser utilizados como fármacos para recuperar a actividade de telomerase. Para além disso, existem síndromes diferentes para além de DC, que incluem um

encurtamento de telómeros entre os fenótipos celulares, e também falências da medula óssea, imunossupressão e predisposição para o cancro. O gene da telomerase não é afectado pelas mutações em qualquer um deles, mas a substituição do telómero e a actividade da telomerase são.

Por isso, um objecto desta invenção é um composto que induz ou activa a actividade de telomerase, de aqui em diante composto activador desta invenção, com base na sequência de nucleótidos do fragmento GSE 24.2 da disquerina, ou a proteína ou sequência peptídica codificada pela referida sequência de nucleótidos, que é capaz de recuperar a actividade de telomerase no interior das células de um mamífero, preferencialmente humano.

Como utilizado nesta invenção, o termo "composto que induz ou activa a telomerase" refere-se a uma molécula que aumenta a intensidade ou prolonga a duração da sua actividade biológica. Esta definição inclui, para além disso, aqueles compostos ou moléculas que permitem a expressão de uma sequência de nucleótidos que codifica uma proteína GSE 24.2. Um composto activador pode ser composto por um péptido, uma proteína ou uma sequência de nucleótidos.

Assim, um objecto particular da invenção é uma sequência de nucleótidos, de aqui em diante sequência do gene GSE 24.2 desta invenção, que permite a expressão de uma proteína ou péptido que induz a recuperação da actividade de telomerase no interior das células de um mamífero, preferencialmente humano, e que é composta por uma ou várias sequências de nucleótidos de GSE 24.2 que pertencem ao seguinte grupo:

- a) uma sequência de nucleótidos composta por uma sequência de nucleótidos de GSE 24.2 humana (SEQ ID N°:1),
- b) uma sequência de nucleótidos análoga à sequência de a),
- c) um fragmento de qualquer uma das sequências de a) e b), e
- d) uma sequência de nucleótidos, construção genética, que compreende qualquer sequência que pertence a a), b) e c).

No sentido utilizado nesta descrição, o termo "análogo" pretende incluir qualquer sequência de nucleótidos que pode ser isolada ou construída com base na sequência apresentada nesta especificação; por exemplo, introduzindo substituições de nucleótidos conservadoras ou não conservadoras, incluindo a inserção de um ou mais nucleótidos, a adição de um ou mais nucleótidos em qualquer das extremidades da molécula ou a deleção de um ou mais nucleótidos em qualquer extremidade ou no interior da sequência, que permite a codificação de um péptido ou proteína capaz de mimetizar a actividade da sequência de GSE 24.2 (SEQ ID N°:2) ou seus fragmentos (SEQ ID N°:12 e SEQ ID N°:14).

A enzima disquerina pertence a uma família da sintase de pseudouridina presente em vários organismos (ver Figura 3B, Mitchel *et al.*, 1999). Com base na informação descrita nesta invenção e de diferentes organismos encontrados na natureza,

um especialista na técnica pode isolar ou construir uma sequência de nucleótidos análoga às descritas nesta invenção.

Em geral, uma sequência de nucleótidos análoga é substancialmente homóloga à sequência de nucleótidos descrita acima. No sentido utilizado nesta descrição, a expressão "substancialmente homóloga" significa que as sequências de nucleótidos em questão possuem um grau de identidade de, pelo menos 30%, preferencialmente de pelo menos 85%, ou mais preferencialmente de pelo menos 95%.

Como utilizado nesta invenção, o termo "sequência de nucleótidos" refere-se a uma sequência de DNA, cDNA ou mRNA.

Uma forma de realização particular desta invenção é a sequência de nucleótidos da sequência de GSE 24.2 de a) composta de SEQ ID N°:1.

Outra forma de realização particular desta invenção é a sequência de nucleótidos da sequência de GSE 24.2 de b) composta por SEQ ID N°:11 ou SEQ ID N°:13, que codifica os domínios dos péptidos Trub I e Trub II, respectivamente (Exemplo 1.7).

A sequência de nucleótidos de GSE 24.2 identificada como d) corresponde a uma construção genética GSE 24.2. Esta construção genética GSE 24.2 da invenção pode também compreender, se necessário e de modo a permitir melhor isolamento, detecção ou secreção para o citoplasma do péptido expresso, uma sequência de nucleótidos que codifica um péptido suscetível de ser utilizado para efeitos de isolamento, detecção ou secreção do referido péptido. Por

isso, outro objecto particular desta invenção é uma construção genética GSE 24.2 que comprehende, adicionalmente à sequência de nucleótidos de GSE 24.2, qualquer outra sequência de nucleótidos que codifica um péptido ou sequência peptídica que permite o isolamento, a detecção ou a secreção para o citoplasma celular do péptido expresso; por exemplo, para objectivos ilustrativos e sem isto limitar o âmbito da invenção, uma sequência de poli-histidina (6xHis), uma sequência peptídica que é reconhecível por um anticorpo monoclonal (por exemplo, para a sua identificação, ou qualquer outro que pode ser utilizado para purificar a proteína de fusão resultante, por cromatografia de imunoafinidade: péptidos tag, tal como c-myc, HA, E-tag) ("Using antibodies: a laboratory manual". Ed. Harlow e David Lane (1999). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Chapter: Tagging proteins. Pp. 347-377).

Uma sequência de nucleótidos de GSE 24.2 e uma construção genética GSE 24.2 descrita acima pode ser obtida por um especialista na técnica utilizando técnicas que são largamente conhecidas no estado da técnica (Sambrook *et al.* "Molecular cloning, a Laboratory Manual". 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989. vols. 1-3). As referidas sequências de nucleótidos podem ser integradas num vector de expressão génica que permite a regulação da sua expressão em condições adequadas no interior das células.

Por isso, outro objecto particular desta invenção é um vector de expressão de GSE 24.2 que comprehende uma sequência de nucleótidos de GSE 24.2 ou uma construção genética de GSE 24.2, descritas nesta invenção, que permite a expressão de uma proteína ou péptido capaz de recuperar a actividade de

telomerase no interior de células de mamíferos, preferencialmente humanos. Um exemplo de uma forma de realização particular é o vector de expressão pLNCX 24.2 da invenção (ver exemplos 1 e 2).

Em geral, um vector de expressão comprehende, adicionalmente à sequência de nucleótidos de GSE 24.2 ou à construção genética de 24.2 descritas na invenção, um promotor que dirige a sua transcrição (por exemplo, *pT7*, *plac*, *ptrc*, *ptac*, *pBAD*, *ret*, etc.), ao qual está ligada operacionalmente, e outras sequências necessárias ou apropriadas que controlam e regulam a referida transcrição e, se aplicável, a tradução do produto de interesse; por exemplo, sinais de iniciação e de terminação de transcrição (*tlt2*, etc.), sinal de poliadenilação, origem de replicação, sequências de ligação ao ribossoma (RBS), sequências que codificam o regulador de transcrição (intensificadores), silenciadores de transcrição, repressores, etc. Exemplos de vectores de expressão apropriados podem ser seleccionados, com base nas condições e necessidades de cada caso específico, entre plasmídeos de expressão, vectores virais (DNA ou RNA), cosmídeos, cromossomas artificiais, etc., que podem conter, adicionalmente, marcadores que podem ser utilizados para seleccionar as células transfectadas ou transformadas com o gene ou genes de interesse. A selecção do vector irá depender da célula hospedeira e do tipo de utilização pretendida. Por isso, de acordo com uma forma de realização particular desta invenção, o referido vector é um plasmídeo ou um vector viral. O referido vector pode ser obtido por métodos convencionais conhecidos pelos especialistas na técnica; de um modo semelhante, podem ser utilizados diferentes métodos largamente conhecidos para a

transformação de microrganismos e células eucarióticas - transformação química, electroporação, microinjecção, etc. -, que são descritos em vários manuais [Sambrook, J., Fritsch, E.F., e Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.].

Adicionalmente, outro objecto particular da invenção é uma proteína ou péptido, de aqui em diante a proteína GSE 24.2 desta invenção, que apresenta actividade direccionalada para recuperar a telomerase no interior das células de um mamífero, preferencialmente humano, e que compreende uma ou várias sequências de aminoácidos que pertencem ao seguinte grupo:

- a) uma sequência de aminoácidos composta pela sequência de aminoácidos de GSE 24.2 humana (SEQ ID N°:2),
- b) uma sequência de aminoácidos análoga à sequência de a),
- c) um fragmento de qualquer uma das sequências de a) e b), e
- d) uma sequência de aminoácidos que compreende qualquer sequência pertencente a), b) e c).

No sentido utilizado nesta descrição, o termo "análogo" pretende incluir qualquer sequência de aminoácidos que pode ser isolada ou construída com base na sequência apresentada nesta especificação; por exemplo, pela introdução de

substituições de aminoácidos conservadoras e não conservadoras, incluindo a inserção de um ou mais aminoácidos, a adição de um ou mais aminoácidos em qualquer uma das extremidades da molécula ou a deleção de um ou mais aminoácidos em qualquer uma das extremidades ou no interior da sequência, e que mimetiza a actividade de recuperação de telomerase da SEQ ID N°:2.

A enzima disquerina pertence a uma família da sintase de pseudouridina presente em vários organismos (ver Figura 3B, Mitchel *et al.*, 1999). Com base na informação descrita nesta invenção e de diferentes organismos presentes na natureza, um especialista na técnica pode isolar ou construir uma sequência de aminoácidos análoga à daqueles descritos nesta invenção.

Em geral, uma sequência de aminoácidos análoga é substancialmente homóloga à sequência de aminoácidos discutida acima. No sentido utilizado nesta descrição, a expressão "substancialmente homóloga" significa que as sequências de aminoácidos em questão possuem um grau de identidade de, pelo menos, 30%, preferencialmente de, pelo menos, 85%, ou mais preferencialmente de, pelo menos, 95%.

Outra forma de realização particular desta invenção é uma proteína cuja sequência de aminoácidos de a) é composta por SEQ ID N°:2.

Outra forma de realização particular desta invenção é uma proteína cuja sequência de aminoácidos de cujo fragmento c), é composto por SEQ ID N°:12 ou SEQ ID N°:14.

Por outro lado, outro objecto adicional desta invenção são células geneticamente modificadas, quer eucarióticas - preferencialmente humanas - ou procarióticas, de aqui em diante células GSE 24.2 da invenção, que compreendem a sequência de nucleótidos de GSE 24.2, construção e vector de expressão da invenção e em que o péptido ou proteína GSE 24.2 da invenção podem ser adequadamente expressos. Estas células podem ser transformadas, infectadas ou transfectadas por meio das referidas sequências de nucleótidos utilizando técnicas de engenharia genética conhecidas dos especialistas na técnica [Sambrook, J., Fritsch, E.F., e Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] e são uma parte desta invenção. Estas células podem ser úteis para a produção de péptidos capazes de recuperar a actividade de telomerase, que podem formar a base para uma composição farmacêutica, para a amplificação recombinante das referidas sequências de nucleótidos, ou podem ser úteis *per se* as células para terapia génica, etc. Uma forma de realização particular seria uma célula humana transformada por estas sequências de GSE 24.2 de nucleótidos, de diferentes estirpes de células, que podem ser utilizadas como células para a regeneração de tecido humano.

Os sistemas de expressão genética podem permitir ou não a integração de material genético novo no genoma da célula hospedeira. Assim, a sequência de nucleótidos de GSE 24.2, construção genética ou vector de expressão podem ser utilizados como um fármaco para proteger as células hospedeiras, preferencialmente células humanas afectadas por uma alteração da actividade da telomerase, num método de terapia génica de tratamento e profilaxia para um ser humano afectado por uma doença que se desenvolve com alterações da

actividade de telomerase. De um modo semelhante, as células GSE 24.2 da invenção podem ser utilizadas como um fármaco para a regeneração ou implantação de tecidos ou células em seres humanos. As ferramentas biofarmacêuticas e processos de terapia génica são suficientemente conhecidos dos especialistas na técnica, de modo a que, com a informação descrita nesta invenção, elas podem ser desenvolvidas com relativa facilidade. Para além disso, as proteínas ou péptidos e as próprias células podem tornar-se biofármacos.

Por isso, outro objecto da invenção é a utilização do composto activador de GSE 24.2 desta invenção na preparação de um fármaco ou composição farmacêutica para o tratamento de uma doença provocada por uma alteração de, preferencialmente uma redução na, actividade de telomerase, pertencendo, para objectivos ilustrativos e sem isto limitar o âmbito da invenção, ao seguinte grupo: envelhecimento ou aceleração do envelhecimento, doenças neurodegenerativas, disqueratose congénita, Cri du chat (CdC, OMIM 123450), ataxia telangiectasia (AT, OMIM 208900), Síndrome da Quebra de Nijmegen (NBS, OMIM 251260), Síndrome de Bloom (BS, OMIM 10900), Síndrome de Werner (WS, OMIM 277900), anemia de Fanconi (FA OMIM 227650), colite ulcerosa, envelhecimento vascular, aterosclerose e cancro.

