



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 238**

51 Int. Cl.:
C12N 9/12 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06849419 .4**
96 Fecha de presentación : **11.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1947175**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **Secuencias de nucleótidos y péptidos GSE 24.2 de disquerina que puede inducir actividad de la telomerasa, procedimiento para obtener la misma, composiciones terapéuticas y aplicaciones de la misma.**

30 Prioridad: **14.10.2005 ES 200502511**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.06.2011

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

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

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 360 238 T3

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

DESCRIPCIÓN

Secuencia de nucleótidos y péptidos GSE 24.2 de disquerina que puede inducir actividad de la telomerasa, procedimiento para obtener la misma, composiciones terapéuticas y aplicaciones de la misma.

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

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 La disquerina (Figura 1) es una proteína nucleolar de 58 kD que se asocia a la secuencia H/ACA en los SnoRNA, presentes en las partículas de ribonucleoproteínas pequeñas que se encargan de pseudouridinar el ARN ribosómico. Por otra parte, también es un componente del complejo de la telomerasa, que es responsable del mantenimiento de las repeticiones teloméricas en los extremos cromosómicos. La forma de disqueratosis congénita ligada al cromosoma X (Marrone y col., 2003; Bessler y col., 2004) es un síndrome congénito que produce insuficiencia de la médula ósea y está asociado a una mayor susceptibilidad al cáncer. Esta forma de disqueratosis se produce por una mutación específica del gen DKC1 que codifica la disquerina. Hay otra disqueratosis congénita autosómica dominante; en este caso, esta enfermedad está asociada a mutaciones en el componente de ARN de la telomerasa (hTR) (Heiss y col., 1998). En los fibroblastos y linfoblastos de pacientes con disqueratosis congénita hay menos actividad de la telomerasa y los telómeros son más cortos que los de células no afectadas por la enfermedad (Siriniavin y col., 1975; Trowbridge y col., 1977). En las células de pacientes con la forma de disqueratosis congénita ligada al cromosoma X, los defectos en la telomerasa se han superado expresando hTERT de forma ectópica (Mitchell y col., 1999). En la disqueratosis congénita producida por mutaciones en hTR, la única forma de recuperar la actividad de la telomerasa es reexpresando hTR (Fu y col., 2003).

25 Los telómeros están compuestos por 500-2.000 repeticiones de la secuencia conservada TTAGGG en el extremo 3' de los cromosomas y su acortamiento en divisiones sucesivas se convierte en una limitación para la capacidad de proliferación de la célula. Los telómeros son susceptibles de sufrir daño en el ADN producido por agentes exógenos, incluido el cisplatino. Se ha descrito que el cisplatino puede inhibir la actividad de la telomerasa en diferentes líneas celulares (Ishibashi y col., 1998; Burger y col., 1997). Hay varias hipótesis acerca de cómo se puede producir esta inhibición. Una posibilidad es la formación de aductos G-Pt-G, típicos del cisplatino, en la secuencia repetida de los telómeros TTAGGG. Alternativamente, interacciones del cisplatino con grupos sulfhidrilo esenciales para la subunidad catalítica transcriptasa inversa (hTERT) e incluso podría deberse a la reducción de la expresión de hTERT (Burger y col., 1997).

BREVE DESCRIPCIÓN

40 Un objeto de esta invención es un compuesto que induce o activa la actividad de la telomerasa, denominado en lo sucesivo compuesto activador de esta invención, basado en la secuencia de nucleótidos del fragmento GSE 24.2 de la disquerina o en la secuencia de proteínas o de péptidos codificada por dicha secuencia de nucleótidos que puede recuperar la actividad de la telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humanos.

45 Un objeto particular de la invención es una secuencia de nucleótidos, denominada en lo sucesivo secuencia génica GSE 24.2 de esta invención, que permite la expresión de una proteína o péptido que induce la recuperación de la actividad de la telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humano, y que está constituida por una o varias secuencias de nucleótidos GSE 24.2 que pertenecen al siguiente grupo:

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

Como se usa en la presente invención el término "secuencia de nucleótidos" se refiere a una secuencia de ADN, ADNc o ARNm.

Una realización particular de esta invención es la secuencia de nucleótidos de la secuencia GSE 24.2 de a) compuesta por SEQ ID NO1. Otra realización particular de esta invención es la secuencia de nucleótidos de la secuencia GSE 24.2 de b) compuesta por SEQ ID NO11 o SEQ ID NO13, que codifican los dominios peptídicos Trub I y Trub II, respectivamente (Ejemplo 1.7).

5 Otro objeto particular de esta invención es una construcción genética GSE 24.2 que comprende la secuencia de nucleótidos GSE 24.2.

10 Otro objeto particular de esta invención es un vector de expresión GSE 24.2 que comprende una secuencia de nucleótidos GSE 24.2 o una construcción genética GSE 24.2, descritas en esta invención, y que permite la expresión de una proteína o péptido que puede recuperar la actividad de la telomerasa en el interior de células de mamíferos, preferentemente humanos. Un ejemplo de esta realización particular es el vector de expresión pLNCX 24.2 de la invención (véanse los ejemplos).

15 Además, otro objeto particular de la invención es una proteína o péptido, denominado en lo sucesivo proteína GSE 24.2 de esta invención, que presenta actividad dirigida a recuperar la telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humano, y que comprende una o varias secuencias de aminoácidos que pertenecen al siguiente grupo:

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

Otra realización particular de esta invención es una proteína cuya secuencia de aminoácidos de a) está compuesta por SEQ ID NO2.

25 Otra realización particular de esta invención es una proteína cuya secuencia de aminoácidos de c), cuyo fragmento está compuesta por SEQ ID NO12 o SEQ ID NO14.

30 Por otro lado, otro objeto adicional de esta invención son células genéticamente modificadas, tanto células eucariotas - preferentemente humanas - como procariotas, denominadas en lo sucesivo células GSE 24.2 de la invención, que comprenden la secuencia de nucleótidos, la construcción y el vector de expresión GSE 24.2 de la invención y en las que puede expresarse de forma adecuada el péptido o proteína GSE 24.2 de la invención.

35 Por tanto, otro objeto de la invención es el uso del compuesto activador GSE 24.2 de esta invención en la preparación de un fármaco o composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad producida por una alteración, preferentemente una reducción, de la actividad de la telomerasa, que pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y disqueratosis congénita.

40 Otro objeto de esta invención es una composición farmacéutica o fármaco para el tratamiento de enfermedades, trastornos o patologías que se desarrollan con alteraciones de la actividad de la telomerasa, preferentemente una reducción de la actividad, denominada en lo sucesivo composición farmacéutica de esta invención, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o agente que puede recuperar la actividad de la telomerasa junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, y que puede estimular la generación y el mantenimiento de la actividad de la telomerasa.

45 Otro objeto particular de esta invención es una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto o agente que puede recuperar la actividad de la telomerasa pertenece al siguiente grupo: secuencia, construcción genética o vector GSE 24.2 que permiten la expresión de una proteína o péptido que puede recuperar la actividad de la telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humano.

50 Una realización particular de la invención es una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto o agente que puede recuperar la actividad de la telomerasa es una o varias secuencias GSE 24.2 que pertenecen al siguiente grupo:

- a) una secuencia de nucleótidos compuesta por una secuencia de nucleótidos GSE 24.2

humana (SEQ ID NO1),

b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a),

c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y

5 d) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende cualquier secuencia que pertenece a a), b) y c).

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

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

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

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

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

a) una secuencia de aminoácidos compuesta por una secuencia de aminoácidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO2),

b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),

20 c) un fragmento de cualquiera de las secuencias de a) y b), y

d) una secuencia de aminoácidos que comprende cualquier secuencia que pertenece a a), b) y c).

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

25 Otra realización particular de esta invención es la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos de c) es la secuencia SEQ ID NO12 o SEQ ID NO14.

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

30 Otro objeto de la invención es el uso de la composición farmacéutica de la invención, denominado en lo sucesivo uso de la composición farmacéutica de la invención, en un procedimiento de tratamiento o profilaxis de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad, trastorno o patología que se desarrolla con alteraciones de la actividad de la telomerasa que está constituido por la administración de dicha composición terapéutica en una dosis adecuada que permite la recuperación de la actividad de la telomerasa en el interior de sus células.

35 Otro objeto particular de esta invención es el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o trastorno que se desarrolla con alteraciones de la actividad de la telomerasa y que afecta a seres humanos, que pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas, disqueratosis congénita, síndrome del maullido, ataxia-telangiectasia, síndrome de rotura de Nijmegen, síndrome de Bloom, síndrome de Werner, anemia de Fanconi, colitis ulcerosa, envejecimiento vascular, aterosclerosis y cáncer.

40 Otra realización particular de esta invención es el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa que pertenece al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelosa y degeneración de la médula espinal.

45 Otra realización particular de esta invención es el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de la forma de disqueratosis congénita ligada al cromosoma X.

Otra realización particular de esta invención es el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de la disqueratosis congénita autosómica dominante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Esta invención trata el problema de proporcionar nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades que se desarrollan con alteraciones de la actividad de la telomerasa, y más específicamente la disqueratosis congénita.

10 Esta invención se basa en el hecho de que los inventores han demostrado que la expresión de un fragmento de ADNc de la disquerina, el fragmento GSE 24.2 (SEQ ID NO1), que expresa una secuencia interna de la disquerina (SEQ ID NO2), compensa los defectos en la actividad de la telomerasa en las células de pacientes con disqueratosis congénita y en células VA13 (Ejemplo 3). Más específicamente, cuando las células de pacientes con disqueratosis congénita y las células VA13 se transfectan con la secuencia GSE 24.2, además de recuperar la actividad de la telomerasa, se produce un aumento en los niveles de hTERT y hTR. Efectivamente se observó que la expresión del péptido GSE 15 24.2 aumentaba la actividad inicial del promotor de telomerasa y, tras el tratamiento con cisplatino, las células 24.2 también tenían mayor actividad. Curiosamente, Collins y col. habían descrito previamente que en células de estos mismos pacientes, la actividad de la telomerasa sólo se recuperaba al expresar en exceso el gen hTERT y no por la expresión de la disquerina, una proteína que está mutada en estos pacientes (Mitchell y col., 1999).

20 En la bibliografía se ha descrito que mutaciones en la disquerina podrían afectar la acumulación del ARN de telomerasa (Mochizuki y col., 2004); por tanto, los efectos producidos por el péptido GSE 24-2 podrían deberse a un aumento en los niveles de hTERT y a una mayor estabilización de hTR, ya que el aumento de los niveles de hTERT podría estabilizar la formación del complejo de la telomerasa, previniéndose así la degradación de hTR. A este respecto, en esta invención se ha observado que, en 25 células transfectadas con el péptido GSE 24.2, el promotor de proteínas hTERT, pero no hTR, está constitutivamente activado de un modo dependiente de la expresión de c-myc, más específicamente mediante su unión a la región NHEIII localizada en la región P1 rica en purina del promotor (Pu27, véase el Ejemplo 2), permitiendo así un cambio en la conformación secundaria de ADN de tal forma que los factores de transcripción puedan entrar al ADN. Cualquier cambio en la secuencia de esta región que modifica la estructura secundaria de la misma altera la actividad del péptido GSE 24.2.

30 De manera similar, una secuencia equivalente al péptido GSE 24.2 humano (CBF5 de levadura, *S. cerevisiae* CBF5) presenta una actividad similar en la activación de hTERT (datos no mostrados), indicando un alto grado de conservación funcional en la actividad de este dominio de disquerina, definiéndose e ilustrándose así las múltiples posibilidades de elementos o secuencias homólogos a GSE 24.2 que pueden usarse en esta invención.

35 Además, este péptido GSE 24.2 proporciona capacidad de supervivencia a cisplatino en líneas celulares humanas (Ejemplo 1). La línea celular 24.2 aumenta la viabilidad frente al inhibidor de la telomerasa 1. Este inhibidor tiene un mecanismo de acción similar al cisplatino formando G-cuádruples en los telómeros y reduciendo la actividad de la telomerasa (Sun y col., 1997). También se han descrito 40 secuencias que forman G-cuádruples en un intrón de hTERT, y por tanto es posible que este inhibidor también reduzca los niveles de hTERT, disminuyendo así también la actividad de la telomerasa (Lemateleur y col., 2004).

45 Teniendo en cuenta que tanto el cisplatino como el inhibidor de la telomerasa estabilizan la formación de G-cuádruples (Redon y col., 2001) que a su vez podrían bloquear la actividad de la telomerasa, el péptido GSE 24.2 podría reducir la eficacia de estos inhibidores previniendo o reduciendo la formación de estos G-cuádruples o quizás puede aumentar los niveles de hTERT por otro mecanismo, aumentando así la actividad de la telomerasa.

50 Los elementos de supresión de genes (GSE) son fragmentos de ADNc biológicamente activos que codifican péptidos o inhibidores antisentido de ARN y actúan de forma dominante sobre la expresión génica en células de mamífero. El GSE 24.2 es un fragmento de 165 pb que comprende los nucleótidos 268 a 433 y se corresponde con una secuencia formada por dos dominios altamente conservados en diferentes especies, denominados TRUB (Figura 2b, ver SEQ ID NO12 y 14, respectivamente). Estos dominios parecen tener una función importante en la pseudouridinización de los snoRNA (Zucchini y col., 2003; Pan y col., 2003) y, lo que es más sorprendente, secuencias de nucleótidos preparadas con tales dominios clonados por separado aumentaban la actividad inicial del promotor de la telomerasa al igual 55 que la secuencia entera inicialmente descrita de 55 aminoácidos (Ejemplo 1.7, Figura 8c). Es interesante observar que esta actividad que induce resistencia a cisplatino y que compensa defectos en la actividad de la telomerasa sólo está localizada en la región de la disquerina hallada en la secuencia GSE 24.2, ya que la proteína completa (véase SEQ ID 4) o el fragmento aminoterminal no tienen actividad alguna.