Estudos realizados em anos recentes evidenciaram a relação potencial entre defeitos na manutenção da actividade de telomerase e outras síndromes com falências da medula óssea. A principal causa de morte para doentes com disqueratose congénita é uma falência de medula óssea provocada por infecções oportunistas ou hemorragias (em 70%

dos casos). Outras causas de morte são doença pulmonar e cancro.

A doença de Cri du chat (CdC, OMIM 123450) é uma síndrome de hereditariedade congénita associada com deleções do braço curto do cromossoma 5 e surge com uma frequência de 1:20 000 e 1:50 000; a frequência em doentes afectados por atraso mental profundo (QI inferior a 20) alcança 1%.

A ataxia telangiectasia (AT, OMIM 208900) é uma síndrome autossómica recessiva provocada por mutações no gene *ATM*. Os problemas surgem entre o segundo e o quinto ano de vida e consiste em degeneração neuronal progressiva (ataxia cerebral), telangiectasia ocular, imunodeficiência, hipogonadismo, instabilidade genómica, envelhecimento prematuro, diabetes mellitus moderado, baixa altura e predisposição para o cancro (linfomas e leucemias).

A Síndrome da Quebra de Nijmegen (NBS, OMIM 251260) é uma doença autossómica recessiva provocada por mutações ou perdas do gene *Nibrin*. A síndrome é caracterizada por microcefalia, aspecto facial destrutivo, crescimento retardado, atraso mental progressivo e forte predisposição para linfomas e infecções do tracto respiratório.

A Síndrome de Bloom (BS, OMIM 210900) e Síndrome de Werner (WS, OMIM 277900). BS é uma síndrome autossómica recessiva induzida por mutações no gene *recQL*, uma proteína com actividade de helicase. WS é também uma síndrome autossómica recessiva provocada pelas mutações na helicase *recQL2*. Ambas as doenças são caracterizadas por envelhecimento acelerado e os sintomas incluem aterosclerose,

osteoporose, diabetes mellitus, cataratas binoculares e predisposição para alguns tipos de tumores, particularmente sarcomas (WS) e leucemias (BS).

Anemia de Fanconi (FA, OMIM 227650) é uma doença autossómica recessiva caracterizada por um maior número de defeitos no desenvolvimento, falências da medula óssea e um aumento de mil vezes na incidência de leucemias mielóides e uma forte predisposição para desenvolver tumores sólidos. A frequência do desenvolvimento da doença entre portadores da mutação é de 1:100.

A colite ulcerosa é uma doença que afecta um em 100 Espanhóis. Crê-se que tenha uma origem auto-imune, em que intervêm factores genéticos e ambientais. A colite ulcerosa afecta o intestino pequeno e é caracterizada por inflamação crónica da folha colónica, com consequente ulceração, rebentamento na barreira mucosa e atrofia da membrana mucosa do cólon. O risco de cancro aumenta com a duração da doença e ocorre em numerosos órgãos, tais como o cólon e linfomas.

Por outro lado, as consequências da senescência celular incluem aterosclerose. Por um lado, a disfunção telomérica está presente nos vasos sanguíneos com placas ateroscleróticas. A reactivação da telomerase em células vasculares progenitoras aumenta a capacidade de divisão das células e a vasculogénese. Uma perda destas células progenitoras contribui para uma disfunção vascular importante; por isso, uma terapia anti-senescência iria proporcionar uma nova abordagem para remediar os efeitos vasculares do envelhecimento e da aterosclerose.

Por último, em relação a outras aplicações potenciais do elemento da invenção GSE 24.4, deve notar-se que elas podem ser muito vastas, uma vez que se conheça o mecanismo, ou um dos mecanismos, através dos quais este elemento realiza a sua actividade biológica, e que é descrito pela primeira vez nesta invenção: através da ligação à região NHEIII. Nesta área, existem alguns exemplos desta sequência de polipurina noutras promotores, mas pode ser salientado o facto de esta região de polipurina estar localizadas nas regiões de promotor dos genes *CCR5* e *PDGFA*, entre outros. Por outro lado, são conhecidos alguns factores de transcrição que interagem com este domínio NHE, embora deva ser salientado que o péptido de supressão de metástases nm23H1 (Yoshiro O et al., 2001; Grand et al., 2004). A este respeito, o elemento GSE 24.2 da invenção pode ser utilizado como um factor de supressão para o crescimento tumoral e a propagação de metástases, uma aplicação que é uma parte desta invenção.

Tal como utilizado nesta invenção, o termo "doença neurodegenerativa" refere-se a uma doença que pertence, entre outros, para efeitos ilustrativos, ao seguinte grupo: doença de Alzheimer, doença de Parkinson, ataxia cerebelar e degeneração da espinha medula.

Outro objecto desta invenção é uma composição farmacêutica ou fármaco para o tratamento de doenças, distúrbios ou patologias que se desenvolvem com alterações de actividade de telomerase, preferencialmente uma redução na actividade, de aqui em diante composição farmacêutica desta invenção, que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto ou agente capaz de recuperar a actividade de telomerase juntamente com, opcionalmente, um ou

mais adjuvantes farmaceuticamente aceitáveis e/ou veículos, que é capaz de estimular a criação e manutenção da actividade da telomerase.

Os adjuvantes e veículos farmaceuticamente aceitáveis que podem ser utilizados nas referidas composições são os adjuvantes e veículos conhecidos dos especialistas na técnica que são utilizados habitualmente na preparação de composições terapêuticas.

No sentido utilizado nesta descrição, a expressão "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade do agente ou composto capaz de recuperar a actividade de telomerase calculada para produzir o efeito desejado e, em geral, será determinada, entre outras causas, pelas características dos compostos, incluindo a idade e o estado do doente, a gravidade da alteração ou distúrbio, e a via e a frequência de administração.

Noutra forma de realização particular, a referida composição terapêutica é preparada na forma sólida ou suspensão aquosa, num diluente farmaceuticamente aceitável. A composição terapêutica proporcionada por esta invenção pode ser administrada por qualquer via de administração apropriada; para esta finalidade, a referida composição será formulada numa forma farmacêutica adequada para a via de administração seleccionada. Numa forma de realização particular, a administração da composição terapêutica proporcionada por esta invenção é realizada por via parentérica, por via oral, por via intraperitoneal, via subcutânea, etc. Uma revisão sobre as diferentes formas farmacêuticas para administração do fármaco e os excipientes

necessários para os obter podem ser encontrados, por exemplo, em "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

Outro objecto particular desta invenção é uma composição farmacêutica da invenção em que o composto ou agente capaz de recuperar a actividade de telomerase pertence ao seguinte grupo: sequência, construção genética ou vector GSE 24.2 que permite a expressão de uma proteína ou péptido capaz de recuperar a actividade de telomerase no interior das células de um mamífero, preferencialmente humano.

Uma forma de realização particular da invenção é uma composição farmacêutica da invenção em que o composto ou agente capaz de recuperar a actividade de telomerase é uma ou várias sequências de GSE 24.2 que pertencem ao seguinte grupo:

- a) uma sequência de nucleótidos composta por uma sequência de nucleótidos de GSE 24.2 humana (SEQ ID N°:1).
- b) uma sequência de nucleótidos análoga à sequência de a),
- c) um fragmento de qualquer uma das sequências de a) e b), e
- d) uma sequência de nucleótidos, construção genética, que compreende qualquer sequência que pertence a a), b) e c).

Outra forma de realização particular desta invenção é uma composição farmacêutica da invenção em que a sequência de nucleótidos de a) é a sequência de nucleótidos de GSE 24.2 (SEQ ID N°:1).

Outra forma de realização particular desta invenção é a composição farmacêutica da invenção em que a sequência de nucleótidos de c) é a sequência de nucleótidos SEQ ID N°:11 ou SEQ ID N°: 13.

Outra forma de realização particular desta invenção é uma composição farmacêutica da invenção em que a sequência de nucleótidos é um vector, preferencialmente o vector pLNCX 24.2.

Outro objecto particular desta invenção é uma composição farmacêutica da invenção em que o composto ou agente capaz de recuperar a actividade de telomerase é uma proteína ou um péptido codificado pela sequência, construção genética ou vector de GSE 24.2 da invenção.

Uma forma de realização particular da invenção é uma composição farmacêutica da invenção em que a proteína ou péptido GSE 24.2 pertence ao seguinte grupo:

- a) uma sequência de aminoácidos composta por uma sequência de aminoácidos de GSE 24.2 humana (SEQ ID N°:2),
- b) uma sequência de aminoácidos análoga à sequência de a),

- c) um fragmento de qualquer uma das sequências de a) e b), e
- d) uma sequência de aminoácidos que comprehende qualquer sequência que pertence a a), b) e c).

Outra forma de realização particular desta invenção é a composição farmacêutica da invenção em que a sequência de aminoácidos de a) é a sequência SEQ ID N°:2.

Outra forma de realização particular desta invenção é a composição farmacêutica da invenção em que a sequência de aminoácidos de c) é a sequência SEQ ID N°:12 ou SEQ ID N°:14.

Outro objecto particular desta invenção é uma composição farmacêutica da invenção em que o composto ou agente que activa a telomerase é uma célula, preferencialmente humana, que é transformada pela sequência, construção ou vector GSE 24.2.

Outro objecto da invenção é a utilização da composição farmacêutica da invenção, de aqui em diante utilização da composição farmacêutica da invenção, num método de tratamento ou profilaxia para um mamífero, preferencialmente um ser humano, afectado por uma doença, distúrbio ou patologia que se desenvolve com alterações da actividade de telomerase, consistindo na administração da referida composição terapêutica numa dose adequada que permite a recuperação da actividade de telomerase no interior das suas células.

A composição farmacêutica desta invenção pode ser utilizada num método de tratamento isolada ou juntamente com outros compostos farmacêuticos.

Outro objecto particular desta invenção é a utilização da composição farmacêutica da invenção num método de tratamento para uma doença ou distúrbio que se desenvolve com alterações da actividade de telomerase e que afecta seres humanos, pertencendo, para efeitos ilustrativos e sem estes limitem o âmbito da invenção, ao seguinte grupo: envelhecimento ou aceleração de envelhecimento, doenças neurodegenerativas, disqueratose congénita, Cri du chat (CdC, OMIM 123450), ataxia telangiectasia (AT, OMIM 208900), Síndrome da Quebra de Nijmegen (NBS, OMIM 251260), Síndrome de Bloom (BS, OMIM 210900), Síndrome de Werner (WS, OMIM 277900), anemia de Fanconi (FA OMIM 227650), colite ulcerosa, envelhecimento vascular, aterosclerose e cancro.

Outra forma de realização particular desta invenção é a utilização da composição farmacêutica da invenção num método de tratamento para uma doença neurodegenerativa que pertence ao seguinte grupo: doença de Alzheimer, doença de Parkinson, ataxia cerebelar e degeneração da espinal medula.

Outra forma de realização particular desta invenção é a utilização da composição farmacêutica da invenção num método de tratamento para uma forma de disqueratose congénita ligada ao cromossoma X.

Outra forma de realização particular desta invenção é a utilização da composição farmacêutica da invenção num método

de tratamento para disqueratose congénita autossómica dominante.

Referências bibliográficas

- Bednarek A, Shilkaitis A, Green A, Lubet R., Kelloff G, Christov K e Aldaz M. 1999. Suppression of cell proliferation and activity of telomerase in 4-(hydroxyphenyl)retinamide-treated mammary tumors. *Carcinogenesis*. 20(5): 879-Bessler M, Wilson DB, Mason PJ. 2004. Dyskeratosis congenita and telomerase. *Curr Opin Pediatr*. Feb; 16 (1):23-8. Review.
- Burger AM, Double JA e Newell DR. 1997. Inhibition of Telomerase Activity by Cisplatin in Human Testicular Cancer Cells. *Eur J Cancer*. 33(4): 638-44.
- Cesare AJ e 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.
- Fu D, Collins K. 2003 Distinct biogenesis pathways for human telomerase RNA and H/ACA small nucleolar RNAs. *Mol Cell*. 11(5): 1361-72.

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 USA*. 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 USA*. 14; 95(8): 4219-23.

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

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

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

Mese H, Ueyama Y, Suzuki A, Nakayama S, Sasaki A, Hamakawa H, Matsumura T. 2001. Inhibition of telomerase activity as a measure of tumor cell killing by cisplatin in squamous cell carcinoma cell line. *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. Mouse dyskerin mutations affect accumulation of telomerase RNA and small nucleolar RNA, telomerase activity, and ribosomal RNA processing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 20; 101(29): 10756-61.

Oh S, Song YH, Kim UJ, Yim J, Kim TK. 1999. *In vivo* and *in vitro* analyses of Myc for differential promotor 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 USA* 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. Platination of the (T2G4)4 telomeric sequence: a structural and crosslinking 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 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. Direct evidence for a G-quadruplex in a promotor region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*. 3;99(18):11593-8. Sirinavin C e Trowbridge A. 1975. Dyskeratosis congenita: clinical features and genetic aspects. *J. Med. Genet.* 12, 339-354.

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

Trowbridge AA, Sirinavin C e Linman JW. 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.

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 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. *Int J Mol Med*. 11(6): 697-704.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1.- Estrutura esquemática do complexo da telomerase. As proteínas hTERT, disquerina, p23, hsp90 e TEP1, juntamente com o RNA de hTR, constituem o complexo de ribonucleoproteína da telomerase.

Figura 2.- Viabilidade celular e activação das vias de morte JNK e p38 em linhas celulares 293T: pLNCX e 24.2, tratadas com cisplatina. A) Viabilidade celular. Após semear as células 293T: expressar o vector vazio (pLNCX) e GSE 24.2 (24.2) em placas de 24 poços, elas foram incubadas com concentrações entre 0-100 µg/mL de

cisplatina. A viabilidade celular foi medida por meio da técnica do violeta de cristal após 72 horas de exposição ao fármaco. Os resultados representam a média de duas experiências realizadas em quadruplicado. B) Cinética de activação. Tratamento de ambas as linhas celulares nas concentrações de cisplatina indicadas na figura durante 6 horas. Subsequentemente, a activação de JNK e p38 foi estudada utilizando anticorpos que reconhecem especificamente as formas activas. Como controlo de carga, foram detectados os níveis de JNK-1.

Figura 3.- Diagrama das sequências de DSK contidas nas construções utilizadas e sequência de genes homólogos a DSK. A) Diagramas do cDNA de disquerina que representam a região de GSE 24.2, que cobre os nucleótidos 268 até 433, corresponde; a localização da construção DSK 5' é também apresentada. B) Sequência comparativa em aminoácidos de GSE 24.2 com sequências de pseudouridina sintase de outros organismos. São apresentados os domínios conservados TRUB I e TRUB II.

Figura 4.- Viabilidade das linhas celulares 293T: pLNCX, 24.2, DSK5' e DSK tratadas com cisplatina. Foram utilizadas as linhas celulares descritas acima (pLNCX e 24.2), a linha celular DSK 5', que expressa um fragmento de disquerina descrito na figura anterior, e uma outra que sobre-expressa o cDNA completo de disquerina (DSK). A viabilidade foi determinada como apresentado na figura 1A. Os resultados representam a média de duas experiências realizadas em quadruplicado.

Figura 5.- Actividade de telomerase das linhas celulares 293T: pLNCX e 24.2 após tratamento com cisplatina. As células foram semeadas em placas de 60 mm, pré-tratadas com 0,5 µg/mL de cisplatina durante 3 dias e subsequentemente tratadas com cisplatina a uma dose de 3 µg/mL (células não pré-tratadas). A actividade de telomerase foi medida através do ensaio Intergen TRAPEze. A experiência foi realizada 3 vezes, com resultados semelhantes.

Figura 6.- Viabilidade celular e actividade de telomerase das linhas celulares 293T: pLNCX e 24.2 tratados com o Inibidor da telomerase I. A) Viabilidade celular. Após semear as células 293T: pLNCX e 24.2 em placas de 24 poços, elas foram incubadas com concentrações entre 0-20 µM do Inibidor de Telomerase I. A viabilidade celular foi medida através da técnica do violeta de cristal após 72 horas de exposição ao fármaco. Os resultados representam a média de duas experiências realizadas em quadruplicado. B) Actividade de telomerase a diferentes doses do Inibidor da Telomerase I. Actividade de telomerase das células 293T: 24.2 e pLNCX na presença de diferentes concentrações do inibidor da telomerase I (5-7 µM) durante 3 dias. As células foram semeadas em placas de 60 mm e subsequentemente tratadas nas concentrações e tempos especificados. A actividade de telomerase foi medida através do ensaio de Intergen TRAPEze. C) Actividade de telomerase a diferentes tempos de tratamento com o Inibidor da Telomerase I. Actividade de telomerase na presença de TI I (5 µM) aos 1 e 5 dias. As células foram

semeadas como em B. Subsequentemente, elas foram tratadas com 5 μ M do Inibidor aos tempos especificados.

Figura 7.- Níveis de expressão de diferentes genes relacionados com a telomerase em células 293T: pLNCX e 24.2 após tratamento com cisplatina. As células foram semeadas em placas de 60 mm, tratadas com 3 μ g/mL de CDDP após pré-tratamento com 0,5 μ g/mL de cisplatina durante 3 dias e, subsequentemente, recolhidas aos tempos especificados na figura (3 e 7 dias). Após a extração de RNA, foi realizada RT-PCR com oligos específicos para hTERT, hTR e disquerina de modo a estudar os níveis de expressão dos RNAs mensageiros. Como RNA de controlo, foram utilizados oligos para a amplificação de GAPDH.

Figura 8.- Actividade do promotor de hTERT nas linhas celulares 293T: pLNCX e 24.2 e nas células 293T transitoriamente transfectadas com a construção pLNCX-24.2 e o plasmídeo pLNCX vazio. A) Ambas as células pLNCX e as 24.2 foram transfectadas transitoriamente com 0,25 μ g do vector repórter hTERT-luc. As células foram semeadas em placas de 60 mm. Após 24 horas de transfeção, as células foram lisadas e a actividade da luciferase de 10 μ g de proteína total foi quantificada. Como um controlo de transfeção, as células foram co-transfectadas com um vector repórter, CMV-Renilla. B) As células 293T foram transfectadas com o vector pLNCX e o plasmídeo 24.2 (5 μ g), e ambas foram co-transfectadas com 0,25 μ g do vector repórter hTERT-luc. Após semear as células como em A, elas foram transfectadas com pLNCX e 24.2, e co-transfectadas com o vector repórter hTERT-

luc; subsequentemente, elas foram tratadas como em A. Como um controlo de transfecção, foi utilizado o vector CMV-Renilla. Os resultados correspondem à proporção de unidades relativas de luciferase em relação às células não transfectadas. Cada ponto representa, com \pm , o desvio padrão obtido com 3 experiências independentes. C) As células 293T foram transfectadas com as diferentes construções GSE 24.4, DSK, TRUB I, TRUB II e o plasmídeo vazio pLNCX (5 μ g), e co-transfectadas com 0,25 μ g do vector repórter hTERT-luc. As células foram semeadas em placas de 60 mm; após 24 horas de transfecção, as células foram lisadas e a actividade de luciferase de 10 μ g de proteína total foi quantificada. Como um controlo de transfecção, as células foram co-transfectadas com um vector repórter CMVRenilla. Os resultados correspondem à proporção de unidades relativas de luciferase em relação às células não transfectadas. Cada ponto representa, com \pm , o desvio padrão obtido a partir de 3 experiências independentes.

Figura 9.- Actividade do promotor hTERT após tratamento com cisplatina. A) Ambas a linha celular pLNCX e a linha celular 24.2 foram transfectadas transitoriamente com 0,25 μ g do vector repórter hTERTluc. Após 24 horas de transfecção, elas foram tratadas com 3 μ g/mL de cisplatina durante 8 horas. As células foram semeadas em placas de 60 mm; após 24 horas de transfecção e após tratamento com CDDP, as células foram lisadas e a actividade de luciferase de 10 μ g de proteína total foi quantificada. Como um controlo de transfecção, as células foram co-transfectadas com um vector repórter CMV-Renilla. B) células 293T que, após terem sido

transitoriamente transfectadas com pLNCX e 24.2, foram co-transfectadas com 0,25 µg do vector repórter hTERT-luc e tratadas como em A. Após semear as células como em A, elas foram transfectadas com pLNCX e 24.2, e co-transfectadas com o vector repórter hTERT-luc; subsequentemente, elas foram tratadas como em A. Como um controlo de transfeção, foi utilizado o vector repórter CMV-Renilla. Os resultados correspondem à proporção de unidades relativas de luciferase em relação às células não transfectadas. Cada ponto representa, com \pm , o desvio padrão obtido a partir de 3 experiências independentes.

Figura 10.- Actividade de telomerase e níveis de expressão de hTERT e hTR nas células de doentes com disqueratose congénita e em células VA13 transitoriamente transfectadas com o plasmídeo 24.2 ou o vector pLNCX vazio A) Actividade de telomerase medida através do ensaio TRAP nas células de doentes com disqueratose congénita (DC-1, DC-2 e DC-3) e no veículo mãe (DC-C) após electroporação de 45 µg do plasmídeo pLNCX vazio (-) ou o vector pLNCX 24.2 (+) por 15 milhões de células. B) RT-PCR do RNA das células de um dos doentes com disqueratose congénita, DC3 transfectada com o vector vazio e DC3 transfectado com o plasmídeo 24.2, utilizando oligos específicos para hTERT e hTR. Com um controlo de RNA de partida, foram utilizados os oligos para a amplificação de GAPDH. (C) Actividade de telomerase em células VA13. As células foram transitoriamente transfectadas com 16 µg do vector de controlo pLNCX vazio, expressando DKC ou o péptido de GSE 24.2 por milhão de células. 24 horas mais tarde, a

actividade de telomerase foi analisada como descrito acima, utilizando diluições dos extractos de proteína de cada transfecção. (D) Os níveis de expressão de hTERT e hTR em células VA13 transfetadas com 16 µg das diferentes construções por milhão de células. Os níveis de RNA foram detectados como descrito acima. Foi utilizado GAPDH como um controlo. Em A, B, C, e D, as experiências foram repetidas três vezes com resultados semelhantes. (E) Actividade do promotor hTERT em células VA13. As células foram co-transfetadas com as construções especificadas (10 µg por milhão de células) e com o repórter hTERT-luc (1 µg por milhão de células). Após 24 h de transfecção, a actividade da luciferase foi determinada como descrito acima. CMV-Renilla (0,1 µg/mL por milhão de células) foi utilizada como um controlo para a eficiência de transfecção. Os resultados representam a média de duas experiências realizadas em quadruplicado.

Figura 11.- O péptido de GSE 24.2 aumenta a actividade do promotor de hTERT regulado por c-MYC. (A) As células 293T foram co-transfetadas com diferentes construções (10 µg/DNA por milhão de células) e o repórter hTERT-luc (1 µg por milhão de células). (B) As linhas celulares especificadas foram co-transfetadas com o repórter hTERT-luc e quantidades diferentes do vector de expressão Mad/myc. (C) As linhas celulares especificadas foram co-transfetadas com o repórter HIV-luc e com diferentes quantidades do vector de expressão Mad/myc. Após 24 h de transfecção, as células foram estimuladas com 50 ng/mL de TNF- α durante 6 horas e a actividade de luciferase foi analisada como descrito acima. Foi

utilizado CMV-Renilla (0,1 µg/mL por milhão de células) como um controlo para a eficiência de transfecção. Os resultados representam a média de duas experiências realizadas em quadruplicado.

Figura 12.- A actividade do promotor de c-MYC é induzida pelo péptido GSE 24.2. (A) Representação esquemática do promotor c-MYC, indicando as diferentes construções utilizadas nas experiências. (B) Foram co-transfектadas células 293T com os plasmídeos especificados (10 µg/DNA por milhão de células) e com o repórter px3.2 c-MYC-luc (1 µg por milhão de células). (C) As linhas celulares especificadas foram transfectadas com o repórter px3.2 c-MYC-luc (1 µg por milhão de células). (D) As linhas celulares especificadas foram transfectadas com as diferentes construções do repórter c-MYC-luc (1 µg por milhão de células). Após 24 horas de transfecção, a actividade de luciferase foi analisada como especificado acima. CMV-Renilla (0,1 µg/mL por milhão de células) foi utilizado como um controlo para a eficiência de transfecção. Os resultados representam a média de duas experiências realizadas em quadruplicado.

Figura 13.- A actividade do promotor c-MYC induzida pelo péptido de GSE 24.2 está dependente do elemento NHE III. (A) A representação esquemática das mutações criadas no elemento NHE III. (B) As células 293T foram co-transfектadas com diferentes construções (10 µg/DNA por milhão de células) e com os diferentes mutantes do plasmídeo repórter px3.2 (1 µg por milhão de células). (C) As linhas celulares especificadas na figura foram transfectadas com os diferentes mutantes do repórter

px3.2 (1 µg por milhão de células). Após 24 h de transfecção, a actividade de luciferase foi analisada como especificado acima. Foi utilizado CMV-Renilla (0,1 µg/mL por milhão de células) como um controlo para a eficiência de transfecção. Os resultados representam a média de duas experiências realizadas em quadruplicado.