Finalmente, los inventores observan que estos resultados abren nuevas posibilidades terapéuticas para trastornos o enfermedades humanos producidos por alteraciones del complejo de la telomerasa (acortamiento de telómeros y enfermedades con envejecimiento celular o citoblastos), de forma que el elemento GSE 24.2 o derivados del mismo pueden usarse como fármacos para recuperar la actividad de la telomerasa. Además, hay diferentes síndromes distintos de DC que incluyen un acortamiento de telómeros entre los fenotipos celulares, y también insuficiencias de la médula ósea, inmunodepresión y predisposición a cáncer. El gen de la telomerasa no está afectado por mutaciones en ninguno de ellos, pero sí la sustitución de telómeros y la actividad de la telomerasa.

Por lo tanto, un objeto de esta invención es un compuesto que induce o activa la actividad de la telomerasa, denominado en lo sucesivo compuesto activador de esta invención, basado en la secuencia de nucleótidos del fragmento GSE 24.2 de la disquerina o la secuencia de proteínas o de péptidos codificada por dicha secuencia de nucleótidos que puede recuperar la actividad de la telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humano.

Como se usa en esta invención, el término “compuesto que induce o activa la telomerasa” se refiere a una molécula que aumenta la intensidad o prolonga la duración de la actividad biológica de la misma. Esta definición incluye además aquellos compuestos o moléculas que permiten la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína GSE 24.2. Un compuesto activador puede estar compuesto por un péptido, una proteína o una secuencia de nucleótidos.

Así, un objeto particular de la invención es una secuencia de nucleótidos, denominada en lo sucesivo secuencia génica GSE 24.2 de esta invención, que permite la expresión de una proteína o péptido que induce la recuperación de la actividad de la telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humano, y que está compuesta por una o varias secuencias de nucleótidos GSE 24.2 que pertenecen al siguiente grupo:

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

En el sentido usado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que pueda aislarse o construirse basándose en la secuencia mostrada en esta memoria descriptiva; por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que permita la codificación de un péptido o proteína que puede imitar la actividad de la secuencia GSE 24.2 (SEQ ID NO2) o de fragmentos de la misma (SEQ ID NO12 y SEQ ID NO14).

La enzima disquerina pertenece a una familia de la pseudouridina sintasa presente en varios organismos (véase la Figura 3B, Mitchel y col., 1999). Basándose en la información descrita en esta invención y de los diferentes organismos hallados en la naturaleza, un experto en la técnica puede aislar o construir una secuencia de nucleótidos análoga a las descritas en esta invención.

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

Como se usa en esta invención, el término “secuencia de nucleótidos” se refiere a una secuencia de ADN, ADNc o ARNm.

Una realización particular de esta invención es la secuencia de nucleótidos de la secuencia GSE 24.2 de a) compuesta por SEQ ID NO1.

Otra realización particular de esta invención es la secuencia de nucleótidos de la secuencia GSE 24.2 de b) compuesta por SEQ ID NO11 o SEQ ID NO13, que codifican los dominios peptídicos Trub I y Trub II, respectivamente (Ejemplo 1.7).

La secuencia de nucleótidos GSE 24.2 identificada como d) se corresponde con una construcción génica GSE 24.2. Esta construcción génica GSE 24.2 de la invención también puede comprender, en caso necesario y con el fin de permitir un mejor aislamiento, la detección o la secreción al citoplasma del péptido expresado, una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido susceptible de ser usado con fines de aislamiento, detección o secreción de dicho péptido. Por tanto, otro objeto particular de esta invención es una construcción genética GSE 24.2 que comprende, además de la secuencia de nucleótidos GSE 24.2, cualquier otra secuencia de nucleótidos que codifica un péptido o secuencia de péptidos que permita el aislamiento, la detección o la secreción al citoplasma celular del péptido expresado; por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, una secuencia de polihistidina (6xHis), una secuencia de péptidos que es reconocible por un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, para la identificación del mismo, o cualquier otra que pueda usarse para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad: péptidos etiqueta tales como c-myc, HA, E-tag) (“Using antibodies: a laboratory manual”. Ed. Harlow y David Lane (1999). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. Capítulo: Tagging proteins. Pág. 347-377).

La secuencia de nucleótidos GSE 24.2 y la construcción genética GSE 24.2 descritas anteriormente pueden obtenerse por un experto en la materia usando técnicas que son ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook y col. “Molecular cloning, a Laboratory Manual”, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 vol. 1-3). Dichas secuencias de nucleótidos pueden estar integradas en un vector de expresión génica que permite la regulación de la expresión de las mismas en condiciones adecuadas en el interior de las células.

Por tanto, otro objeto particular de esta invención es un vector de expresión GSE 24.2 que comprende una secuencia de nucleótidos GSE 24.2 o una construcción genética GSE 24.2, descritas en esta invención, que permite la expresión de una proteína o péptido que puede recuperar la actividad de la telomerasa en el interior de células de mamíferos, preferentemente humanos. Un ejemplo de una realización particular es el vector expresión pLNCX 24.2 de la invención (véanse los Ejemplos 1 y 2).

En general, un vector de expresión comprende, además de la secuencia de nucleótidos GSE 24.2 o de la construcción genética 24.2. descrita en la invención, un promotor que dirige la transcripción de las mismas (por ejemplo, *pT7*, *plac*, *ptrc*, *ptac*, *pBAD*, *ret*, etc.) al que está operativamente unido, y otras secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan dicha transcripción y, en su caso, la traducción del producto de interés; por ejemplo, señales de inicio y terminación de transcripción (*ttt2*, etc.), señal de poliadenilación, origen de replicación, secuencias de unión a ribosomas (RBS), secuencias que codifican reguladores transcripcionales (potenciadores), silenciadores transcripcionales, represores, etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse, basándose en las condiciones y necesidades de cada caso específico, de entre plásmidos de expresión, vectores virales (ADN o ARN), cósmidos, cromosomas artificiales, etc., que pueden contener, además, marcadores que pueden usarse para seleccionar las células transfectadas o transformadas con el gen o genes de interés. La selección del vector dependerá de la célula huésped y del tipo de uso previsto. Por tanto, según una realización particular de esta invención, dicho vector es un plásmido o un vector viral. Dicho vector puede obtenerse por procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia; de manera similar, para la transformación de microorganismos y células eucariotas -transformación química, electroporación, microinyección, etc. - pueden usarse diferentes procedimientos ampliamente conocidos que se describen en diversos manuales [Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.].

Además, otro objeto particular de la invención es una proteína o péptido, denominado en lo sucesivo proteína GSE 24.2 de esta invención, que presenta actividad dirigida a recuperar telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humano, y que comprende una o varias secuencias de aminoácidos que pertenecen al siguiente grupo:

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

En el sentido usado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de aminoácidos que pueda ser aislada o construida basándose en la secuencia mostrada en esta memoria descriptiva; por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más aminoácidos, la adición de uno o

más aminoácidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más aminoácidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que imite la actividad de recuperación de la telomerasa de SEQ ID NO2.

5 La enzima disquerina pertenece a una familia de la pseudouridina sintasa presente en varios organismos (véase la Figura 3B, Mitchel y col., 1999). Basándose en la información descrita en esta invención y de diferentes organismos presentes en la naturaleza, un experto en la materia puede aislar o construir una secuencia de aminoácidos análoga a las descritas en esta invención.

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

Otra realización particular de esta invención es una proteína cuya secuencia de aminoácidos de a) está compuesta por SEQ ID NO2.

15 Otra realización particular de esta invención es una proteína cuya secuencia de aminoácidos de c), cuyo fragmento está compuesto por SEQ ID NO12 o SEQ ID NO14.

20 Por otro lado, otro objeto adicional de esta invención son células genéticamente modificadas, tanto células eucariotas -preferentemente humanas- como procariotas, denominadas en lo sucesivo células GSE 24.2 de la invención, que comprenden la secuencia de nucleótidos, la construcción y el vector de expresión GSE 24.2 de la invención y en las que puede expresarse de forma adecuada el péptido o proteína GSE 24.2 de la invención. Estas células pueden transformarse, infectarse o transfectarse por medio de dichas secuencias de nucleótidos usando técnicas de ingeniería genética conocidas por un experto en la materia. [Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de esta invención.

25 Estas células pueden ser útiles para la producción de los péptidos que pueden recuperar la actividad de la telomerasa que pueden formar la base de una composición farmacéutica, para la amplificación recombinante de dichas secuencias de nucleótidos o pueden ser útiles por sí mismas como células para la terapia génica, etc. Una realización particular sería una célula humana transformada por estas secuencias de nucleótidos GSE 24.2 de diferentes cepas de células que pueden usarse como células para la regeneración de tejido humano.

30

Los sistemas de expresión génica pueden permitir o no la integración del nuevo material genético en el genoma de la célula huésped. Así, la secuencia de nucleótidos, la construcción génica o el vector de expresión GSE 24.2 pueden usarse como un fármaco para proteger células huésped, preferentemente células humanas afectadas de una alteración en la actividad de la telomerasa, en un procedimiento de tratamiento y profilaxis de terapia génica de un ser humano afectado por una enfermedad que se desarrolla con alteraciones de la actividad de la telomerasa. De manera similar, las células GSE 24.2 de la invención pueden usarse como un fármaco para la regeneración o el implante de tejidos o células en seres humanos. Las herramientas biofarmacéuticas y los procedimientos de terapia génica son suficientemente conocidos por un experto en la materia de tal forma que con la información descrita en esta invención pueden desarrollarse de forma relativamente fácil. Además, las proteínas o péptidos y las propias células pueden convertirse en biofármacos.

35

40

Por lo tanto, otro objeto de la invención es el uso del compuesto activador GSE 24.2 de esta invención en la preparación de un fármaco o composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad producida por una alteración, preferentemente una reducción, de la actividad de la telomerasa, que pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas, disqueratosis congénita, síndrome del maullido (CdC, OMIM 123450), ataxia-telangiectasia (AT, OMIM 208900), síndrome de rotura de Nijmegen (NBS, OMIM 251260), síndrome de Bloom (BS, OMIM 10900), síndrome de Werner (WS, OMIM 277900), anemia de Fanconi (FA OMIM 227650), colitis ulcerosa, envejecimiento vascular, aterosclerosis y cáncer.

45

50

Los estudios realizados en los últimos años han destacado la posible relación entre los defectos en el mantenimiento de la actividad de la telomerasa y otros síndromes con insuficiencia de la médula ósea. La causa principal de muerte de pacientes con disqueratosis congénita es una insuficiencia de médula ósea producida por infecciones o hemorragias oportunistas (en el 70% de los casos). Otras causas de muerte son enfermedad pulmonar y cáncer.

55

La enfermedad del maullido (CdC, OMIM 123450) es un síndrome hereditario congénito asociado a delecciones del brazo corto del cromosoma 5 y aparece con una frecuencia de 1:20.000 y

1:50.000; la frecuencia en pacientes afectados por retraso mental profundo (CI inferior a 20) alcanza el 1%.

5 La ataxia-telangiectasia (AT, OMIM 208900) es un síndrome recesivo autosómico producido por mutaciones en el gen ATM. Los problemas aparecen entre el segundo y el quinto año de vida y están constituidas por degeneración neuronal progresiva (ataxia cerebral), telangiectasia ocular, inmunodeficiencia, hipogonadismo, inestabilidad genómica, envejecimiento prematuro, diabetes mellitus leve, estatura baja y predisposición a cáncer (linfomas y leucemias).

10 El síndrome de rotura de Nijmegen (NBS, OMIM 251260) es una enfermedad recesiva autosómica producida por mutaciones o pérdidas del gen nibrina. El síndrome se caracteriza por microcefalia, aspecto facial destructivo, retraso del crecimiento, retardo mental progresivo y fuerte predisposición a linfomas e infecciones del tracto respiratorio.

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

20 La anemia de Fanconi (FA, OMIM 227650) es una enfermedad recesiva autosómica caracterizada por un gran número de defectos del desarrollo, insuficiencias de la médula ósea y un aumento de mil veces en la incidencia de leucemias mieloides y una fuerte predisposición a desarrollar tumores sólidos. La frecuencia de desarrollo de la enfermedad entre los portadores de la mutación es 1:100.

25 La colitis ulcerosa es una enfermedad que afecta a uno de cada 100 españoles. Se cree que tiene un origen autoinmune en el que intervienen factores genéticos y medioambientales. La colitis ulcerosa afecta el intestino delgado y se caracteriza por inflamación crónica de la hoja colónica, con posterior ulceración, destrucción de la barrera mucosa y atrofia de la membrana mucosa del colon. El riesgo de cáncer aumenta con la duración de la enfermedad y se produce en numerosos órganos tales como el colon y linfomas.

30 Por otra parte, las consecuencias de la senescencia celular incluyen la aterosclerosis. Por otra parte, la disfunción telomérica está presente en vasos sanguíneos con placas ateroscleróticas. La reactivación de la telomerasa en células progenitoras vasculares aumenta esta capacidad de división celular y vasculogénesis. Una pérdida de estas células progenitoras contribuye a una importante disfunción vascular; por tanto, una terapia antisenescencia proporcionaría una nueva solución para paliar los efectos vasculares del envejecimiento y la aterosclerosis.

35 Finalmente, en relación con otras posibles aplicaciones del elemento GSE 24.4 de la invención, los inventores observan que pueden ser muy amplias una vez conocido el mecanismo, o uno de los mecanismos, por los que este elemento realiza su actividad biológica, y que se describe por primera vez en esta invención: mediante unión a la región NHEIII. En esta área hay pocos ejemplos de esta secuencia de polipurina en otros promotores, pero los inventores pueden destacar el hecho de que esta región de polipurina se localiza en las regiones promotoras de los genes CCR5 y PDGFA, entre otros. Por otra parte, se conocen pocos factores de transcripción que interactúen con este dominio, aunque los inventores deben destacar el péptido supresor de la metástasis nm23H1 (Yoshiro O y col., 2001; Grand y col., 2004). A este respecto, el elemento GSE 24.2 de la invención podría usarse como factor de supresión del crecimiento tumoral y la propagación de metástasis, una aplicación que es parte de esta invención.

40 Como se utiliza en esta invención, el término "enfermedad neurodegenerativa" se refiere a una enfermedad que pertenece, entre otras, a título ilustrativo, al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelosa y degeneración de la médula espinal.

50 Otro objeto de esta invención es una composición farmacéutica o fármaco para el tratamiento de enfermedades, trastornos o patologías que se desarrollan con alteraciones de la actividad de la telomerasa, preferentemente una reducción de la actividad, denominada en lo sucesivo composición farmacéutica de esta invención, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o agente que puede recuperar la actividad de la telomerasa junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, que puede estimular la generación y el mantenimiento de la actividad de la telomerasa.