EXEMPLOS DE FORMAS DE REALIZAÇÃO

Exemplo 1.- Identificação e actividade biológica da sequência de GSE 24.2

1.1.- Identificação da sequência de GSE designada 24.2

A resistência à quimioterapia é uma das maiores limitações no tratamento de cancro. De modo a estudar os mecanismos de resistência à cisplatina, foram isoladas sequências de biblioteca de cDNA que conferem resistência à cisplatina, através da identificação dos elementos de supressão genética. Esta metodologia, que foi descrita anteriormente (Roninson *et al.*, 1995), consiste na expressão de construções de cDNA a partir de uma biblioteca de placenta humana, normalizada de modo a tornar equitativa a abundância da expressão genética. Foram isolados quase 100 clones diferentes que conferiram resistência à cisplatina. Após amplificar as inserções de cDNA, elas foram subclonadas no plasmídeo pLNCX e transfetadas novamente de modo a assegurar que elas conferem resistência. Uma destas GSEs foi um fragmento de 165 pb denominado 24.2 (ver SEQ ID N°:1) que correspondeu a uma sequência interna de disquerina humana.

1.2.- Viabilidade das linhas celulares 293T: pLNCX e 24.2 em relação à cisplatina e activação de JNK e p38 que mediam as vias de morte celular

O plasmídeo pLNCX24-2 que contém GSE do mesmo nome foi transfectado de um modo estável nas células 293T e, como um controlo, foi transfectado o vector vazio pLNCX. Após verificar, por meio de PCR, que a linha celular 24.2 continha esta inserção (resultados não apresentados), a resposta à cisplatina foi estudada, criando uma curva de viabilidade com este fármaco. A Figura 2a apresenta a curva de viabilidade para as duas linhas celulares em resposta a diferentes doses de cisplatina após 72 horas. Aí, pode observar-se que as células que expressam GSE 24.2 de um modo estável apresentam maior viabilidade em resposta à cisplatina em comparação com aquelas que expressam o vector vazio, especialmente em doses baixas, próximo da dose de selecção de GSE. JNK e p38 são MAPKs que são activados em resposta a agentes genotóxicos (Sánchez-Perez *et al.*, 1998). A cinética de activação destas duas proteínas em resposta à cisplatina está relacionada com a capacidade para induzir a morte celular; por esta razão, a activação destas cinases nas duas linhas celulares foi estudada (Figura 2b) e observou-se que é necessária uma maior dose de cisplatina para activar ambas as cinases em células que expressam GSE 24.2 de um modo estável, sugerindo desse modo que a expressão de GSE 24.2 atenua o sinal de lesão celular que activa ambas as cinases.

1.3.- Viabilidade das linhas celulares 293T: pLNCX, DSK (Gene Bank NM 001363.2), DSK-5' e 24.2 em resposta à cisplatina

De modo a estudar se a sobre-expressão de disquerina poderia reproduzir o aumento na viabilidade celular em resposta à cisplatina induzida por GSE 24.2, foi criada uma linha celular que sobre-expressou, de um modo estável, o cDNA completo, de disquerina (pLNCX DSK). Foi também transfectada uma construção que continha um fragmento de disquerina descrito na Figura 3 a), que inclui a sequência GSE 24.2, de modo a estudar se o efeito é exclusivo da região contida em 24.2 ou uma região mais vasta da disquerina (pLNCX DSK-5'). A Figura 4 apresenta a curva de viabilidade para as quatro linhas celulares em resposta a diferentes doses de cisplatina. Aí, observou-se que as células que expressam a construção 24.2 (SEQ ID N°:1) de um modo estável apresentam maior viabilidade em resposta à cisplatina em comparação com aquelas que expressam o vector vazio, disquerina completa (DSK) ou o fragmento 5' da disquerina (SEQ ID N°:3). Por isso, pode afirmar-se que a viabilidade aumentada em resposta à cisplatina está restrita à sequência de cDNA contida no fragmento GSE 24.2.

1.4.- Actividade de telomerase das linhas celulares pLNCX e 24.2 tratadas com cisplatina

Como discutido acima, a cisplatina inibe a actividade de telomerase através de um mecanismo que ainda não está definido. Uma vez que a GSE 24.2 corresponde a uma sequência interna de disquerina e a última é uma parte do complexo de ribonucleoproteína da telomerase, o efeito da cisplatina na actividade de telomerase foi estudado na linha celular que expressou GSE 24.2; foi também estudado se este efeito variou em relação à linha celular que expressa o vector vazio.

Com esta finalidade, foi realizado um ensaio de actividade de telomerase utilizando o método TRAP com as linhas celulares pLNCX e pLNCX 24.2 (Figura 5), pré-tratando-os durante 3 dias com 0,5 µg/mL de cisplatina; subsequentemente, eles foram tratados com 3 µg/mL de cisplatina durante 3 e 7 dias. O tratamento de 3 dias foi realizado porque tinha sido descrito que era necessário um inibidor específico de telomerase para actuar durante este tempo para a inibição eficiente da enzima (Kim *et al.*, 2003; Bednarek *et al.*, 1999; Gowan *et al.*, 2002). O tratamento de 7 dias nas células 293T pLNCX provocou a inibição da actividade de telomerase, enquanto que não foi observada nenhuma inibição para a linha celular 24.2 durante este tempo (Figura 4). Concluiu-se que a expressão de GSE 24.2 confere resistência à inibição da actividade de telomerase provocada pela cisplatina e esta inibição é provavelmente responsável pela maior capacidade de sobrevivência destas células em resposta ao fármaco.

1.5.- Efeito do Inibidor de Telomerase I em células pLNCX e 24.2

O Inibidor da Telomerase I é um composto que forma G-quadruplexos nos telómeros, inibindo desse modo a actividade de telomerase (Thompson *et al.*, 1997). Os autores desejaram estudar o efeito da GSE 24.2 em resposta ao inibidor de telomerase I. Com esta finalidade, foi realizada uma curva da viabilidade em que as linhas celulares pLNCX e 24.2 foram tratadas com concentrações crescentes do inibidor de telomerase I (0-20 µM) durante 72 horas. A Figura 6a) demonstra que as células 24.2 são mais resistentes ao inibidor da telomerase I do que as células parentais. De modo

a verificar se esta protecção foi acompanhada pelas alterações na sensibilidade da actividade de telomerase, a referida actividade foi estudada nas células pLNCX e pLNCX 24.2 tratadas com diferentes doses do Inibidor da Telomerase I durante 3 dias (Figura 6b). Pode observar-se que a inibição da actividade da telomerase na linha celular pLNCX é superior à das células pLNCX 24.2. A actividade de telomerase foi também estudada tratando as células pLNCX e pLNCX 24.2 com uma dose (5 μ M) e a vários tempos (0-5 dias. Figura 6c). Neste caso, foi também provado que as células pLNCX 24.2 necessitam maior exposição ao inibidor de modo a que a actividade da telomerase seja reduzida. Por isso, os efeitos observados para a actividade de telomerase e sobrevivência celular em ambas as linhas celulares são comuns para a cisplatina e o inibidor da telomerase I, sugerindo assim que o fragmento GSE 24.2 possa ter um papel significativo na manutenção da estrutura dos telómeros, pelo menos em parte, uma vez que é capaz de prevenir a inibição provocada pelo inibidor da telomerase I.

1.6.- Efeitos da cisplatina nos níveis de expressão de hTR, hTERT e disquerina nas linhas celulares pLNCX e 24.2

Uma das explicações para a baixa sensibilidade das células pLNCX 24.2 à cisplatina pode ser uma alteração nos níveis de alguns dos componentes do complexo da telomerase. Por isso, os níveis de expressão de diferentes genes envolvidos no complexo da telomerase e o efeito que a cisplatina tinha na sua expressão foram estudados. Para esta finalidade, as células pLNCX e pLNCX 24.2 foram pré-tratadas com 0,5 μ g/mL e tratadas com 3 μ g/mL de cisplatina durante 3 e 7 dias. Utilizando oligos específicos para hTR, hTERT e

disquerina, os níveis de expressão destes genes e o efeito da cisplatina na referida expressão foram estudados. Foi provado que a cisplatina não tinha efeito na expressão da disquerina e hTR (Figura 7); pelo contrário, observou-se que, após 3 dias de tratamento, há uma redução na expressão de hTERT nas células pLNCX; por outro lado, não existe redução na expressão nas células pLNCX 24.2 até 7 dias de tratamento. Por isso, as células pLNCX 24.2 necessitam de maior exposição à cisplatina de modo a exibir inibição da expressão de hTERT. Esta alteração na sensibilidade à cisplatina pode explicar, pelo menos parcialmente, a diferença em sensibilidade nos ensaios de actividade de telomerase.

1.7.- Efeito da expressão dos fragmentos GSE 24.2 e Trub I e Trub II, de ambos um modo estável e transitório, na actividade do promotor hTERT

Uma vez que foram observadas alterações nos níveis de expressão de hTERT nas células que expressaram o péptido de GSE 24.2 em resposta à cisplatina, foi decidido estudar se a expressão da sequência de GSE 24.2 e sequências dos seus fragmentos - contendo os domínios Trub I (SEQ ID N°:11) e Trub II (SEQ ID N°: 13) - tinham qualquer efeito na actividade do promotor hTERT. O domínio TRUB da pseudouridina sintase da disquerina compreende dois subdomínios estruturais: os motivos Trub I e II (Zucchini et al., 2003). Estes dois domínios são críticos para manter a estrutura de proteína global da disquerina. Para além disso, o motivo II contém pelo menos um resíduo (asp125) que é essencial para a actividade enzimática. Para esta finalidade, o vector repórter hTERT-luc que contém uma sequência de 3 402 pb (Song et al., 1999) do promotor hTERT humano foi transfectada nas

linhas celulares: pLNCX 24.2 e pLNCX. Figura 8a) demonstra que, na linha celular pLNCX 24.2, a actividade do promotor hTERT é superior aquela nas células que expressam o vector vazio (pLNCX). A mesma experiência foi realizada através de expressão transitória de GSE 24.2 nas células 293T (Figura 8b) e observou-se que a expressão transitória de GSE 24.2 também aumenta a actividade do promotor hTERT em comparação com as células transfectadas com o vector vazio. Por outro lado, esta experiência foi realizada com os dois fragmentos de GSE 24.2 que contêm cada um dos domínios Trub I (SEQ ID N011) e Trub II (SEQ ID N°:13), respectivamente, de modo a identificar a sequência mais pequena com uma actividade similar à do fragmento GSE 24.2 (Figura 8c). Os resultados demonstram que a sequência contida em GSE 24.2, as sequências com domínios Trub, actuam activando a expressão do promotor hTERT.

Adicionalmente, a sequência do gene CBF5 da levedura, *S. cerevisiae* CBF5, uma sequência equivalente à de GSE 24.2 (Figura 3b), foi subclonada no vector pLNCX, e observou-se que a expressão da referida construção aumentou a actividade de hTERT, mas não a do promotor hTR (resultados não apresentados), indicando um elevado grau de conservação funcional na actividade deste domínio da disquerina.

1.8.- Efeito da expressão de GSE 24.2 no promotor hTERT em células tratadas com cisplatina.

Após observar que a expressão de GSE 24.2 retardou a inibição da expressão de hTERT induzida pela cisplatina, foi estudado se o tratamento com cisplatina tinha qualquer efeito no promotor do referido gene e se a expressão de GSE 24.2

influenciou este último. Para este objectivo, foram transfecadas as células pLNCX e pLNCX 24.2 com o vector repórter hTERT-luc. Após 24 horas de transfecção, elas foram tratadas com 3 µg/mL de cisplatina durante 8 horas e a actividade de telomerase foi ensaiada (Figura 9a). Pode ser observado que, nas células pLNCX 24.2, a indução da actividade do promotor é 4 vezes superior àquela nas células pLNCX após tratamento com cisplatina. Foi realizada a mesma experiência expressando transitoriamente GSE 24.2 e comparando-as com as células 293T transfecadas com o vector pLNCX vazio. Neste caso, a actividade das células que expressaram GSE 24.2 foi superior à actividade de linha de base após tratamento com cisplatina.