55 Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en dichas

composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por aquellos expertos en la materia que son habitualmente usados en la preparación de composiciones terapéuticas.

5 En el sentido usado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del agente o compuesto que puede recuperar la actividad de la telomerasa, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características de los compuestos, incluyendo la edad y la condición del paciente, la gravedad de la alteración o trastorno, y la vía y frecuencia de administración.

10 En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada; para este fin, dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada para la vía de administración seleccionada. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se realiza por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, vía subcutánea, etc. Una revisión de las diferentes formas farmacéuticas para la administración de fármacos y los excipientes necesarios para obtenerlas puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

20 Otro objeto particular de esta invención es una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto o agente que puede recuperar la actividad de la telomerasa pertenece al siguiente grupo: secuencia, construcción genética o vector GSE 24.2 que permiten la expresión de una proteína o péptido que puede recuperar la actividad de la telomerasa en el interior de células de mamífero, preferentemente humano.

Una realización particular de la invención es una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto o agente que puede recuperar la actividad de la telomerasa es una o varias secuencias GSE 24.2 que pertenecen al siguiente grupo:

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

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

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

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

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

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

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

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

Otra realización particular de esta invención es la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos de c) es la secuencia SEQ ID NO12 o SEQ ID NO14.

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

10 Otro objeto de la invención es el uso de la composición farmacéutica de la invención, denominado en lo sucesivo uso de la composición farmacéutica de la invención, en un procedimiento de tratamiento o profilaxis de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad, trastorno o patología que se desarrolla con alteraciones de la actividad de la telomerasa que está constituido por la administración de dicha composición terapéutica en una dosis adecuada que permite la recuperación de la actividad de la telomerasa en el interior de sus células.

La composición farmacéutica de esta invención puede usarse en un procedimiento de tratamiento de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos.

15 Otro objeto particular de esta invención es el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o trastorno que se desarrolla con alteraciones de la actividad de la telomerasa que afecta a seres humanos, que pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas, disqueratosis congénita, síndrome del maullido (CdC, OMIM 123450), ataxia-telangiectasia (AT, OMIM 208900), síndrome de rotura de Nijmegen (NBS, OMIM 251260),
20 síndrome de Bloom (BS, OMIM 210900), síndrome de Werner (WS, OMIM 277900), anemia de Fanconi (FA OMIM 227650), colitis ulcerosa, envejecimiento vascular, aterosclerosis y cáncer.

25 Otra realización particular de esta invención es el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa que pertenece al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelosa y degeneración de la médula espinal.

Otra realización particular de esta invención es el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de la forma de disqueratosis congénita ligada al cromosoma X.

30 Otra realización particular de esta invención es el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de la disqueratosis congénita autosómica dominante.

Referencias bibliográficas

35 Bednarek A, Shilkaitis A, Green A, Lubet R., Kelloff G, Christov K y Aldaz M. 1999. Suppression of cell proliferation and telomerase activity in 4-(hydroxyphenyl)retinamide-treated mammary tumors. *Carcinogenesis*. 20(5): 879-Bessler M, Wilson DB, Mason PJ. 2004. Dyskeratosis congenita and telomerase. *Curr Opin Pediatr*. Feb; 16(1):23-8. Revisión.

Burger AM, Double JA and Newell DR. 1997. Inhibition of Telomerase Activity by Cisplatin in Human Testicular Cancer Cells. *Eur J Cancer*. 33(4): 638-44.

Cesare AJ and Griffith JD. 2004. Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol. Cell. Biol*. 24(22): 9948-9957.

40 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.

45 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.

50 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 and In Kwon CHUNG. 2003. Identification of a quinoxaline derivative that is a potent telomerase inhibitor leading to cellular senescence of human cancer cells. *Biochem J.* 15; 373(Pt 2): 523-9.
- 5 Lemarteleur T, Gomez D, Paterski R, Mandine E, Mailliet P, Riou JF. 2004. Stabilization of the c-myc gene promoter quadruplex by specific ligands' inhibitors of telomerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 22; 323(3): 802-8.
- Marrone A, Mason PJ. 2003. Dyskeratosis congenita. *Cell Mol Life Sci* 60(3): 507-17. Revisión.
- 10 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.
- 15 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 promoter activities of the human telomerase (hTERT) gene in normal and tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 263(2):361-5.
- 20 Pan H, Agarwalla S, Moustakas DT, Finer-Moore J, Stroud RM. 2003. Structure of tRNA pseudouridine synthase TruB and its RNA complex: RNA recognition through a combination of rigid docking and induced fit. *Proc Natl Acad Sci 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. Revisión.
- 25 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.
- 30 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 promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 3;99(18):11593-8.
- 35 Sirinavin C and 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.
- 40 Trowbridge AA, Sirinavin C and 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.
- 45 Yoshiro O, Tanaka M, Yoshii S, Nakaya NK, Sugimora 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.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 **Figura 1.- Estructura esquemática del complejo de la telomerasa.** Las proteínas hTERT, disquerina, p23, hsp90 y TEP1 junto con el ARN hTR constituyen el complejo ribonucleoproteínico de la telomerasa.
- 10 **Figura 2.- Viabilidad celular y activación de las rutas de muerte JNK y p38 en las líneas celulares 293T: pLNCX y 24.2, tratadas con cisplatino.** A) *Viabilidad celular.* Tras sembrar las células 293T: que expresaban vacío (pLNCX) y el GSE 24.2 (24.2) en placas de 24 pocillos, se incubaron con concentraciones entre 0-100 µg/ml de cisplatino. La viabilidad celular se midió por medio de la técnica del cristal violeta después de 72 horas de exposición al fármaco. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado. B) *Cinética de activación.* Tratamiento de ambas líneas celulares a las concentraciones de cisplatino indicadas en la Figura durante 6 horas. Posteriormente, se estudió la activación de JNK y p38 usando anticuerpos que reconocen específicamente las formas activas. Como control de carga se detectaron los niveles de JNK-1.
- 15 **Figura 3.- Esquema de las secuencias de la DSK contenidas en las construcciones usadas y secuencia de genes homólogos a la DSK.** A) Diagrama del ADNc de la disquerina que representa la región que se corresponde con GSE 24.2 que abarca los nucleótidos 268 a 433; también se muestra la localización de la construcción DSK 5'. B) Secuencia comparativa en aminoácidos del GSE 24.2 con secuencias de pseudouridina sintetas de otros organismos. Se indican los dominios conservados TRUB I y TRUB II.
- 20 **Figura 4.- Viabilidad de las líneas celulares 293T: pLNCX, 24.2, DSK5' y DSK tratadas con cisplatino.** Se han usado las líneas celulares anteriormente descritas (pLNCX y 24.2), la línea celular DSK 5' que expresa un fragmento de la disquerina descrita en la figura anterior y una cuarta que sobreexpresa el ADNc completo de la disquerina (DSK). La viabilidad se determinó como se muestra en la Figura 1A. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado.
- 25 **Figura 5.- Actividad de la telomerasa de las líneas celulares 293T: pLNCX y 24.2 tras el tratamiento con cisplatino.** Las células se sembraron en placas de 60 mm, pretratadas con 0,5 µg/ml de cisplatino durante 3 días y posteriormente se trataron con cisplatino a una dosis de 3 µg/ml (células sin pretratar). La actividad de la telomerasa se midió por medio del ensayo TRAPEze de Intergen. El experimento se realizó 3 veces con resultados similares.
- 30 **Figura 6.- Viabilidad celular y actividad de la telomerasa de las líneas celulares 293T: pLNCX y 24.2 tratadas con el inhibidor de la telomerasa I.** A) *Viabilidad celular.* Tras sembrar las células 293T: pLNCX y 24.2 en placas de 24 pocillos se incubaron con concentraciones entre 0-20 µM del inhibidor de la telomerasa I. La viabilidad celular se midió por medio de la técnica del cristal violeta después de 72 horas de exposición al fármaco. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado. B) *Actividad de la telomerasa a diferentes dosis del inhibidor de la telomerasa I.* Actividad de la telomerasa de las células 293T: 24.2 y pLNCX en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor de la telomerasa I (5-7 µM) durante 3 días. Las células se sembraron en placas de 60 mm y posteriormente se trataron a las concentraciones y tiempos especificados. La actividad de la telomerasa se midió por medio del ensayo TRAPEze de Intergen. C) *Actividad de la telomerasa a diferentes tiempos de tratamiento con el inhibidor de la telomerasa I.* Actividad de la telomerasa en presencia de TI I (5 µM) a 1 y 5 días. Las células se sembraron como en B. Posteriormente se trataron con 5 µM del inhibidor a los tiempos especificados.
- 35 **Figura 7.- Niveles de expresión de diferentes genes relacionados con la telomerasa en células 293T: pLNCX y 24.2 tras el tratamiento con cisplatino.** Se sembraron las células en placas de 60 mm, se trataron con 3 µg/ml de cDDP tras un pretratamiento de 0,5 µg/ml de cisplatino durante 3 días y posteriormente se recogieron a los tiempos especificados en la figura (3 y 7 días). Tras la extracción de ARN se realizó la RT-PCR con oligonucleótidos específicos para hTERT, hTR y disquerina con el fin de estudiar los niveles de expresión de los ARN mensajeros. Como control de ARN de partida se usaron oligonucleótidos para la amplificación de la GAPDH.
- 40 **Figura 8.- Actividad del promotor de hTERT en las líneas celulares 293T: pLNCX y 24.2 y en células 293T transfectadas transitoriamente con la construcción pLNCX-24.2 y el plásmido vacío pLNCX.** A) Tanto las células pLNCX como las 24.2 se transfectaron transitoriamente con 0,25 µg del vector indicador hTERT-luc. Las células se sembraron en placas de 60 mm. 24 horas después de la
- 45
- 50
- 55

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

Figura 9.- Actividad del promotor de hTERT tras el tratamiento con cisplatino. A) Tanto la línea celular pLNCX como la línea celular 24.2 se transfectaron transitoriamente con 0,25 µg del vector indicador hTERT-luc. 24 horas después de la transfección se trataron con 3 µg/ml de cisplatino durante 8 horas. Las células se sembraron en placas de 60 mm; 24 horas después de la transfección y tras el tratamiento con cDDP, las células se lisaron y se cuantificó la actividad de la luciferasa de 10 µg de proteína total. Como control de transfección, las células se cotransfectaron con un vector indicador CMV-Renilla. B) Las células 293T, después de transfectarse transitoriamente con pLNCX y 24.2, se cotransfectaron con 0,25 µg del vector indicador hTERT-luc y se trataron como en A. Después de sembrar las células como en A, se transfectaron con pLNCX y 24.2 y se cotransfectaron con el vector indicador hTERT-luc; posteriormente se trataron como en A. Como control de transfección se usó el vector indicador CMV-Renilla. Los datos se corresponden con la relación de unidades relativas de luciferasa con respecto a células no transfectadas. Cada punto representa con ± la desviación estándar obtenida de 3 experimentos independientes.

Figura 10.- Actividad de la telomerasa y niveles de expresión de hTERT y hTR en células de pacientes con disqueratosis congénita y en células VA13 transfectadas transitoriamente con el plásmido 24.2 o el vector vacío pLNCX. A) Actividad de la telomerasa medida por medio del ensayo TRAP en las células de pacientes con disqueratosis congénita (DC-1, DC-2 y DC-3) y en la madre portadora (DC-C) tras la electroporación de 45 µg del plásmido pLNCX vacío (-) o el vector pLNCX 24.2 (+) por 15 millones de células. B) RT-PCR de ARN de células de uno de los pacientes de disqueratosis congénita, DC3 transfectadas con el vector vacío y DC3 transfectadas con el plásmido 24.2 utilizando oligonucleótidos específicos para hTERT y hTR. Como control de ARN de partida se usaron los oligonucleótidos para la amplificación de la GAPDH. (C) Actividad de la telomerasa en células VA13. Las células se transfectaron transitoriamente con 16 µg del vector vacío pLNCX de control que expresa DKC o el péptido GSE 24.2 por millón de células. 24 horas después, la actividad de la telomerasa se analizó como se describe anteriormente usando diluciones de los extractos de proteínas de cada transfección. (D) Niveles de expresión de hTERT y hTR en células VA13 transfectadas con 16 µg de las diferentes construcciones por millón de células. Los niveles de ARN se detectaron como se describe anteriormente. Se usó GAPDH como control. En A, B, C y D, los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares. (E) Actividad del promotor de hTERT en células VA13. Las células se cotransfectaron con las construcciones especificadas (10 µg por millón de células) y con el indicador hTERT-luc (1 µg por millón de células). 24 h después de la transfección, la actividad de la luciferasa se determinó como se describe anteriormente. Se usó CMV-Renilla (0,1 µg/ml por millón de células) como control para la eficiencia de la transfección. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado.

Figura 11.- El péptido GSE 24.2 aumenta la actividad del promotor de hTERT regulado por c-MYC. (A) Las células 293T se cotransfectaron con diferentes construcciones (10 µg/ADN por millón de células) y el indicador hTERT-luc (1 µg por millón de células). (B) Las líneas celulares especificadas se cotransfectaron con el indicador hTERT-luc y diferentes cantidades del vector de expresión Mad/myc. (C) Las líneas celulares especificadas se cotransfectaron con el indicador HIV-luc y con diferentes cantidades del vector de expresión Mad/myc. 24 h después de la transfección, las células se estimularon con 50 ng/ml de TNF-α durante 6 horas y la actividad de la luciferasa se analizó como se describe anteriormente. Se usó CMV-Renilla (0,1 µg/ml por millón de células) como control para la eficiencia de la transfección. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado.

Figura 12.- La actividad promotora de c-MYC se induce por el péptido GSE 24.2. (A) Representación esquemática del promotor c-MYC que indica las diferentes construcciones usadas en los experimentos. (B) Las células 293T se cotransfectaron con los plásmidos especificados (10 µg/ADN por

millón de células) y con el indicador px3.2 c-MYC-luc (1 µg por millón de células). (C) Las líneas celulares especificadas se transfectaron con el indicador px3.2 c-MYC-luc (1 µg por millón de células). (D) Las líneas celulares especificadas se transfectaron con las diferentes construcciones del indicador c-MYC-luc (1 µg por millón de células). 24 horas después de la transfección, la actividad de la luciferasa se analizó como se especifica anteriormente. Se usó CMV-Renilla (0,1 µg/ml por millón de células) como control para la eficiencia de transfección. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado.