Exemplo 2.- O fragmento NHEIII do promotor do gene c-MYC é o alvo do péptido GSE 24.2

O promotor de hTERT contém duas regiões E-box (CACGTG), sítios de ligação para heterodímeros myc/max (Oh *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999), assim como cinco regiões sp1. De modo a estudar se a activação do promotor de hTERT pelo péptido de GSE 24.2 ocorre através desta E-box, um molécula híbrida contendo este domínio de ligação ao DNA de c-myc e o domínio de transactivação mad foi transfecado, que foi capaz de inibir a ligação a esta E-box, inibindo a transcrição dependente de c-myc. As células de controlo e as células que expressam a proteína disquerina (DKC) e o péptido de GSE 24.2 foram transfecadas com quantidades crescentes da referida molécula híbrida. A expressão da proteína de fusão mad/myc inibiu a actividade da linha de base do promotor de hTERT de um modo dependente da dose, no grupo de controlo e nas células DKC. Para além disso, a expressão da proteína de

fusão myc/mad foi capaz de bloquear a transcrição mediada pelo péptido GSE-24.2 nas células GSE 24.2, sugerindo assim que a activação da transcrição de hTERT induzida por GSE 24.2 é dependente de c-myc (Figura 11b). Esta inibição foi específica, uma vez que a transfeccão na construção myc/mad juntamente com um promotor dependente de NF κ B (HIVLuc) não afectou a transcrição após estimulação com TNF α em qualquer uma das linhas celulares (Figura 11c).

A transcrição do gene *c-myc* é controlada por dois promotores diferentes e parece estar reprimida por um domínio hipersensível para a DNase localizado entre os promotores P0 e P1 (NHEIII). Assim, foram utilizadas quatro construções diferentes que continham 3,2 kb do ponto de iniciação de transcrição de *c-myc* ligado ao gene da luciferase (Figura 12a). Este plasmídeo (px3.2myc) foi transfectado nas células de controlo e nas células GSE 24.2, e foi observado um aumento de três vezes na actividade no último grupo de células (Figura 12b). Foi obtido um resultado semelhante quando as células foram transfectadas em células 293T com o vector pLNCX ou com o plasmídeo que expressa o péptido de GSE 24.2 juntamente com o repórter px3.2myc (Figura 12c).

Ambos os resultados indicaram que este fragmento interno de disquerina (GSE 24.2) foi capaz de activar a transcrição do gene *c-myc*. Este factor de transcrição, *c-myc*, deve por isso activar a transcrição de hTERT. Assim, três mutantes eliminados no promotor *c-myc* foram utilizados para definir a região necessária para o péptido de GSE 24.2 realizar a sua actividade induzida. De todos os mutantes utilizados, apenas aqueles contidos na região distal dos promotores P1 e P0, que incluem o domínio NHEIII, foram capazes de manter a

transcrição nas células GSE 24.2, mas não nas células de controlo (Figura 12d), indicando assim que a região proximal do promotor P2 não é necessária para a actividade do péptido GSE 24.2.

Uma vez que a região NHEIII foi descrita como um inibidor da transcrição de c-myc, foram construídos vários mutantes da região NHEIII através de modificação de Guanina da região rica em purina. As 27 Guaninas presentes na região NHEIII estão envolvidas na manutenção da estrutura secundária dos G-quadruplexos da região rica em purina (Pu27). Os seguintes foram mutados: G12A, localizado da segunda guanina do segundo quarteto; G17A, no segundo triplete de Guaninas; e, finalmente, duas Guaninas consecutivas (G26A/G27A) na extremidade da região rica em purina (Figura 13a). Estas construções do promotor foram transfectadas nas células que expressam, que o vector vazio, ou os vectores contendo a proteína DKC ou o péptido GSE 24.2. Os resultados indicam que apenas o promotor WT px3,2 myc foi capaz de ser activado quando transfectado com GSE 24.2. Os três mutantes na região Pu27 foram activados por meio de GSE 24.2, embora a níveis muito baixos (Figura 13b).

Facto interessante, a transfecção do duplo mutante de G nas células de controlo ou aquelas que expressam DKC foi capaz de apresentar actividade aumentada no promotor, indicando que esta região é importante para manter uma conformação que reprime o promotor. Foram obtidos resultados semelhantes em ensaios de transfecção transitória em células 293T quando os diferentes mutantes foram transfectados com o vector vazio, com a proteína DKC ou o péptido de GSE 24.2 (Figura 13c). Em geral, estes resultados sugerem que o

péptido de GSE 24.2 é capaz de modificar a estrutura secundária da região Pu27 no sentido de uma conformação activa, permitindo assim a transcrição do gene c-myc.

Exemplo 3.- Expressão de GSE 24.2 nas células de doentes com a forma de disqueratose congénita ligada ao cromossoma X e em células VA13.

Uma vez que na forma de disqueratose congénita ligada ao cromossoma X existem defeitos na actividade da telomerase, com níveis baixos de RNA de telomerase, o efeito da expressão desta GSE 24.2 foi testado nas células de doentes com disqueratose congénita. Para este objectivo, as células de doentes com disqueratose congénita (DC-1, DC-2, DC-3) e células mães transportadoras comercialmente disponíveis (DC-C) foram transfectadas com o vector GSE 24.2 ou com o vector vazio. Estas células são mortais e normalmente envelhecem em cultura. 24 horas após a transfecção, a actividade de telomerase foi medida e foi observado um aumento na actividade de telomerase tanto nas células mães transportadoras como nas células de doentes com disqueratose congénita quando o fragmento GSE 24.2 é expresso (Figura 10a). Curiosamente, não foi observado um aumento na actividade da telomerase com a expressão de disquerina completa (resultados não apresentados). Por outro lado, os níveis de hTR são baixos nas células DC que expressam uma forma mutada do gene da disquerina (Mochizuki *et al.*, 2004). Foi investigado se este aumento na actividade foi a consequência de um aumento na expressão de qualquer um dos componentes do complexo da telomerase, hTERT e hTR. Para este objectivo, foi realizado um ensaio de RT-PCR 24 horas após a transfecção, utilizando oligos específicos para hTERT e hTR

(Figura 10b), e em ambos os casos foi observado um aumento nos níveis de expressão após a expressão de GSE 24.2.

Para além disso, a expressão do péptido de GSE 24.2 da invenção na linha celular deficiente em telomerase VA13 (Cesare e Griffith, 2004) foi capaz de recuperar a actividade de telomerase (Figura 10c), e a expressão dos RNAs de hTERT e hTR (Figura 10d). Nesta linha celular, a expressão do motivo I do péptido de GSE 24.2 (com uma baixa eficiência) e o fragmento de gene de levedura CBF5 activava adicionalmente o promotor hTERT (Figura 10e). Globalmente, os resultados indicam que a expressão do péptido de GSE 24.2 foi capaz de recuperar a actividade de telomerase em ambas as linhas celulares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Construções e linhas celulares. As linhas celulares de doentes com disqueratose congénita ligada ao cromossoma X foram obtidas do Coriell Cell Repository e mantidas em RPMI com 20% de FBS. A linha VA13 foi obtida de Dr. M Serrano. A família DKC foi clinicamente descrita (Sirinavin *et al.*, 1975; Trowbridge *et al.*, 1977) e os indivíduos afectados exibem a substituição de um aminoácido T66A (dados não apresentados) (DC-1, DC-2, DC-3). A linha celular materna veículo (DCC) expressa um RNA mensageiro sem mutação (dados não apresentados). Estas células foram cultivadas em RPMI (Gibco) suplementado com 20% de soro fetal de bovino (Gibco) e 2 mM de Glutamina.

A construção DSK contém o cDNA completo da disquerina humana e a construção DSK 5' (SEQ ID N°:5) contém os

primeiros 500 nucleótidos de disquerina humana. Ambas as construções, como GSE 24.2 (SEQ ID N°:1), foram clonadas no sítio *Cla*I do plasmídeo pLNCX (BD Biosciences Clontech).

As células derivadas de doentes com DC e seus respectivos controlos foram transitoriamente transfetadas através de electroporação utilizando 3 µg da construção pLNCX ou pLNCX 24.2 por milhão de células.

A linha celular 293T foi obtida de American Type Culture Collection e as células foram cultivadas em DMEM (Meio de Eagle Modificado de Dulbecco) (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal de bovino (Gibco) e 2 mM de Glutamina. Esta linha celular foi transfetada de uma forma estável utilizando o método de cloreto de cálcio, 10 µg de plasmídeo por milhão de células. Estas células foram co-transfetadas com pBABEpur, 1 µg de vector por milhão de células. 24 horas após a transfecção, as células foram tratadas com puromicina de modo a seleccionar clones estáveis. Foi confirmado que as células expressavam o fragmento GSE 24.2 de uma forma estável através de PCR do DNA genómico (dados não apresentados).

A construção hTERT-luc foi clonada no plasmídeo básico pGL3 (Promega) e foi proporcionada por Tae Kook Kim (Kim *et al.*, 1999).

Fármacos. Cisplatina e o Inibidor de Telomerase I foram obtidos de Calbiochem e utilizados nas doses especificadas em cada figura.

Ensaio de Actividade de telomerase com base no método TRAP (Wright *et al.*, 1995). A actividade de telomerase foi

medida utilizando o kit de detecção de telomerase TRAPeze (Intergen) de acordo com o manual de instrução. A concentração de proteína de cada extracto foi quantificada através do método de Bradford utilizando o reagente BIORAD e após efectuar um PCR de acordo com o manual de instruções; a electroforese em gel de poliacrilamida foi efectuada com os produtos de reacção sob condições não desnaturantes e, subsequentemente, foi corado com brometo de etídeo durante 30 minutos.

Extracção da proteína total. As células foram lisadas após terem sido lavadas com PBS de modo a eliminar resíduos do meio. O tampão de lise foi preparado de acordo com protocolos convencionais e os inibidores de proteína foram adicionados: ABSF, ortovanadato, Leupeptina, pepstatina A, aprotinina e DTT (Sigma). Subsequentemente, os extractos foram centrifugados a 14 000 rpm durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi recuperado. O conteúdo em proteína total foi determinado através do método de Bradford utilizando reagente da BIORAD.

Transferência de Western e anticorpos. 20 µg de proteína foram separadas em géis de SDS-poliacrilamida; subsequentemente, estes foram transferidos para membranas Immobilon-P (Millipore) por transferência húmida. As membranas foram bloqueadas numa solução de BSA a 5% ou em 5% de leite magro em TBS (20 mM de Tris-HCL, pH 7,5, 150 mM de NaCl) 0,1% de Tween-20 (Sigma). As membranas foram incubadas com os anticorpos correspondentes. Os anticorpos secundários utilizados foram anti-murganho/coelho (Biorad), directamente conjugado com peroxidase. A detecção foi efectuada pelo

método de ECL (Pharmacia), como especificado no manual de instruções.

Os anticorpos utilizados nos ensaios foram: anti-pJNK (V7391, Promega), anti-JNK1 (C-17, Santa Cruz Biotechnologies), anti p-P38 (C20, Santa Cruz Technologies).

Expressão de genes por RT-PCR. A extracção de RNA total a partir das células foi efectuada utilizando o reagente Trizol (Life Technologies) seguindo as instruções do fabricante. Em cada reacção, foram transcritos 2 µg de RNA total para cDNA utilizando a transcriptase reversa M-Mlv (Promega).

Foram utilizados os oligos que se seguem:

Oligo A: 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3' (SEQ ID N°:5) e

Oligo B: 5'- GGATGAAGCGGAGTCGGA -3' (SEQ ID N°:6) para hTERT;

Oligo C: 5'- TCTAACCTAACTGAGAAGGGCGTAG -3' (SEQ ID N°:7) e

Oligo D: 5'- GTTGCTCTAGAATGAACGGTGGAAG -3' (SEQ ID N°:8) para hTR;

Oligo E: 5'- ATGGCGGATGCGGAAGTAATT- 3' (SEQ ID N°:9) e

Oligo F: 5'- CCCCTTCAATAGCATTGTGC - 3' (SEQ ID N°:10) para disquerina.

As condições de PCR para a amplificação de hTERT foram as seguintes: 94°C, 45s; 60°C, 45s; 72°C, 90s durante 31 ciclos. As condições de PCR para hTR foram: 94°C, 45 segundos; 55°C, 45 segundos; 72°C, 90 segundos para 28 ciclos. As condições para a disquerina foram: 94°C, 40 segundos; 60°C, 60 segundos; 72°C, 120 segundos para 28 ciclos (Zhang *et al.*, 2002).

Ensaio de Luciferase. A regulação da transcrição de hTERT foi medida através do gene repórter da Luciferase, precedido de uma sequência de 3 402 pb do promotor hTERT. Após 24 horas de transfecção, as células foram lisadas com o Reporter Lysis Buffer (Promega) comercial. Os lisados foram centrifugados e a expressão de luciferase foi quantificada com 10 µg de proteína do sobrenadante, utilizando um luminómetro de Berthold. Uma construção do promotor de CMV, seguido pelo gene da renilla, foi utilizada como um controlo de transfecção. A actividade de luciferase é expressa por micrograma de proteína e é normalizada utilizando a luminescência da renilla no mesmo extracto.