Figura 13.- La actividad del promotor c-MYC inducida por el péptido GSE 24.2 depende del elemento NHE III. (A) Representación esquemática de las mutaciones generadas en el elemento NHE III. (B) Las células 293T se cotransfectaron con diferentes construcciones (10 µg/ADN por millón de células) y con los diferentes mutantes del plásmido indicador px3.2 (1 µg por millón de células). (C) Las líneas celulares especificadas en la figura se transfectaron con los diferentes mutantes del indicador px3.2 (1 µg por millón de células). 24 h después de la transfección, la actividad de la luciferasa se analizó como se especifica anteriormente. Se usó CMV-Renilla (0,1 µg/ml por millón de células) como control para la eficiencia de transfección. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

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

1.1.- Identificación de la secuencia GSE denominada 24.2

La resistencia a quimioterapia es una de las mayores limitaciones en el tratamiento del cáncer. Con el fin de estudiar los mecanismos de resistencia a cisplatino, se aislaron secuencias de una librería de ADNc que conferían resistencia a cisplatino rastreando elementos de supresión de genes. Esta metodología que ha sido previamente descrita (Roninson y col., 1995) consiste en la expresión de construcciones de ADNc de una librería de placenta humana, normalizada con el fin de igualar la abundancia en expresión de genes. Se aislaron cerca de 100 clones diferentes que conferían resistencia a cisplatino. Después de amplificar los insertos de ADNc, se subclonaron en el plásmido pLNCX y se transfectaron de nuevo con el fin de asegurar que conferían resistencia. Uno de estos GSE era un fragmento de 165 pb denominado 24.2 (ver SEQ ID NO1) que se correspondía con una secuencia interna de la disquerina humana.

1.2.- Viabilidad de las líneas celulares 293T: pLNCX y 24.2 con respecto al cisplatino y activación de las vías mediadoras en la muerte celular JNK y p38

El plásmido pLNCX 24.2 que contiene GSE del mismo nombre se transfectó de forma estable en las células 293T y como control se transfectó el vector vacío pLNCX. Después de verificar por medio de PCR que la línea celular 24.2 contenía este inserto (datos no mostrados) se estudió la respuesta a cisplatino creando una curva de viabilidad con este fármaco. La Figura 2a muestra la curva de viabilidad de las dos líneas celulares en respuesta a diferentes dosis de cisplatino después de 72 horas. En ella los inventores observan que las células que expresan GSE 24.2 de forma estable presentan una mayor viabilidad en respuesta a cisplatino en comparación con las que expresan el vector vacío, especialmente a dosis bajas próximas a la dosis de selección de GSE. JNK y p38 son MAPK que se activan en respuesta a agentes genotóxicos (Sánchez-Pérez y col., 1998). La cinética de activación de estas dos proteínas en respuesta a cisplatino está relacionada con la capacidad de inducción de muerte celular; por este motivo se estudió la activación de estas quinasas en las dos líneas celulares (Figura 2b) y se observó que se requiere una mayor dosis de cisplatino para activar ambas quinasas en células que expresan GSE 24.2 de manera estable, sugiriendo así que la expresión del GSE 24.2 atenúa la señal de daño celular que activa ambas quinasas.

1.3.- Viabilidad de las líneas celulares 293T: pLNCX, DSK (Gene Bank NM 001363.2), DSK-5' y 24.2 en respuesta a cisplatino

Con el fin de estudiar si la sobreexpresión de la disquerina podría reproducir el aumento de la viabilidad celular en respuesta a cisplatino inducido por GSE 24.2 se generó una línea celular que sobreexpresaba de manera estable el ADNc completo de la disquerina (pLNCX DSK) También se transfectó una construcción que contenía un fragmento de la disquerina descrita en la Figura 3 a) que incluye la secuencia de GSE 24.2 con el fin de estudiar si el efecto es exclusivo de la región contenida en 24.2 o de una región mayor de la disquerina (pLNCX DSK-5'). La Figura 4 muestra la curva de viabilidad de las cuatro líneas celulares en respuesta a diferentes dosis de cisplatino. En ella observan los inventores que las células que expresan la construcción 24.2 (SEQ ID NO1) de forma estable presentan mayor viabilidad en respuesta a cisplatino en comparación con las que expresan el vector vacío, la disquerina completa (DSK) o el fragmento 5' de la disquerina (SEQ ID NO3). Por tanto, los inventores

pueden decir que el aumento de la viabilidad en respuesta a cisplatino está restringido a la secuencia de ADNc contenida en el fragmento GSE 24.2.

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

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

10 Para este fin se realizó un ensayo de actividad de la telomerasa usando el procedimiento TRAP con las líneas celulares pLNCX y pLNCX 24.2 (Figura 5) pretratándolas durante 3 días con 0.5 µg/ml de cisplatino; posteriormente se trataron con 3 µg/ml de cisplatino durante 3 y 7 días. El tratamiento de 3 días se realizó ya se había descrito que un inhibidor específico de telomerasa necesitaba actuar durante este tiempo para una inhibición eficiente de la enzima (Kim y col., 2003), (Bednarek y col., 1999), (Gowan y col., 2002). El tratamiento de 7 días en las células 293T pLNCX produjo la inhibición de la actividad de la telomerasa, mientras que durante este tiempo no se observó inhibición para la línea celular 24.2 (Figura 4). Puede concluirse que la expresión GSE 24.2 confiere resistencia a la inhibición de la actividad de la telomerasa producida por el cisplatino y esta inhibición es probablemente responsable de la mayor capacidad de supervivencia de estas células en respuesta al fármaco.

1.5.- Efecto del inhibidor de la telomerasa I en células pLNCX y 24.2

20 El inhibidor de la telomerasa I es un compuesto que forma G-cuádruples en los telómeros, inhibiendo así la actividad de la telomerasa (Thompson y col., 1997). Los inventores desearon estudiar el efecto de GSE 24.2 en respuesta al inhibidor de la telomerasa I. Para este fin se realizó una curva de viabilidad en la que las líneas celulares pLNCX y 24.2 se trataron con concentraciones crecientes del inhibidor de la telomerasa I (0-20 µM) durante 72 horas. En la Figura 6a) se observa que las células 24.2 son más resistentes al inhibidor de la telomerasa I que las parentales. Con el fin de comprobar si esta protección iba acompañada de cambios en la sensibilidad de la actividad de la telomerasa se estudió dicha actividad en las células pLNCX y pLNCX 24.2 tratadas con diferentes dosis de inhibidor de la telomerasa I durante 3 días (Figura 6b). Los inventores pueden observar que la inhibición de la actividad de la telomerasa en la línea celular pLNCX es mayor que en las células pLNCX 24.2. También se estudió la actividad de la telomerasa tratando las células pLNCX y pLNCX 4.2 con una dosis (5 µM) y a varios tiempos (0-5 días. Figura 6c). En este caso también se demostró que las células pLNCX 24.2 necesitan una mayor exposición al inhibidor con el fin de reducir la actividad de la telomerasa. Por tanto, los efectos observados para la actividad de la telomerasa y la supervivencia celular en ambas líneas celulares son comunes para el cisplatino y el inhibidor de la telomerasa I, sugiriendo así que el fragmento GSE 24.2 podría tener una función significativa en el mantenimiento de la estructura de los telómeros, al menos en parte, ya que puede prevenir la inhibición producida por el inhibidor de la telomerasa I.

1.6.- Efectos de cisplatino en los niveles de expresión de hTR, hTERT y disquerina en las líneas celulares pLNCX y 24.2

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

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

55 Como se observaron cambios en los niveles de expresión de hTERT en las células que expresaban el péptido GSE 24.2 en respuesta a cisplatino, los inventores decidieron estudiar si la expresión de la secuencia GSE 24.2 y las secuencias de fragmentos de la misma - que contienen el dominio Trub I (SEQ ID NO11) y Trub II (SEQ ID NO 13) - tenía algún efecto sobre la actividad del

promotor de hTERT. El dominio de pseudouridina sintasa TRUB de la disquerina comprende dos subdominios estructurales: los motivos Trub I y II (Zucchini y col., 2003). Estos dos dominios son críticos para mantener la estructura de la proteína global de disquerina. Además, el motivo II contiene al menos un residuo (asp125) que es esencial para la actividad enzimática. Para este fin, el vector indicador hTERT-luc que contiene una secuencia de 3.402 pb (Song y col., 1999) del promotor de hTERT humano se transfeció en las líneas celulares: pLNCX 24.2 y pLNCX. La Figura 8a) muestra que en la línea celular pLNCX 24.2 la actividad del promotor de hTERT es mayor que en las células que expresan el vector vacío (pLNCX). Se realizó el mismo experimento expresando transitoriamente GSE 24.2 en las células 293T (Figura 8b) y se observó que la expresión de GSE 24.2 también aumenta la actividad del promotor de hTERT en comparación con las células transfectadas con el vector vacío. Por otra parte, este experimento se realizó con dos fragmentos de GSE 24.2 que contenían cada uno de los dominios Trub I (SEQ ID NO11) y Trub II (SEQ ID NO13), respectivamente, con el fin de identificar la secuencia más pequeña con actividad similar a la del fragmento GSE 24.2 (Figura 8c). Los resultados muestran que la secuencia contenida en GSE 24.2, las secuencias con dominios Trub, actúan activando la expresión del promotor de hTERT.

Además, la secuencia del gen CBF5 de levadura, CBF5 de *S. cerevisiae*, una secuencia equivalente a la de GSE 24.2 (Figura 3b), se subclonó en el vector pLNCX y se observó que la expresión de dicha construcción aumentó la actividad de hTERT, pero no la del promotor de hTR (datos no mostrados), indicando un alto grado de conservación funcional en la actividad de este dominio de disquerina.

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

Después de observar que la expresión de GSE 24.2 retrasó la inhibición de la expresión de hTERT inducida por el cisplatino se estudió si el tratamiento con cisplatino tenía algún efecto sobre el promotor de dicho gen y si la expresión del GSE 24.2 influía sobre este último. Para este fin se transfectaron las células pLNCX y pLNCX 24.2 con el vector indicador hTERT-luc. 24 horas después de la transfección se trataron con 3 µg/ml de cisplatino durante 8 horas y se ensayó la actividad de la telomerasa (Figura 9a). Puede observarse que la inducción de la actividad del promotor en las células pLNCX 24.2 es 4 veces superior a la de en las células pLNCX tras el tratamiento con cisplatino. Se realizó el mismo experimento expresando transitoriamente GSE 24.2 y comparándolas con las células 293T transfectadas con el vector vacío pLNCX. En este caso, la actividad de las células que expresaban GSE 24.2 era superior a la actividad inicial tras el tratamiento con cisplatino.

Ejemplo 2.- El fragmento NHEIII del promotor del gen c-MYC es la diana del péptido GSE 24.2.

El promotor de hTERT contiene dos regiones de caja E (CACGTG), sitios de unión a heterodímeros de myc/max (Oh y col., 1999; Wu y col., 1999), además de cinco regiones sp1. Con el fin de estudiar si la activación del promotor de hTERT por el péptido GSE 24.2 tiene lugar mediante esta caja E, se transfeció una molécula híbrida que contenía este dominio de unión a ADN de c-myc y el dominio de transactivación mad, que pudo inhibir la unión a esta caja E, inhibiendo la transcripción dependiente de c-myc. Las células de control y las células que expresan la proteína disquerina (DKC) y el péptido GSE 24.2 se transfectaron con cantidades en aumento de dicha molécula híbrida. La expresión de la proteína de fusión mad/myc inhibió la actividad inicial del promotor de hTERT en un modo dependiente de la dosis, tanto en el grupo de control como en las células DKC. Además, la expresión de la proteína de fusión myc/mad pudo bloquear la transcripción mediada por el péptido GSE 24.2 en las células GSE 24.2, sugiriendo así que la activación de la transcripción de hTERT inducida por GSE 24.2 depende de c-myc (Figura 11b). Esta inhibición fue específica, ya que la transfección de la construcción myc/mad conjuntamente con un promotor dependiente de NFκB (HIVLuc) no afectó la transcripción tras la estimulación con TNFα en cualquiera de las líneas celulares (Figura 11c).

La transcripción del gen c-myc está controlada por dos promotores diferentes y parece estar reprimida por un dominio hipersensible a ADNsa localizado entre los promotores P0 y P1 (NHEIII). Por tanto, se usaron cuatro construcciones diferentes que contenían 3,2 kb del punto de inicio de la transcripción de c-myc unido al gen luciferasa (Figura 12a). Este plásmido (px3.2myc) se transfeció en las células de control y en las células GSE 24.2 y se observó un aumento de tres veces en la actividad en el último grupo de células (Figura 12b). Se obtuvo un resultado similar cuando las células se transfectaron en células 293T con el vector pLNCX o con el plásmido que expresa el péptido GSE 24.2 conjuntamente con el indicador px3.2myc (Figura 12c).

Ambos resultados indicaron que este fragmento interno de disquerina (GSE 24.2) podía activar la transcripción del gen c-myc. Por tanto, este factor de transcripción, c-myc, debería activar la transcripción de hTERT. Por tanto, se usaron tres mutantes delecionados en el promotor de c-myc para definir la región necesaria para el péptido GSE 24.2 para realizar su actividad inductora. De todos los mutantes usados,

sólo aquellos contenidos en la región distal de los promotores P1 y P0, que incluyen el dominio NHEIII, pudieron mantener la transcripción en las células de GSE 24.2, pero no en las células de control (Figura 12d), indicando así que la región proximal del promotor P2 no es necesaria para la actividad del péptido GSE 24.2.

- 5 Como la región NHEIII se ha descrito como un inhibidor de la transcripción de c-myc, varios mutantes de la región NHEIII se construyeron mediante modificación de guaninas de la región rica en purina. Las 27 guaninas presentes en la región NHEIII participan en el mantenimiento de la estructura secundaria de los G-cuádruples de la región rica en purina (Pu27). Se mutaron los siguientes: G12A, localizado en la segunda guanina del segundo cuartete; G17A, en el segundo triplete de las guaninas; y, finalmente, dos guaninas consecutivas (G26A/G27A) en el extremo de la región rica en purina (Figura 13a). Estas construcciones de promotores se transfectoron en células que expresan o el vector vacío o los vectores que contienen la proteína DKC o el péptido GSE 24.2. Los resultados indican que sólo el promotor WT px3.2 myc podía ser activado cuando se transfectaba con GSE 24.2. Los tres mutantes en la región Pu27 se activaron por medio de GSE 24.2, aunque a niveles muy bajos (Figura 13b).
- 10
- 15
- 20
- Interesantemente, la transfección del mutante doble de G en las células de control o aquellas que expresan DKC pudo mostrar un aumento de actividad en el promotor, indicando que esta región es importante para mantener una conformación que reprime el promotor. Se obtuvieron resultados similares en ensayos de transfección transitorios en células 293T cuando los diferentes mutantes se transfectoron con el vector vacío, con la proteína DKC o el péptido GSE 24.2 (Figura 13c). En resumen, estos resultados sugieren que el péptido GSE 24.2 puede modificar la estructura secundaria de la región Pu27 hacia una conformación activa, permitiendo así la transcripción del gen c-myc.

Ejemplo 3.- Expresión del GSE 24.2 en células de pacientes con la forma de disqueratosis congénita ligada al cromosoma X

- 25 Como en la forma de disqueratosis congénita ligada al cromosoma X hay defectos en la actividad de la telomerasa, con bajos niveles de ARN de telomerasa se probó el efecto de la expresión de este GSE 24.2 en células de pacientes con disqueratosis congénita. Para este fin, células de pacientes con disqueratosis congénita (DC-1, DC-2, DC-3) y células de la madre portadora (DC-C) disponibles se transfectoron con el vector GSE 24.2 o con el vector vacío. Estas células son mortales y normalmente envejecen en cultivo. 24 horas después de la transfección se midió la actividad de la telomerasa y se observó un aumento de la actividad de la telomerasa tanto en las células de la madre portadora como en las células de pacientes con disqueratosis congénita cuando se expresa el fragmento GSE 24.2 (Figura 10a). Curiosamente no se observó un aumento en la actividad de la telomerasa con la expresión de la disquerina completa (datos no mostrados). Por otra parte, los niveles de hTR son bajos en las células DC que expresan una forma mutada del gen de disquerina (Mochizuki y col., 2004). Se investigó si este aumento en la actividad era consecuencia de un aumento en la expresión de alguno de los componentes del complejo de la telomerasa, hTERT y hTR. Para este fin se realizó un ensayo de RT-PCR 24 horas después de la transfección utilizando oligonucleótidos específicos para hTERT y hTR. (Figura 10b) y en ambos casos se observó un aumento en los niveles de expresión tras la expresión del GSE 24.2.
- 30
- 35

- 40 Además, la expresión del péptido GSE 24.2 de la invención en la línea celular VA13 deficiente en telomerasa (Cesare y Griffith, 2004) pudo recuperar la actividad de la telomerasa (Figura 10c), y la expresión de los ARN de hTERT y hTR (Figura 10d). En esta línea celular, la expresión del motivo I del péptido GSE 24.2 (con una menor eficiencia) y el fragmento del gen CBF5 de levadura activaron adicionalmente el promotor de hTERT (Figura 10e). En resumen, los resultados indican que el péptido GSE 24.2 pudo recuperar la actividad de la telomerasa en ambas líneas celulares.

45 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

- Construcciones y líneas celulares.** Las líneas celulares de pacientes de disqueratosis congénita ligada al cromosoma X se obtuvieron del Corriel Cell Repository y se guardaron en RPMI + SBF al 20%. La línea VA13 se obtuvo del Dr. M Serrano. La familia DKC fue descrita clínicamente (Sirinavin y col., 1975; Trowbridge y col., 1977) y los individuos afectados presentan sustitución de un aminoácido T66A (datos no mostrados) (DC-1, DC-2, DC-3). La línea celular de la madre portadora (DC-C) expresa un ARN mensajero sin mutación (datos no mostrados). Estas células se cultivaron en RPMI (Gibco) complementado con suero fetal bovino al 20% (Gibco) y 2 mM de glutamina.
- 50

- La construcción DSK contiene el ADNc completo de la disquerina humana y la construcción DSK 5' (SEQ ID N05) contiene los primeros 500 nucleótidos de la disquerina humana. Ambas construcciones, al igual que GSE 24.2 (SEQ ID N01), se clonaron en el sitio ClaI del plásmido pLNCX (BD Biosciences Clontech).
- 55

Las células derivadas de pacientes con DC y sus controles respectivos se transfectoron

transitoriamente por medio de electroporación utilizando 3 µg de la construcción pLNCX o pLNCX 24.2 por millón de células.

5 La línea celular 293T se obtuvo de la Colección americana de cultivos tipo y las células se cultivaron en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) (Gibco) complementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco) y 2 mM de glutamina. Esta línea celular se transfirió de forma estable usando el procedimiento de cloruro cálcico, 10 µg de plásmido por millón de células. Estas células se
10 cotransfectaron con pBABEpur, 1 µg de vector por millón de células. 24 horas después de la transfección las células se trataron con puromicina con el fin de seleccionar clones estables. Se confirmó que las células expresaban el fragmento GSE 24.2 de forma estable por medio de PCR del ADN genómico (datos no mostrados).

La construcción hTERT-luc se clonó en el plásmido básico pGL3 (Promega) y ha sido proporcionada por Tae Kook Kim (Kim y col., 1999).

Fármacos. Tanto el cisplatino como el inhibidor de la telomerasa I se obtuvieron de Calbiochem y se usaron a las dosis especificadas en cada figura.

15 **Ensayo de actividad de la telomerasa basado en el procedimiento TRAP** (Wright y col., 1995). La actividad de la telomerasa se midió usando el kit de detección de telomerasa TRAPeze (Intergen) según el manual de instrucciones. La concentración de proteína de cada extracto se cuantificó por medio del procedimiento de Bradford usando el reactivo de BIORAD y después de realizar una PCR según las instrucciones del manual; con los productos de reacción se realizó una electroforesis en gel de
20 poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes y posteriormente se tiñó con bromuro de etidio durante 30 minutos.

Extracción de proteína total. Las células se lisaron después de lavarlas con PBS con el fin de eliminar residuos del medio. El tampón de lisis se preparó según protocolos estándar y se añadieron los inhibidores de proteínas: ABSF, ortovanadato, leupeptina, pepstatina A, aprotinina y DTT (Sigma).
25 Posteriormente, los extractos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. El contenido de proteína total se determinó por medio del procedimiento de Bradford usando el reactivo de BIORAD.

Transferencia Western y anticuerpos. Se separaron 20 µg de proteína en geles de SDS-poliacrilamida; posteriormente, se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore) mediante transferencia en húmedo. Las membranas se bloquearon en una solución de BSA al 5% o en leche desnatada al 5% en TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) Tween-20 al 0,1% (Sigma). Las membranas se incubaron con los anticuerpos correspondientes. Los anticuerpos secundarios usados fueron anti-ratón/conejo (Biorad), conjugado directamente con peroxidasa. La detección se realizó mediante el procedimiento de ECL (Pharmacia) como se especifica en el manual de instrucciones.

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

Expresión de genes mediante RT-PCR. La extracción del ARN total de las células se realizó usando el reactivo trizol (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción se transcribieron 2 µg de ARN total a ADNc usando la transcriptasa inversa M-Mlv (Promega).

40 Se usaron los siguientes oligonucleótidos:

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

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

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

Oligonucleótido D: 5'-GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGAAG-3' (SEQ ID NO8) para hTR;

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

Oligonucleótido F: 5'-CCCCTTCAATAGCATTGTGC-3' (SEQ ID NO10) para disquerina.

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

5 **Ensayo de luciferasa.** La regulación transcripcional de hTERT se midió por medio del gen indicador luciferasa, precedido de una secuencia de 3.402 pb del promotor de hTERT. 24 horas después de la transfección, las células se lisaron con el tampón comercial Reporter Lysis Buffer (Promega). Los lisados celulares se centrifugaron y la expresión de luciferasa se cuantificó con 10 µg de proteína del sobrenadante usando un luminómetro Berthold. Como control de transfección se usó una construcción del promotor de CMV seguido del gen renilla. La actividad de la luciferasa se expresa por microgramo de proteína y se normaliza usando la luminiscencia de la renilla en el mismo extracto.

10 **Curvas de crecimiento.** La viabilidad celular se estudió por medio de la técnica del cristal violeta. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se trataron con diferentes concentraciones del fármaco correspondiente, especificadas en las figuras. Después 72 horas de incubación, las células se fijaron con glutaraldehído al 1% durante 15 minutos y después de ser lavadas con PBS se tiñeron con 0,1% del agente colorante cristal violeta. El agente colorante asociado a las células se eliminó con una disolución de ácido acético al 10%. El número de células se determinó estimando la absorbancia a 595 nm. En las figuras se muestra el % de viabilidad con respecto a las células sin someter a tratamiento y se representa la media de 2 experimentos realizados por cuadruplicado con las desviaciones correspondientes.

15 **Mutagénesis dirigida.** Las mutaciones específicas de guanina en la región NHEIII del promotor del gen c-myc, px3.2, se realizaron usando el kit de mutagénesis dirigida Quickchange X-L (Stratagene) según las instrucciones del fabricante.

20 Listado de secuencias

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

<120> Secuencia GSE 24.2

<130> GSE 24.2

<160> 14

25 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 165

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(165)

<223> Secuencia GSE 24.2

<400> 1

ggg	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			

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

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

35

<210> 2

<211> 55

<212> PRT

5 <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

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(495)

15 <400> 3

ES 2 360 238 T3

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 aaa gtt gct aag ttg gac	144
Ala Glu Glu Phe Leu Ile Lys Pro Glu Ser Lys Val Ala Lys Leu Asp	
35 40 45	
acg tct cag tgg ccc ctt ttg cta aag aat ttt gat aag ctg aat gta	192
Thr Ser Gln Trp Pro Leu Leu Leu Lys Asn Phe Asp Lys Leu Asn Val	
50 55 60	
agg aca aca cac tat aca cct ctt gca tgt ggt tca aat cct ctg aag	240
Arg Thr Thr His Tyr Thr Pro Leu Ala Cys Gly Ser Asn Pro Leu Lys	
65 70 75 80	
aga gag att ggg gac tat atc agg aca ggt ttc att aat ctt gac aag	288
Arg Glu Ile Gly Asp Tyr Ile Arg Thr Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys	
85 90 95	
ccc tct aac ccc tct tcc cat gag gtg gta gcc tgg att cga cgg ata	336
Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val Val Ala Trp Ile Arg Arg Ile	
100 105 110	
ctt cgg gtg gag aag aca ggg cac agt ggt act ctg gat ccc aag gtg	384
Leu Arg Val Glu Lys Thr Gly His Ser Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val	
115 120 125	
act ggt tgt tta atc gtg tgc ata gaa cga gcc act cgc ttg gtg aag	432
Thr Gly Cys Leu Ile Val Cys Ile Glu Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys	
130 135 140	
tca caa cag agt gca ggc aaa gag tat gtg ggg att gtc cgg ctg cac	480
Ser Gln Gln Ser Ala Gly Lys Glu Tyr Val Gly Ile Val Arg Leu His	
145 150 155 160	
aat gct att gaa ggg g	496
Asn Ala Ile Glu Gly	
165	

<210> 4

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 360 238 T3

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> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido A para hTERT

<400> 5

cggaagagtg tctggagcaa 20

10 <210> 6

- <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- 5 <223> Oligonucleótido B para hTERT
 <400> 6
 ggatgaagcg gagtcgga 18
 <210> 7
 <211> 26
- 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido C para hTR
 <400> 7
- 15 tctaacccta actgagaagg gcgtag 26
 <210> 8
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Oligonucleótido D para hTR
 <400> 8
 gtttgctcta gaatgaacgg tggaag 26
 <210> 9
- 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido E para disquerina
- 30 <400> 9
 atggcggatg cggaagtaat t 21
 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial
 <220>


```

<223> Oligonucleótido F para disquerina
<400> 10
cccttcaat agcattgtgc      20
<210> 11
5 <211> 54
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(54)
<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(50)
<223> Dominio Trubl
15 <400> 11

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

    gta gcc
    Val Ala
<210> 12
<211> 18
<212> PRT
20 <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
25 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(75)
30 <220>

```

<221> misc_feature

<222> (4)..(50)

<223> Dominio Trub II

<400> 13

5 cac agt ggt act ctg gat ccc aag gtg act ggt tgt tta atc gtg tgc 48

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

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

10 <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

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de nucleótidos que está constituida por SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos codificada por dicha secuencia de nucleótidos.
- 5 2. Secuencia de nucleótidos caracterizada porque permite la expresión de una proteína o péptido que induce la recuperación de actividad de la telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humano, y porque está compuesta por una o varias secuencias de nucleótidos que pertenecen al siguiente grupo:
 - a) una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1,
 - b) variantes biológicamente activas de la secuencia de (a), y
 - 10 c) un fragmento de cualquiera de las secuencias de (a) o (b).
3. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 2, caracterizada porque es una secuencia de ADN, ADNc o ARNm.
4. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 2, caracterizada porque la secuencia de
 - a) está constituida por SEQ ID NO: 1.
- 15 5. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 2, caracterizada porque la secuencia de b) está constituida por SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13.
6. Construcción genética caracterizada porque comprende una o varias secuencias de nucleótidos que están constituidas por al menos una secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 2 a 5.
- 20 7. Vector de expresión caracterizado porque comprende una secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 3 a 5, o una construcción genética según la reivindicación 6.
8. Vector de expresión según la reivindicación 7, caracterizado porque el vector de expresión es el plásmido pLNCX 24.2.
- 25 9. Proteína o péptido, caracterizado porque induce actividad de la telomerasa en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humano, y porque está compuesta por una o varias secuencias de aminoácidos que pertenecen al siguiente grupo:
 - a) una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2,
 - b) variantes biológicamente activas de la secuencia de (a), y
 - c) un fragmento de cualquiera de las secuencias de (a) o (b).
- 30 10. Proteína según la reivindicación 9, caracterizada porque la secuencia de aminoácidos de a) está constituida por SEQ ID NO: 2.
11. Proteína según la reivindicación 9, caracterizada porque la secuencia de aminoácidos de c) es SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14.
- 35 12. Células eucariotas o procariotas genéticamente modificadas, caracterizadas porque comprenden la secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 2 a 5, la construcción según la reivindicación 6 o el vector de expresión según las reivindicaciones 7 y 8, en las que puede expresarse adecuadamente el péptido o proteína según las reivindicaciones 9 a 11.
- 40 13. Células eucariotas humanas genéticamente modificadas, caracterizadas porque comprenden la secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 2 a 5, la construcción según la reivindicación 6 o el vector de expresión según las reivindicaciones 7 y 8, en las que puede expresarse adecuadamente el péptido o proteína según las reivindicaciones 9 a 11.
14. Uso de la secuencia de nucleótidos, la construcción, el vector, la proteína o la célula según las reivindicaciones 1 a 13 para la preparación de un fármaco o composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad producida por una alteración de, preferentemente una reducción en, la actividad de la telomerasa.
- 45 15. Uso según la reivindicación 14, caracterizado porque la enfermedad pertenece al siguiente grupo: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y disqueratosis congénita.