Curvas de crescimento. A viabilidade celular foi estudada através da técnica de violeta de cristal. As células foram semeadas em placas de 24 poços e tratadas com diferentes concentrações do fármaco correspondente, especificado nas figuras. Após 72 horas de incubação, as células foram fixadas com 1% de glutaraldeído durante 15 minutos e, após terem sido lavadas com PBS, estas foram coradas com 0,1% do agente de coloração violeta de cristal. O agente de coloração associado com as células foi removido com uma solução de ácido acético a 10%. O número de células foi determinado por estimativa da absorvência a 595 nm. As figuras apresentam a % de viabilidade com respeito às células não sujeitas ao tratamento e representam a média de 2 experiências efectuadas em quadruplicado com os desvios correspondentes.

Mutagénese dirigida. As mutações específicas de guanina na região NHEIII do promotor do gene c-myc, px3.2, foram efectuadas utilizando o kit Quickchange X-L directed

mutagenesis (Strategene) de acordo com as instruções do fabricante.

Listagem de Sequências

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

<120> Sequência GSE 24.2

<130> GSE 24.2

<160> 14

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 165

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(165)

<223> Sequência GSE 24.2

<400> 1

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 tgg att cga cgg ata ctt cgg gtg gag aag aca ggg cac agt	96
Val Ala Trp Ile Arg Arg Ile Leu Arg Val Glu Lys Thr Gly His Ser	
20 25 30	
ggt act ctg gat ccc aag gtg act ggt tgg tta atc gtg tgc ata gaa	144
Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val Thr Gly Cys Leu Ile Val Cys Ile Glu	
35 40 45	
cga gcc act cgc ttg gtg aag	165
Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys	
50	

<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 cgg 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 aas 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 tgg ggt gtc 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 caa 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	496
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 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> Sequência artificial

<220>

<223> Oligo A para hTERT

<400> 5
cggaagagtg tctggagcaa 20

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligo B para hTERT

<400> 6
ggatgaagcg gagtcgga 18

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligo C para hTR

<400> 7
tctaacccta actgagaagg gcgtag 26

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligo D para hTR

<400> 8
gtttgctcta gaatgaacgg tggaag 26

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligo E para disquerina

<400> 9
atggcggatg cggaagtaat t 21

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligo F para disquerina

<400> 10
ccccc ttcaat agcattgtgc 20
<210> 11
<211> 54
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