16. Composición farmacéutica o fármaco para el tratamiento de enfermedades, trastornos o patologías producidos por una reducción en la actividad de la telomerasa, caracterizada porque comprende un compuesto o agente que puede recuperar la actividad de la telomerasa según la reivindicación 1.
- 5 17. Composición farmacéutica o fármaco para el tratamiento de enfermedades, trastornos o patologías producidos por una reducción en la actividad de la telomerasa, caracterizada porque comprende un compuesto o agente que puede recuperar la actividad de la telomerasa, caracterizado porque el compuesto comprende una o varias secuencias que pertenecen al siguiente grupo o la secuencia de aminoácidos codificada por dicha secuencia de nucleótidos:
- 10 a) una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1,
 b) variantes biológicamente activas de la secuencia de (a),
 c) un fragmento de cualquiera de las secuencias de (a) o (b), y
 d) una secuencia de nucleótidos que comprende cualquier secuencia que pertenece a (a), (b) o (c).
- 15 18. Composición farmacéutica según la reivindicación 16 ó 17, caracterizada porque el compuesto o agente que induce actividad de la telomerasa pertenece al siguiente grupo: secuencia de nucleótidos, construcción genética, vector de expresión, proteína o célula, según las reivindicaciones 2 a 13.
19. Composición farmacéutica según la reivindicación 17 ó 18, caracterizada porque la secuencia de nucleótidos de a) está constituida por SEQ ID NO: 1.
- 20 20. Composición farmacéutica según la reivindicación 17 ó 18, caracterizada porque la secuencia de nucleótidos de c) es SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13.
21. Composición farmacéutica según la reivindicación 18, caracterizada porque el compuesto es una construcción genética según la reivindicación 6.
- 25 22. Composición farmacéutica según la reivindicación 18, caracterizada porque el compuesto es un vector de expresión según las reivindicaciones 7 y 8.
23. Composición farmacéutica según la reivindicación 22, caracterizada porque el vector es el plásmido pLNCX 24.2.
24. Composición farmacéutica según la reivindicación 18, caracterizada porque el compuesto es una proteína según las reivindicaciones 9 a 11.
- 30 25. Composición farmacéutica según la reivindicación 24, caracterizada porque la proteína pertenece al siguiente grupo:
- a) una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2,
 b) variantes biológicamente activas de la secuencia de (a),
 c) un fragmento de cualquiera de las secuencias de (a) o (b), y
- 35 d) una secuencia de aminoácidos que comprende cualquier secuencia que pertenece a (a), (b) o (c).
26. Composición farmacéutica según la reivindicación 25, en la que la secuencia de aminoácidos de a) es SEQ ID NO: 2.
- 40 27. Composición farmacéutica según la reivindicación 25, en la que la secuencia de aminoácidos de c) es SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14.
28. Composición farmacéutica según la reivindicación 18, caracterizada porque el compuesto es una célula, preferentemente humana, transformada por la secuencia, construcción o vector según las reivindicaciones 2 a 8.
- 45 29. Uso de la composición farmacéutica según las reivindicaciones 16 a 25 para la preparación de un fármaco para el tratamiento o la profilaxis para un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad, trastorno o patología que se desarrolla con alteraciones de, preferentemente una reducción en, la actividad de la telomerasa, estando constituida la administración de dicha composición

terapéutica por una dosis adecuada que hace posible recuperar la actividad de la telomerasa en el interior de sus células.

- 5 30. Uso de la composición farmacéutica para la preparación de un fármaco según la reivindicación 29, caracterizado porque la enfermedad que se desarrolla con alteraciones de la actividad de la telomerasa y que afecta a seres humanos pertenece al siguiente grupo: envejecimiento o aceleración del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas, disqueratosis congénita, síndrome del maullido, ataxia-telangiectasia, síndrome de rotura de Nijmegen, síndrome de Bloom, síndrome de Werner, anemia de Fanconi, colitis ulcerosa, envejecimiento vascular, aterosclerosis y cáncer.
- 10 31. Uso de la composición farmacéutica para la preparación de un fármaco según la reivindicación 30, caracterizado porque la enfermedad neurodegenerativa pertenece al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelosa y degeneración de la médula espinal.
32. Uso de la composición farmacéutica para la preparación de un fármaco según la reivindicación 30, caracterizado porque la enfermedad es cáncer.
- 15 33. Uso de la composición farmacéutica para la preparación de un fármaco según la reivindicación 30, caracterizado porque la disqueratosis congénita es la forma de disqueratosis congénita ligada al cromosoma X o disqueratosis congénita autosómica dominante.

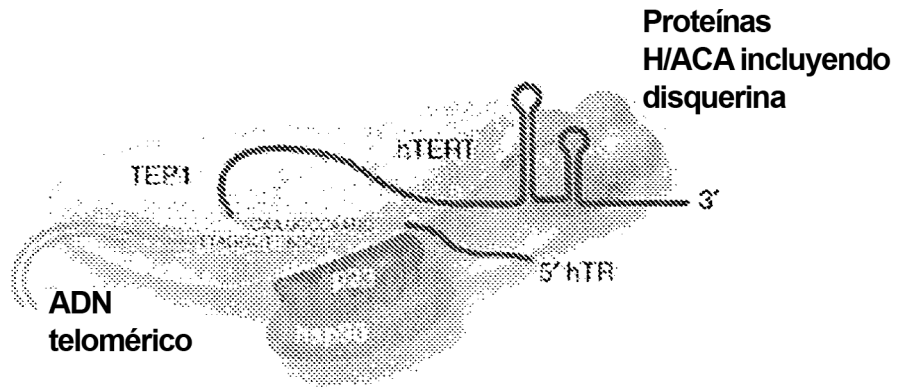
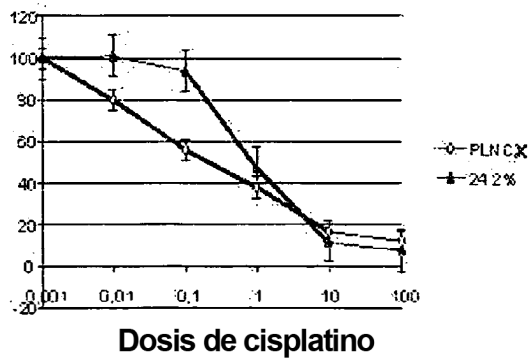


Fig 1

A)



B)

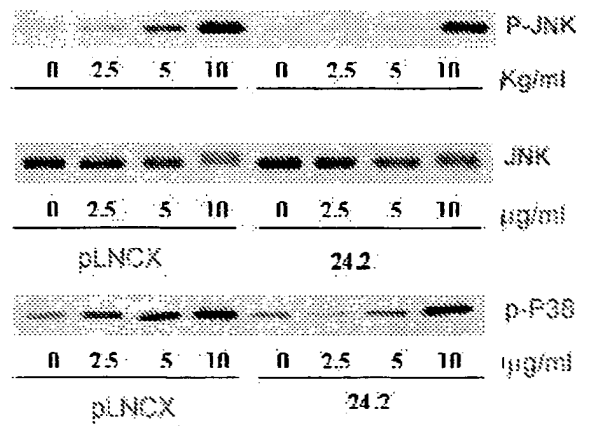
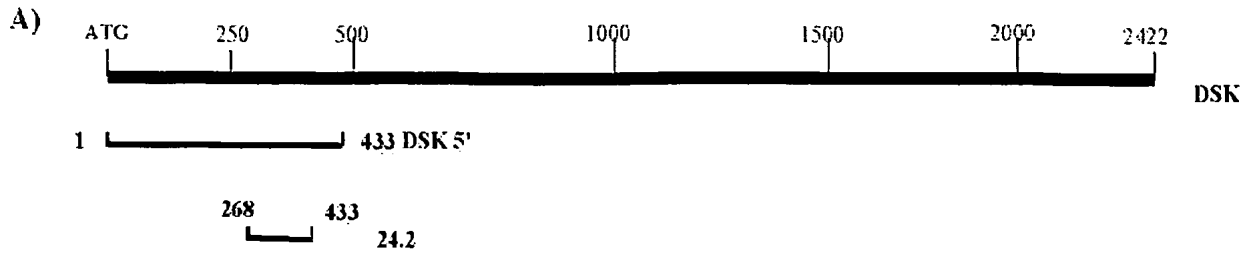


Fig 2



B)

	TruB	TruB
Humano	90	<u>GFINLDKPSNPSSHE VVAWIRRLRVEKTGHSGTLDPKVTGCLIVCIERATRLV</u> 143
Mus musculus	90	<u>GFINLDKPSNPSSHEVVAWIRRLRVEKTGHSGTLDPKVTGCLIVCIERATRLV</u> 144
Rattus norvegicus	91	<u>GFINLDKPSNPSSHEVVAWIRRLRVEKTGHSGTLDPKVTGCLIVCIERATRLV</u> 145
Drosophila melanogaster	88	<u>GFINLDKPSNPSSHE VVAWIRRLRVEKTGHSGTLDPKVTGCLIVCIERATRLV</u> 141
Danio rerio	85	<u>GFINLDKPSNPSSHE VVAWIRRLRVEKTGHSGTLDPKVTGCLIVCIERATRLV</u> 139
Saccharomyces cerevisiae	59	<u>GFINLDKPSNPSSHE VVAWIRRLRVEKTGHSGTLDPKVTGCLIVCIERATRLV</u> 113

Fig 3

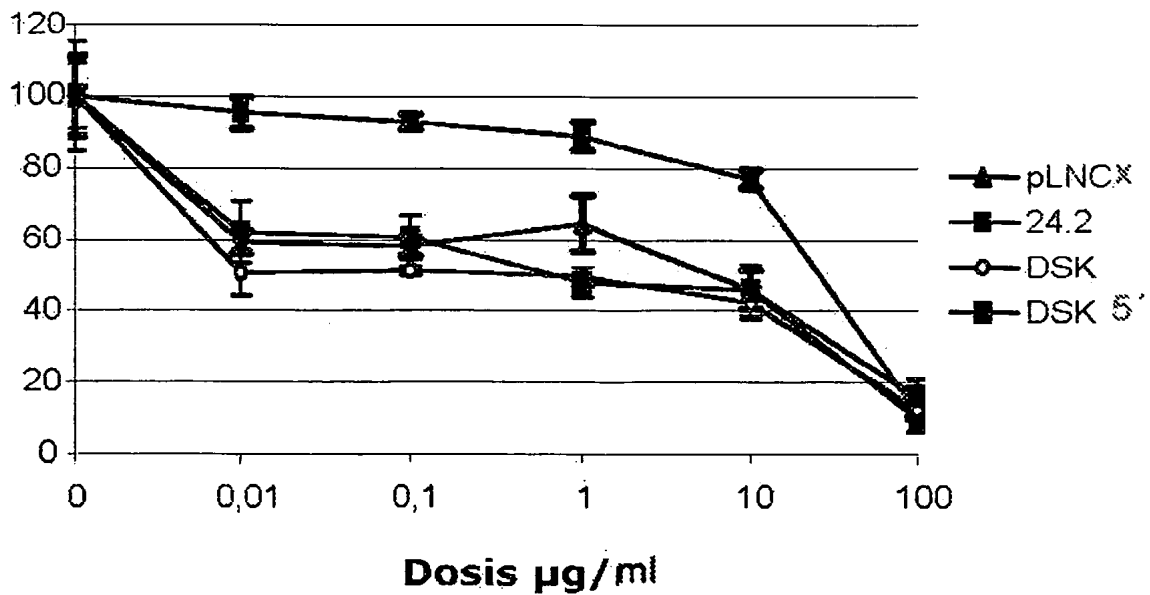


Fig 4

Líneas celulares	PLNCX				24,2				
	3		7 d		3		7 d		
T ₀	-	+	-	+	T ₀	-	+	-	+

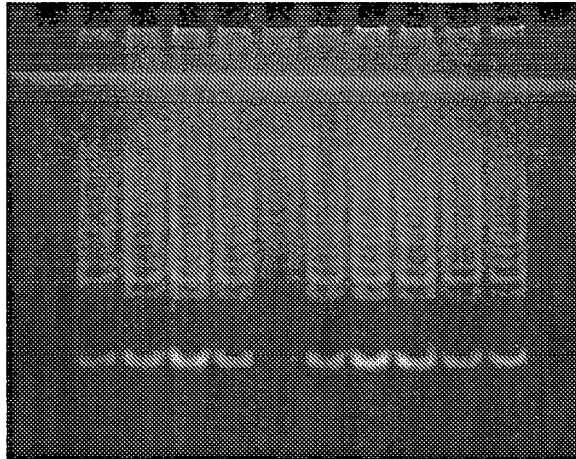


Fig 5

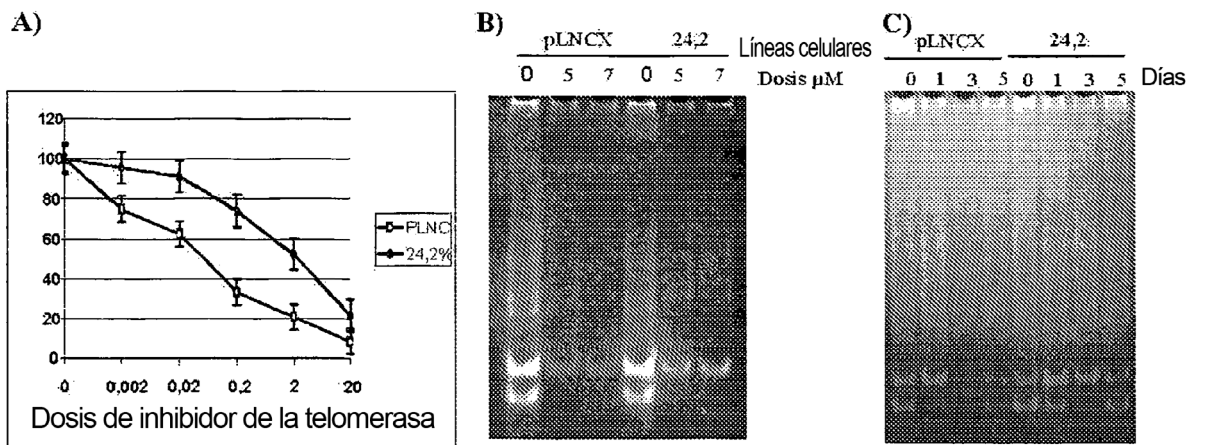


Fig 6

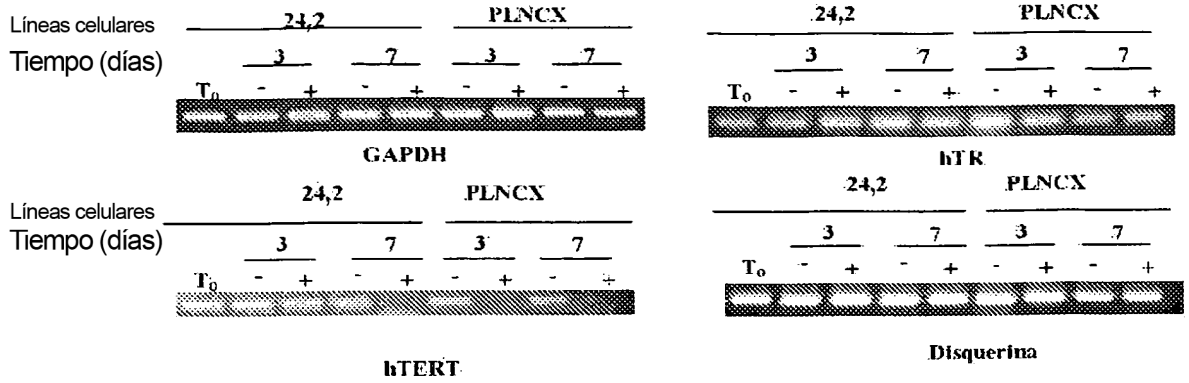


Fig 7

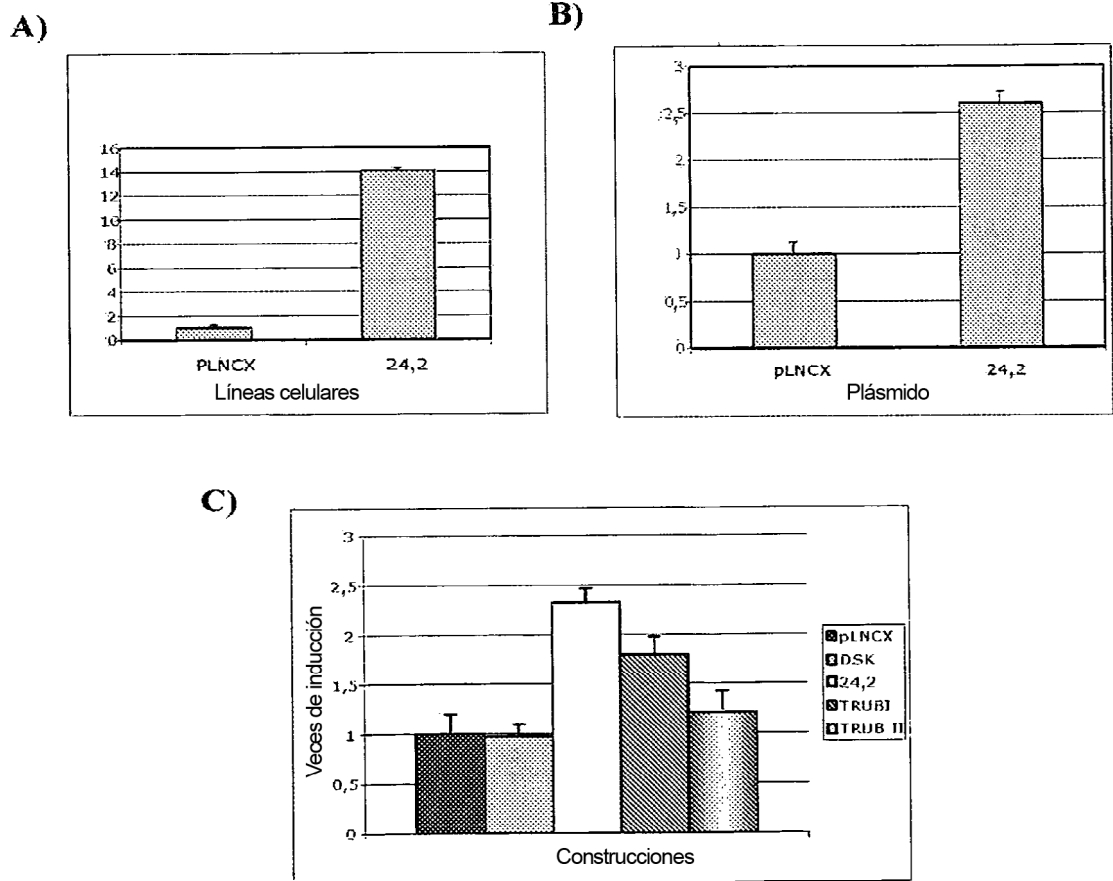
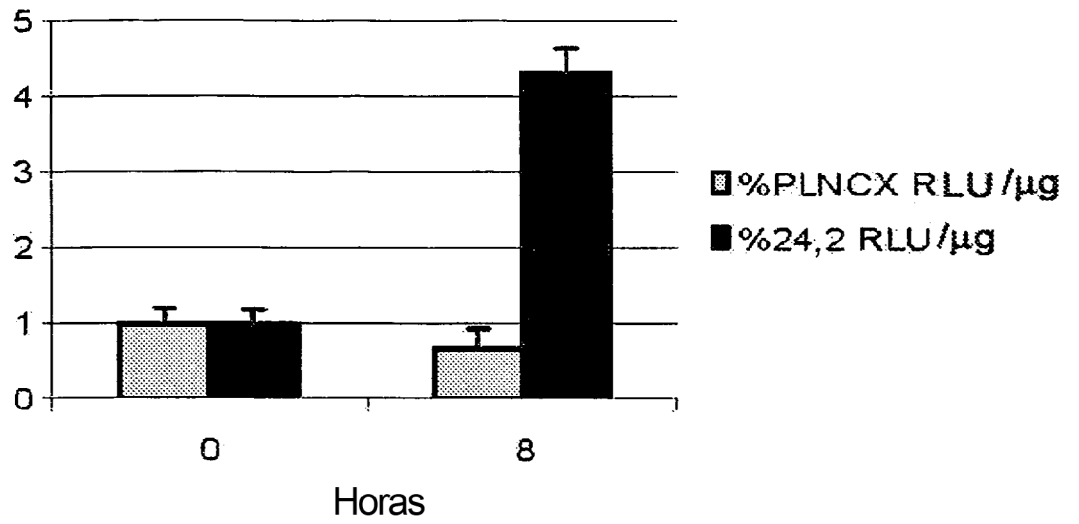


Fig 8

A)



B)