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

<220>
<221> misc_característica
<222> (4)..(50)
<223> Domínio TrubI

<400> 11

```

ggt ttc att aat ctt gag 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 gca 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_caracteristica

<222> (4)..(50)

<223> Domínio Trub II

<400> 13

cac agt ggt act ctg gat ccc aag gtg act ggt tgg ita 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

Lisboa, 25 de Agosto de 2010

REIVINDICAÇÕES

- 1.** Sequência de nucleótidos consistindo em SEQ ID N°: 1 ou a sequência de aminoácidos codificada pela referida sequência de nucleótidos.

- 2.** Sequência de nucleótidos caracterizada por permitir a expressão de uma proteína ou péptido que induz a recuperação de actividade de telomerase no interior das células de um mamífero, preferencialmente humano, e que é composta por uma ou várias sequências de nucleótidos pertencentes ao seguinte grupo:
 - a) uma sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID N°: 1,

 - b) variantes biologicamente activas da sequência de (a), e

 - c) um fragmento de qualquer uma das sequências de (a) ou (b).

- 3.** Sequência de nucleótidos de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por ser uma sequência de DNA, cDNA ou mRNA.

- 4.** Sequência de nucleótidos de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por a sequência de a) consistir em SEQ ID N°: 1.

- 5.** Sequência de nucleótidos de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por a sequência de b) consistir na SEQ ID N°: 11 ou SEQ ID N°: 13.

6. Construção genética caracterizada por compreender uma ou várias sequências de nucleótidos consistindo em pelo menos uma sequência de nucleótidos de acordo com as reivindicações 2 a 5.

7. Vector de expressão caracterizada por compreender uma sequência de nucleótidos de acordo com as reivindicações 3 a 5, ou uma construção genética de acordo com a reivindicação 6.

8. Expressão vector de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por o vector de expressão ser o plasmídeo pLNCX 24.2.

9. Proteína ou péptido, caracterizada por induzir a actividade de telomerase no interior das células de um mamífero, preferencialmente humano, e que consiste em uma ou várias sequências de aminoácidos pertencentes ao seguinte grupo:

a) uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID N°: 2,

b) variantes biologicamente activas de uma sequência de (a), e

c) um fragmento de qualquer uma das sequências de (a) ou (b).

10. Proteína de acordo com a reivindicação 9, caracterizada por a sequência de aminoácidos de a) consistir na SEQ ID N°: 2.

11. Proteína de acordo com a reivindicação 9, caracterizada por a sequência de aminoácidos de c) ser SEQ ID N°: 12 ou SEQ ID N°: 14.

12. Células eucarióticas ou procarióticas geneticamente modificadas, caracterizadas por estas compreenderem a sequência de nucleótidos de acordo com as reivindicações 2 a 5, a construção de acordo com a reivindicação 6, ou o vector de expressão, de acordo com as reivindicações 7 e 8, em que o péptido ou proteína, de acordo com as reivindicações 9 a 11, podem ser adequadamente expressas.

13. Células eucarióticas humanas geneticamente modificadas, caracterizadas por estas compreenderem a sequência de nucleótidos de acordo com as reivindicações 2 a 5, a construção de acordo com a reivindicação 6, ou o vector de expressão de acordo com as reivindicações 7 e 8, em que o péptido ou proteína, de acordo com as reivindicações 9 a 11, podem ser adequadamente expressas.

14. Utilização da sequência de nucleótidos, a construção, o vector, a proteína ou a célula, de acordo com as reivindicações 1 a 13, para a preparação de um fármaco ou composição farmacêutica para o tratamento de uma doença causada por uma alteração de, preferencialmente a redução na, actividade de telomerase.

15. Utilização de acordo com a reivindicação 14 caracterizada por a doença pertencer ao seguinte grupo: envelhecimento ou aceleração do envelhecimento, doenças neurodegenerativas e disqueratose congénita.

16. Composição farmacêutica ou fármaco para o tratamento de doenças, distúrbios ou patologias causadas por uma redução na actividade de telomerase, caracterizada por compreender um composto ou agente capaz de recuperar a actividade de telomerase de acordo com a reivindicação 1.

17. Composição farmacêutica ou fármaco para o tratamento de doenças, distúrbios ou patologias causadas por uma redução na actividade de telomerase, caracterizada por compreender um composto ou agente capaz de recuperar a actividade de telomerase, caracterizada por o composto compreender ou várias sequências pertencentes ao seguinte grupo ou à sequência de aminoácidos codificada pela referida sequência de nucleótidos:

- a) uma sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID N°: 1,
- b) variantes biologicamente activas da sequência de (a),
- c) um fragmento de qualquer uma das sequências de (a) ou (b), e
- d) uma sequência de nucleótidos que compreende qualquer sequência pertencente a (a), (b) ou (c).

18. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizada por o composto ou agente que induz a actividade de telomerase pertencer ao seguinte grupo: sequência de nucleótidos, construção genética, vector de expressão, proteína ou célula, de acordo com as reivindicações 2 a 13.

19. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizada por a sequência de nucleótidos de a) consistir na SEQ ID N°: 1.

20. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizada por a sequência de nucleótidos de c) ser a SEQ ID N°: 11 ou SEQ ID N°: 13.

21. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 18, caracterizada por o composto ser uma construção genética de acordo com a reivindicação 6.

22. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 18, caracterizada por o composto ser um vector de expressão de acordo com as reivindicações 7 e 8.

23. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada por o vector ser o plasmídeo pLNCX 24.2.

24. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 18, caracterizada por o composto ser uma proteína, de acordo com as reivindicações 9 a 11.

25. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 24, caracterizada por a proteína pertencer ao seguinte grupo:

a) uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID N°: 2,

b) variantes biologicamente activas da sequência de (a),

- c) um fragmento de qualquer uma das sequências de (a) ou (b), e
- d) uma sequência de aminoácidos que compreende qualquer sequência pertencente a (a), (b) ou (c).

26. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 25 em que a sequência de aminoácidos de a) é a SEQ ID N°: 2.

27. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 25 em que a sequência de aminoácidos de c) é a SEQ ID N°: 12 e SEQ ID N°: 14.

28. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada por o composto ser uma célula, preferencialmente humana, transformada pela sequência, construção ou vector, de acordo com as reivindicações 2 a 8.

29. Utilização da composição farmacêutica, de acordo com as reivindicações 16 a 25, para a preparação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia para um mamífero, preferencialmente um ser humano, afectado por uma doença, distúrbio ou patologia que se desenvolve com alterações de, preferencialmente uma redução na, actividade de telomerase, consistindo na administração da referida composição farmacêutica numa dose adequada que torna possível to recuperar a actividade de telomerase no interior das suas células.

30. Utilização da composição farmacêutica para a preparação de um medicamento, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada por a doença que se desenvolve com alterações

de actividade de telomerase e que afecta seres humanos pertencer ao seguinte grupo: envelhecimento ou aceleração do envelhecimento, doenças neurodegenerativas, disqueratose congénita, Grito do gato, ataxia telangiectasia, Síndrome Clivagem de Nijmegen, Síndrome de Bloom, Síndrome de Werner, anemia de Fanconi, colite ulcerosa, envelhecimento vascular, ateroscleroze e cancro.

31. Utilização da composição farmacêutica para a preparação de um medicamento, de acordo com a reivindicação 30, caracterizada por a doença neurodegenerativa pertencer ao seguinte grupo: doença de Alzheimer, doença de Parkinson, ataxia cerebelar e degeneração da espinha medula.

32. Utilização da composição farmacêutica para a preparação de um medicamento, de acordo com a reivindicação 30, caracterizada por a doença ser cancro.

33. Utilização da composição farmacêutica para a preparação de um medicamento, de acordo com a reivindicação 30, caracterizada por a disqueratose congénita ser a forma ligada ao cromossoma X de disqueratose congénita ou disqueratose congénita autossómica dominante.

Lisboa, 25 de Agosto de 2010

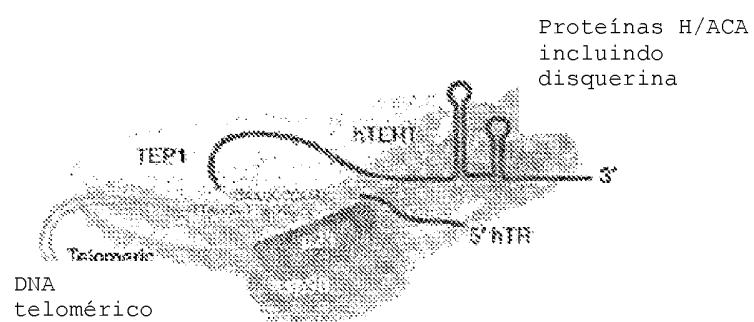


Fig 1.

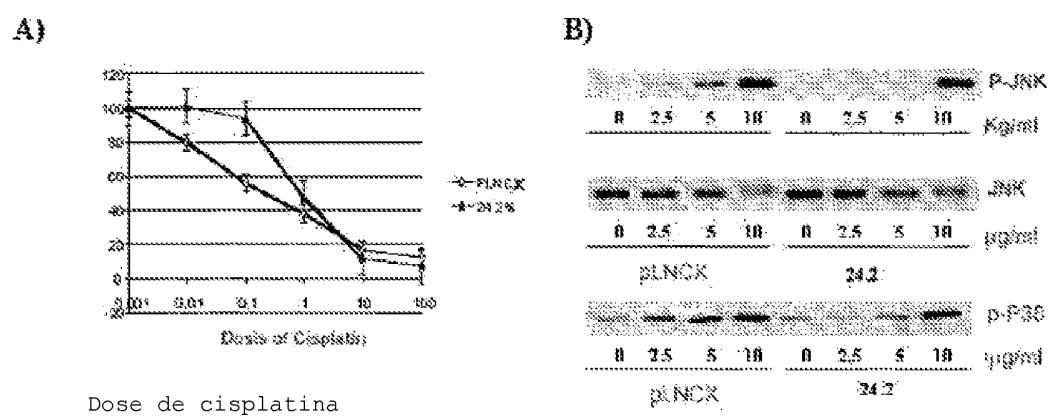


Fig 2.

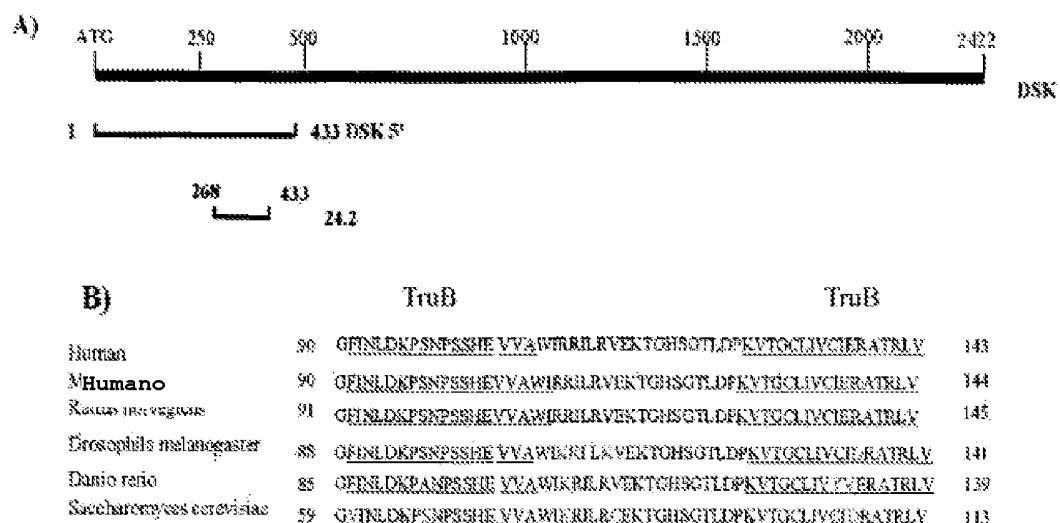


Fig 3

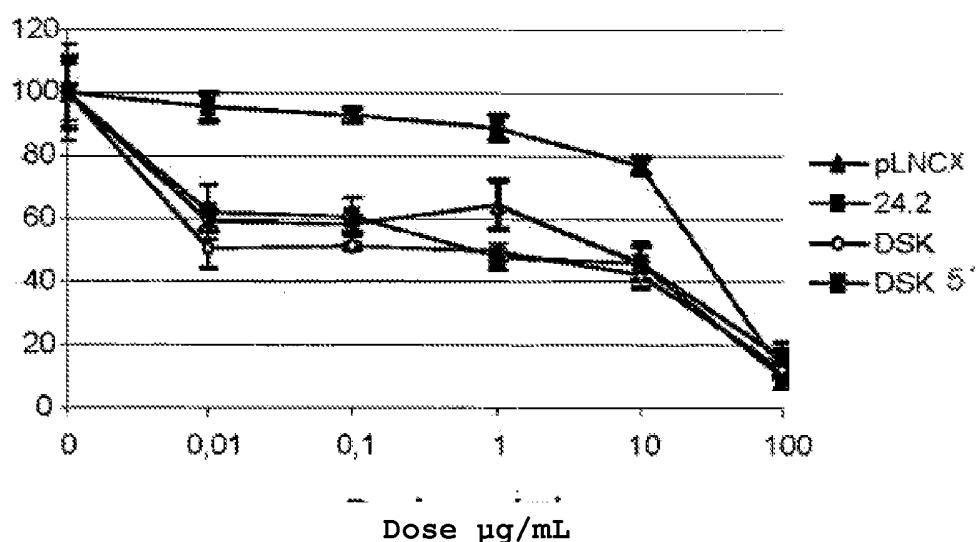


Fig 4

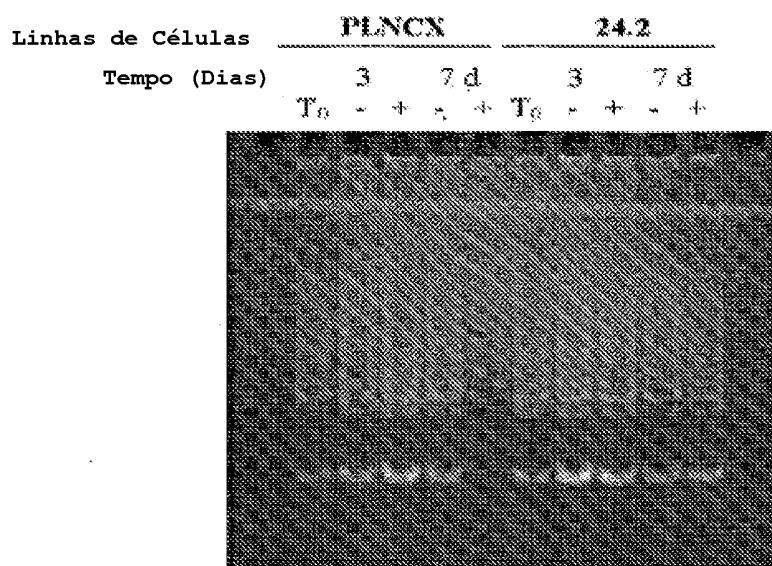


Fig 5

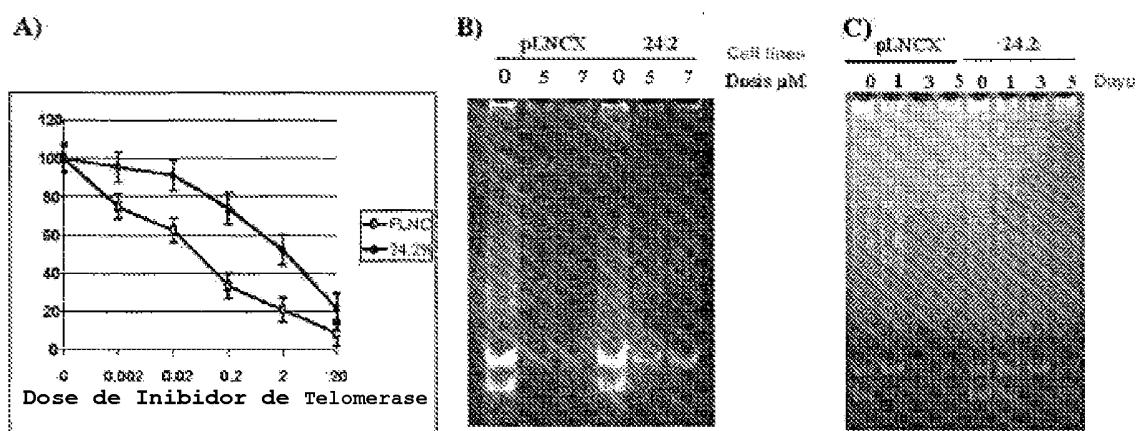


Fig 6

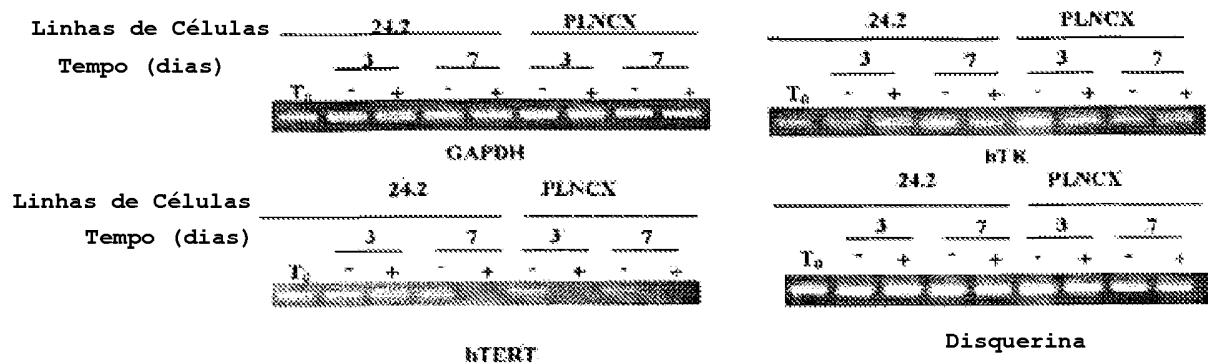


Fig 7

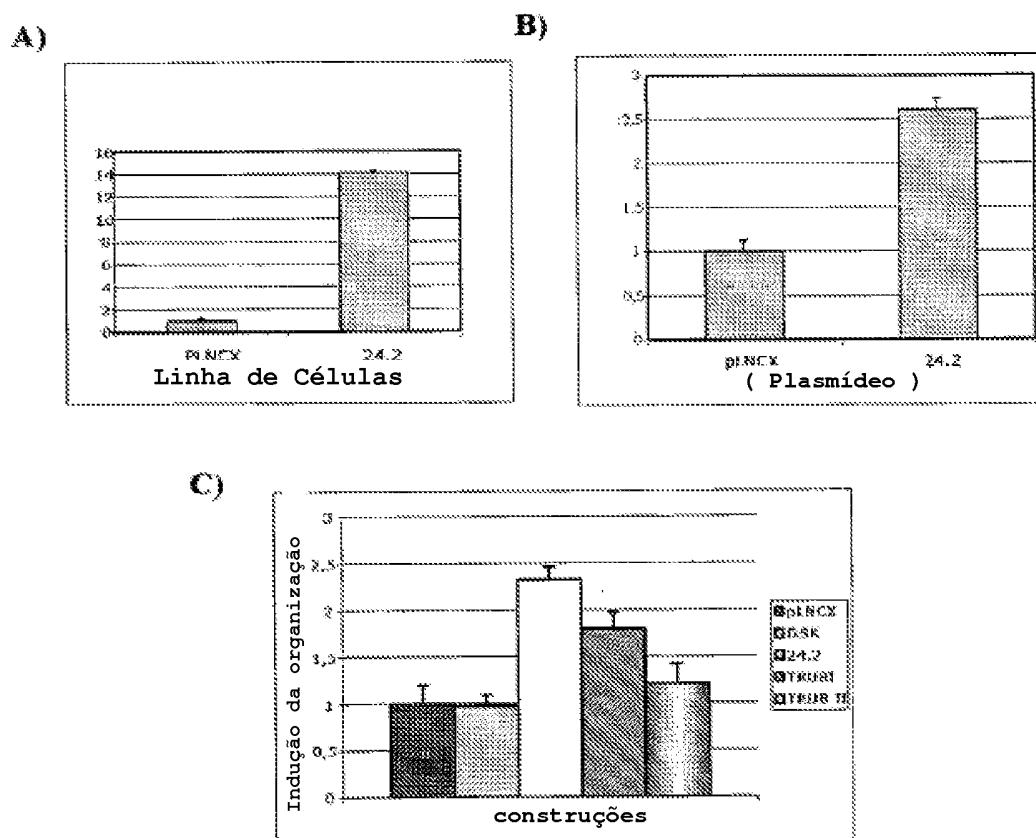


Fig 8

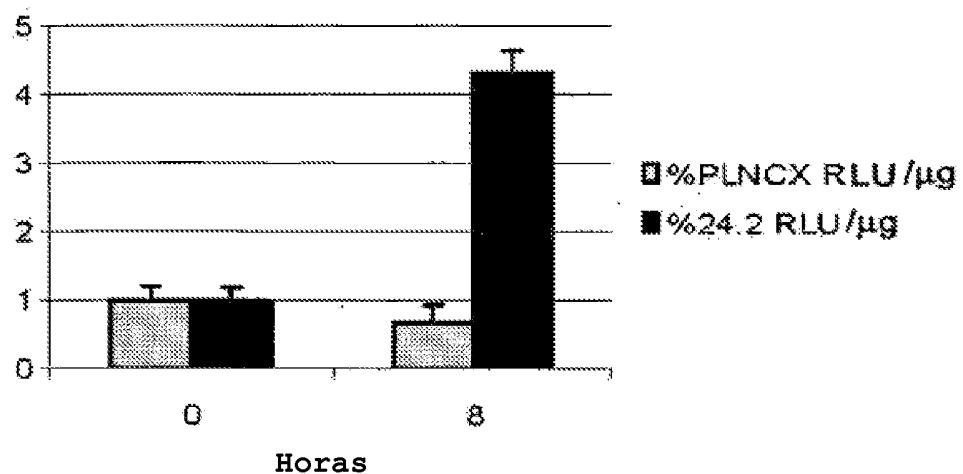
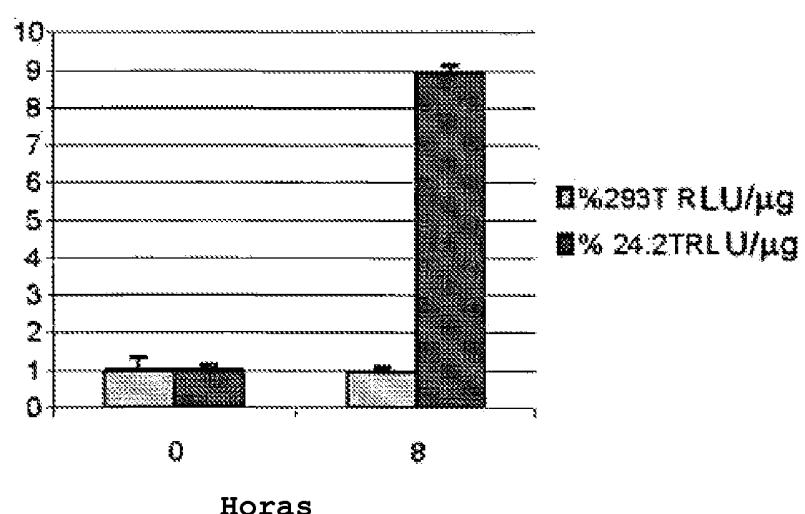
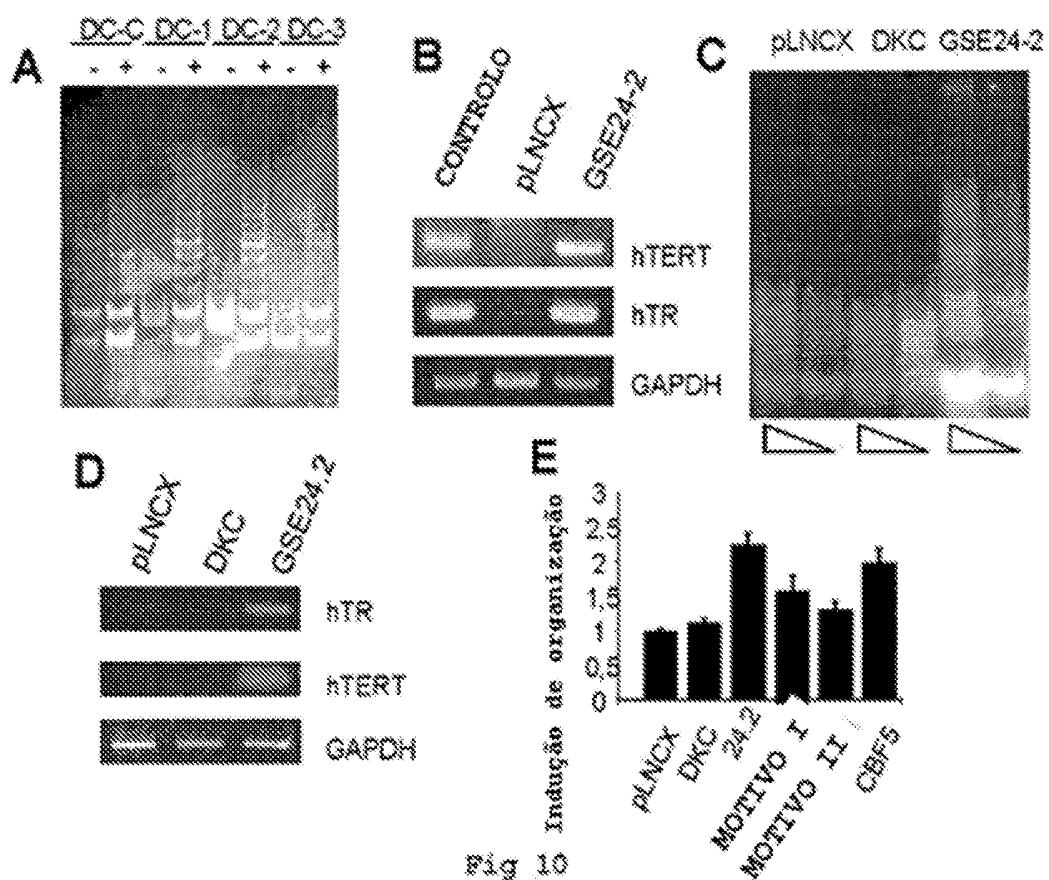
A)**B)**

Fig 9



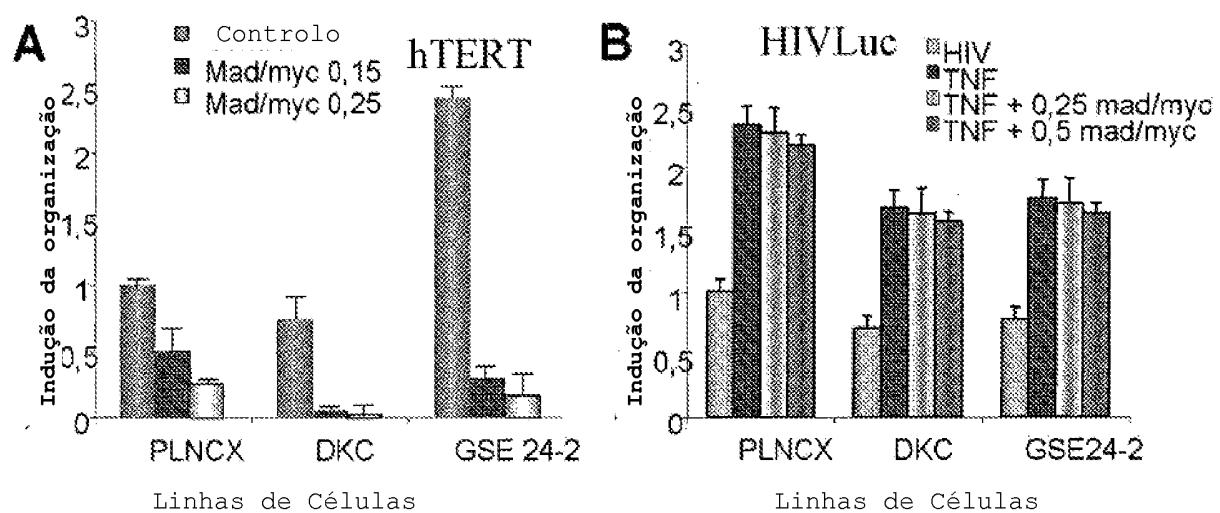
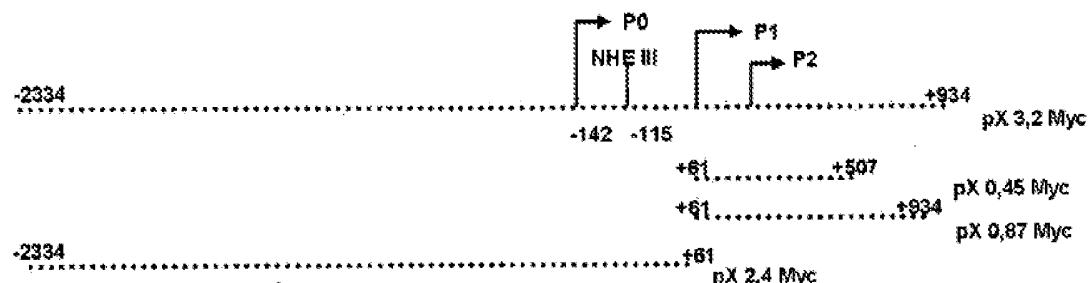


Fig 11

A**Fig 12**

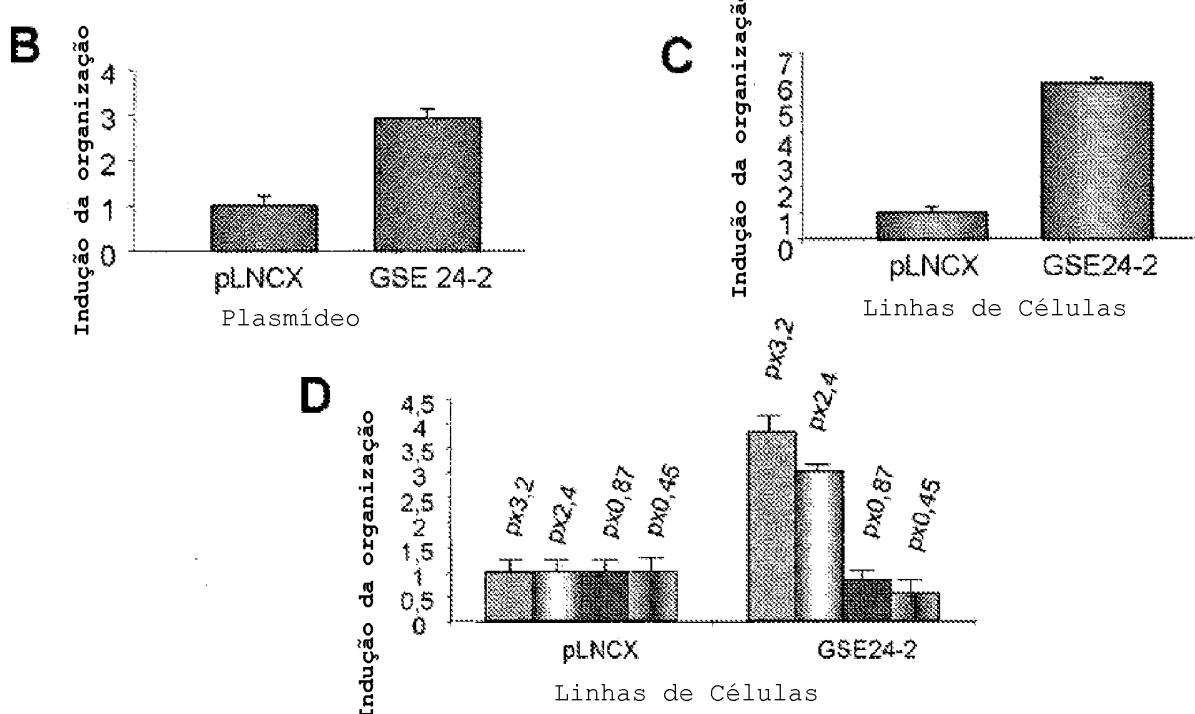
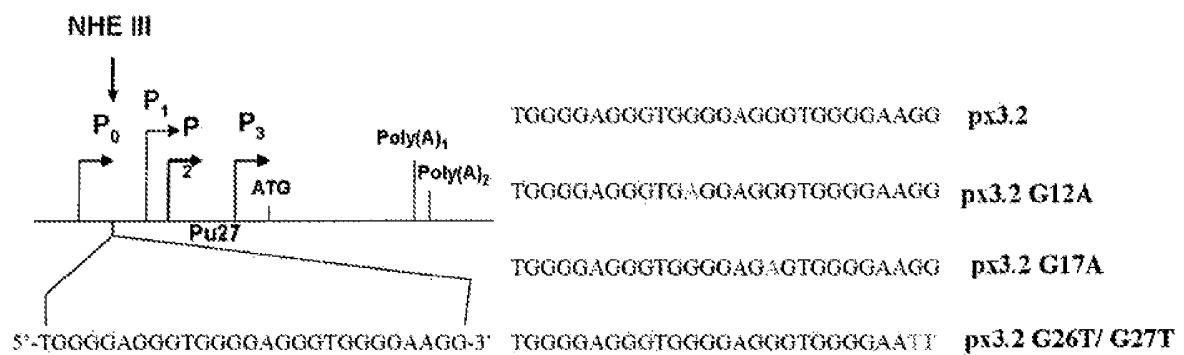


Fig 12

A**Fig 13**

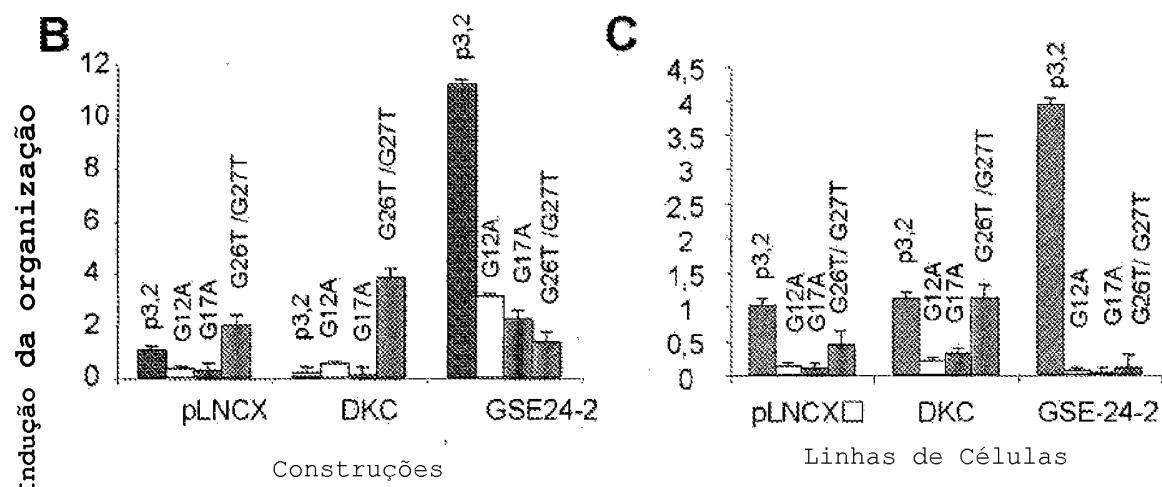


Fig 13