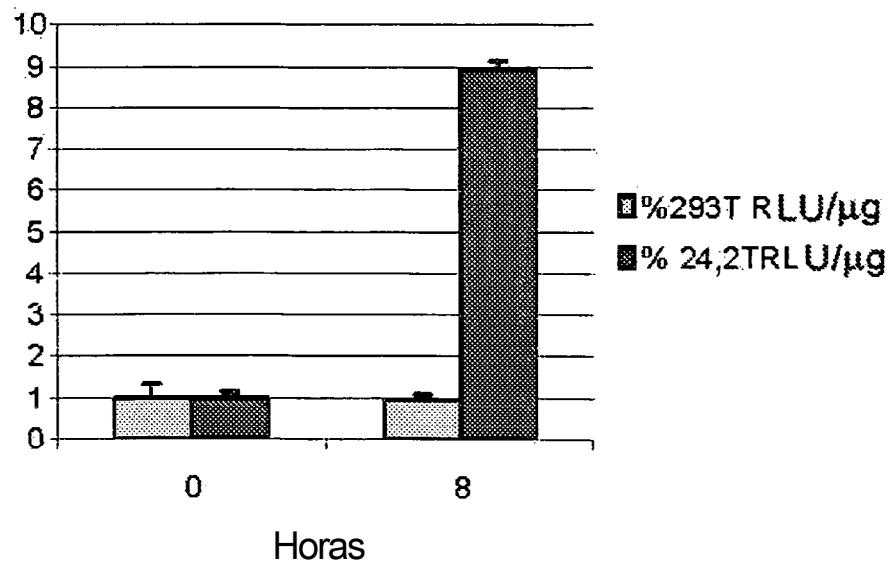


Fig 9

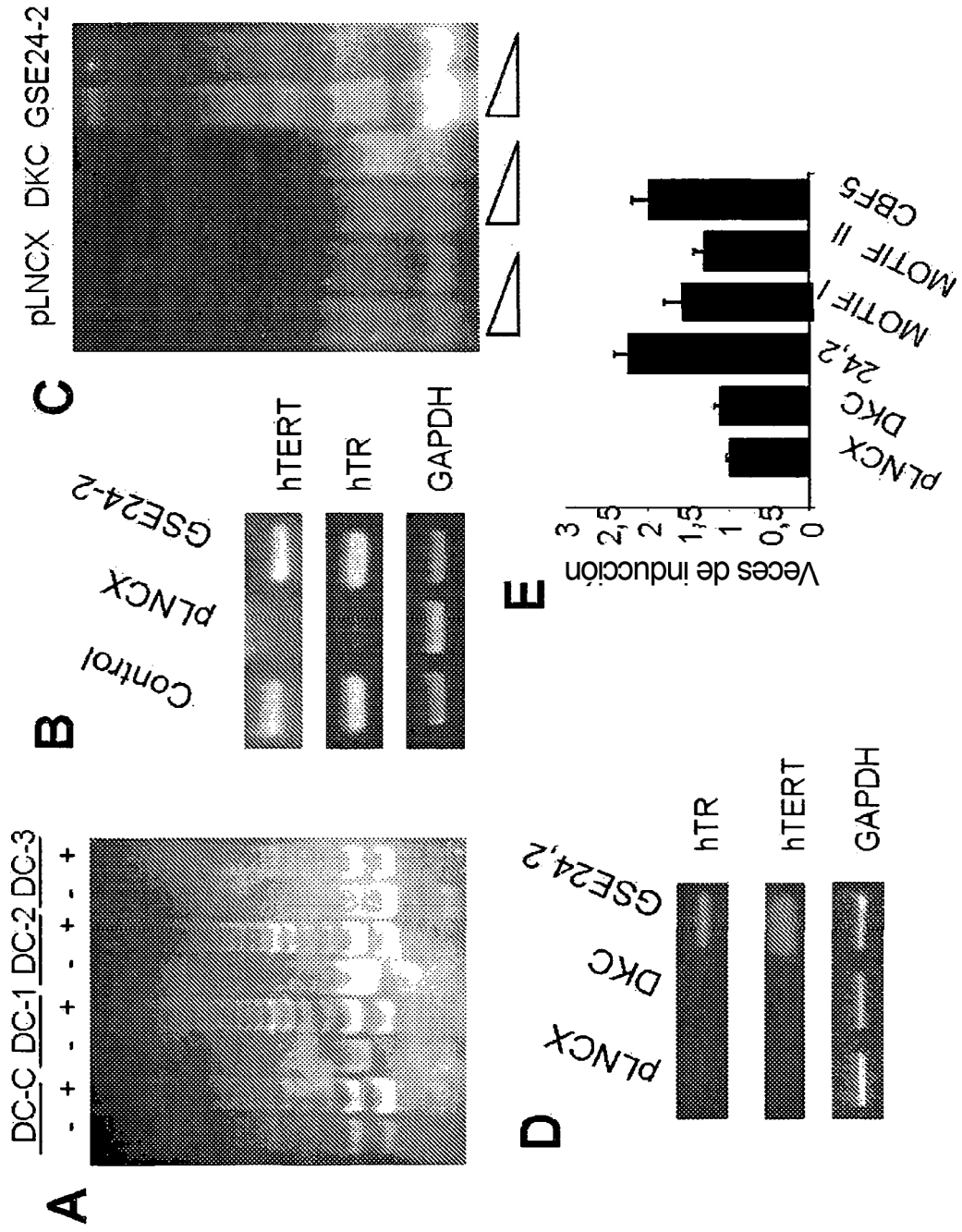


Fig 10

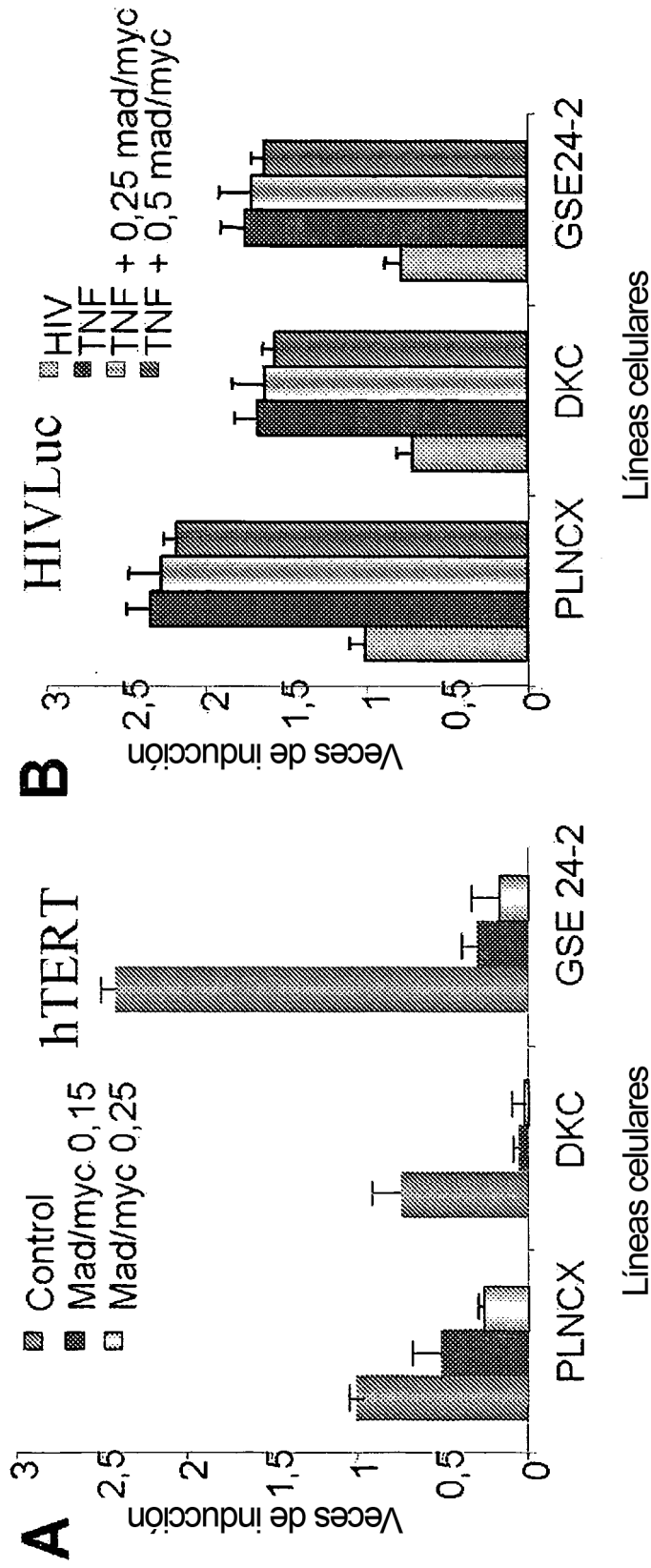


Fig 11

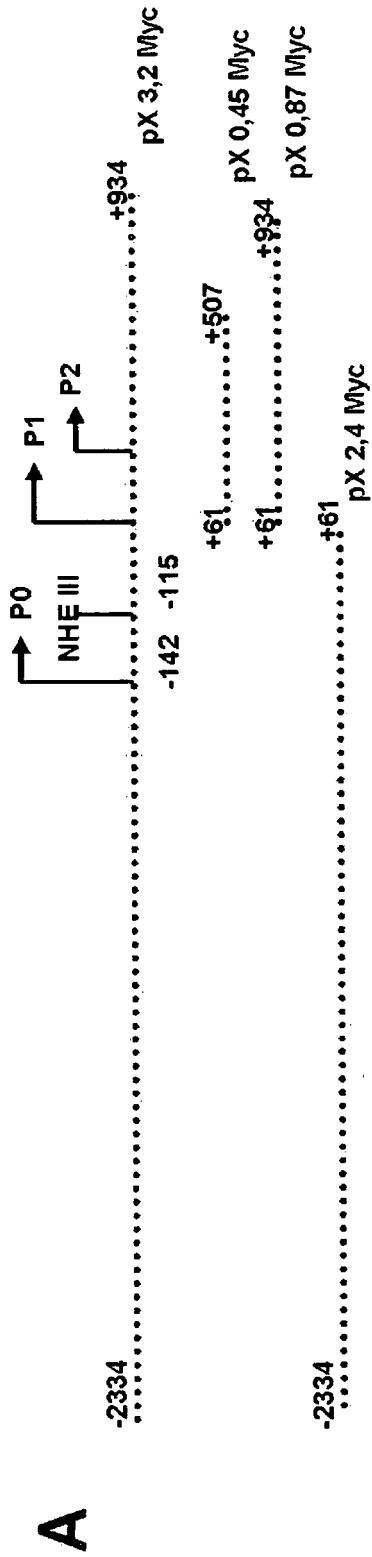


Fig 12

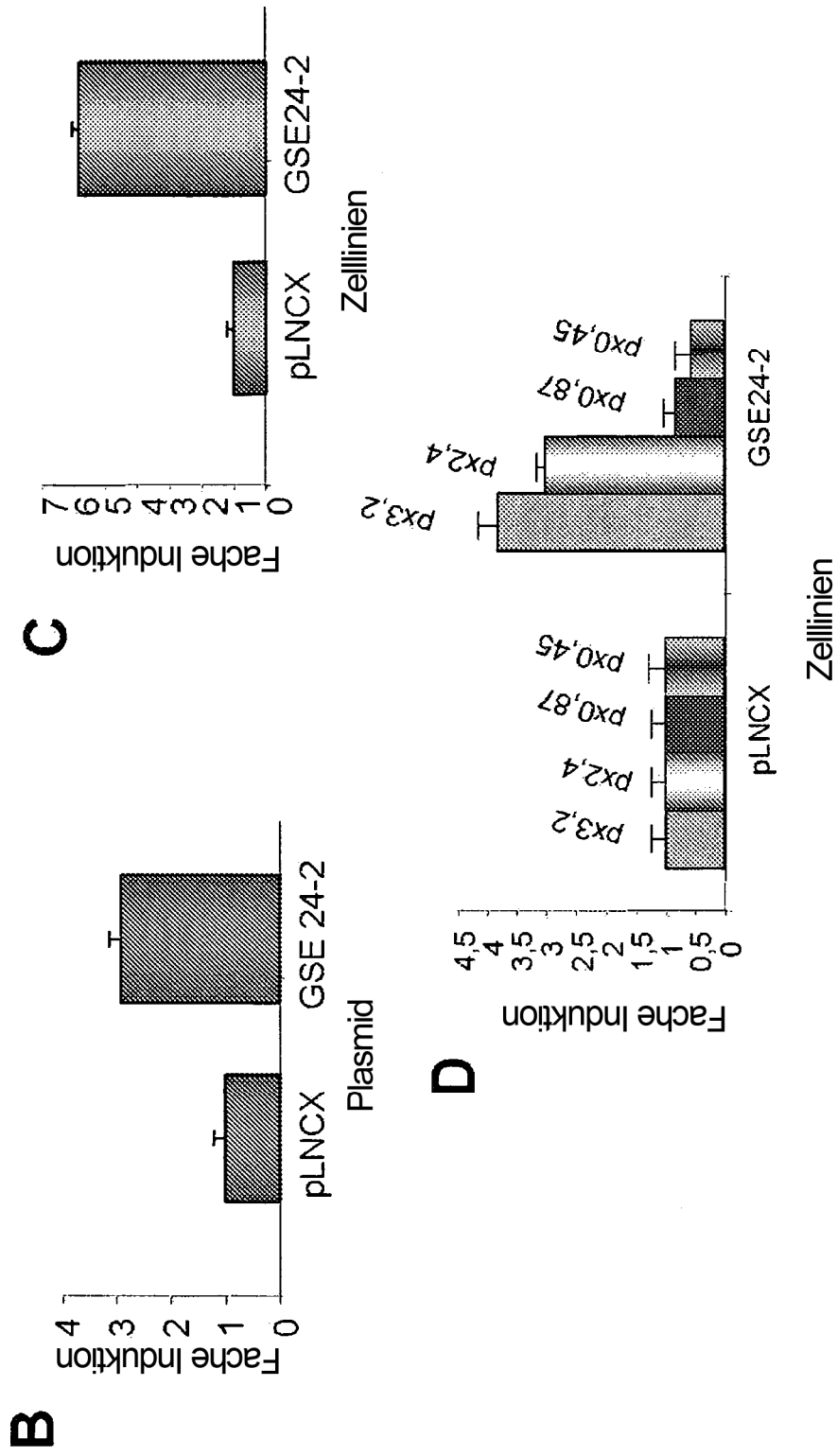


Fig 12

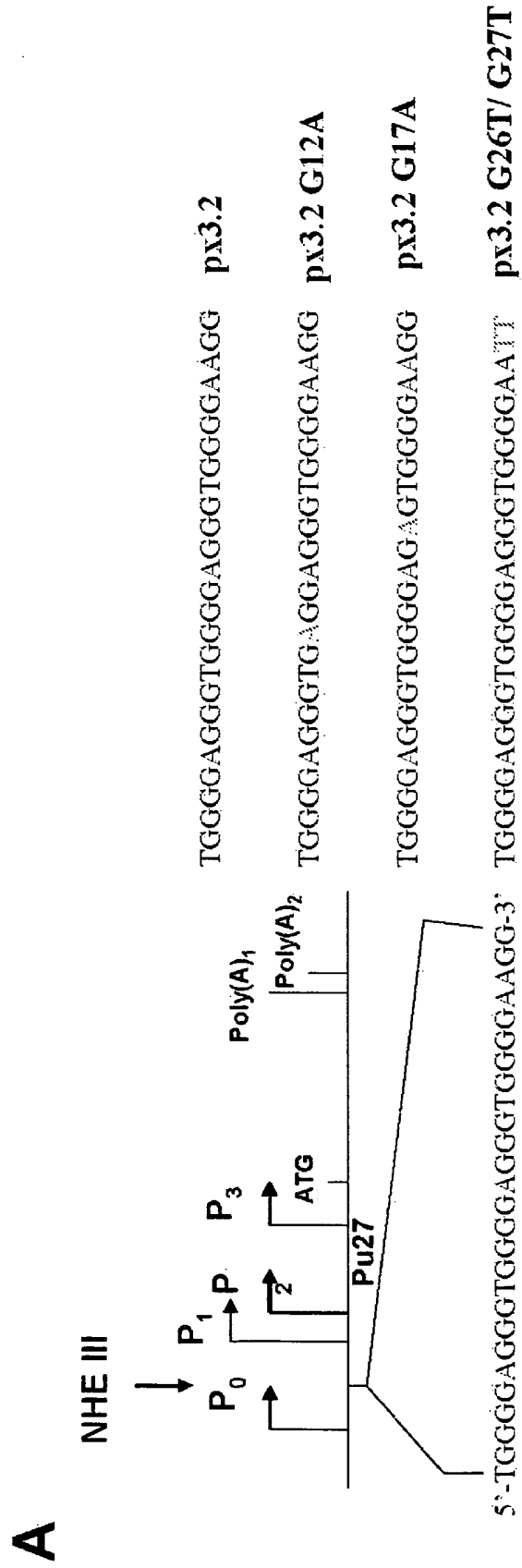


Fig 13

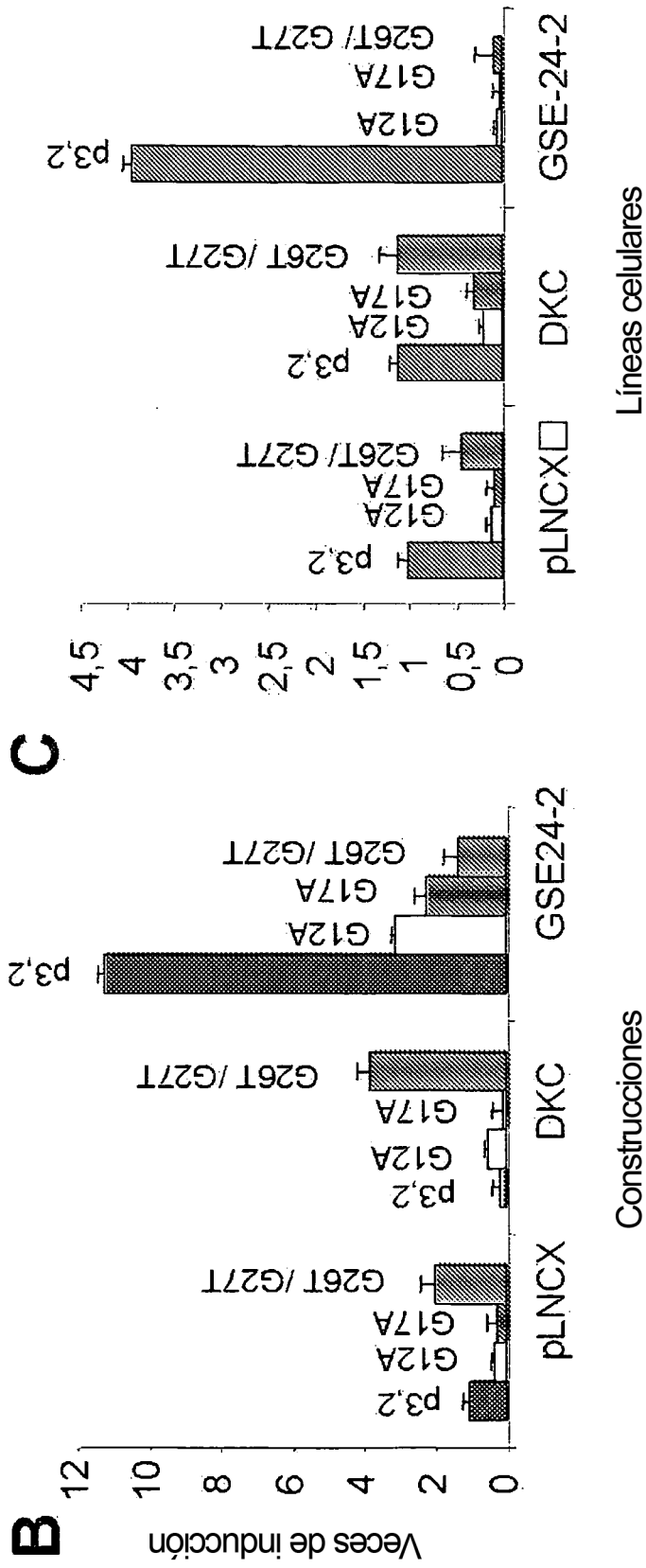


Fig 13