

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 334 736**

21 Número de solicitud: 200703106

51 Int. Cl.:
A61K 38/45 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **23.11.2007**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2010**

Fecha de la concesión: **21.01.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **02.02.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
02.02.2011

73 Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas** (Titular al 90 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Autónoma de Madrid (Titular al 10 %)

72 Inventor/es: **Machado Pinilla, Rosario;**
Perona Abellón, Rosario;
Asastre Garzón, Leandro y
Sánchez Pérez, Isabel

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Uso de agentes inductores GSE24.2 para la elaboración de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades que cursan con senescencia celular.**

57 Resumen:

Uso de agentes inductores GSE24.2 para la elaboración de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades que cursan con senescencia celular.

La presente invención describe el uso de un compuesto inductor o activador de la telomerasa en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o situación patológica, preferentemente humana, causada por un proceso de senescencia relacionado con la disminución de los telómeros o con una alteración de la actividad de la telomerasa. Esta composición farmacéutica puede ser útil para un tratamiento regeneración tisular, por ejemplo de tejidos epiteliales o de células hematopoyéticas, e incluso para la inmortalización de células eucariotas para su uso en investigación o procesos biotecnológicos.

ES 2 334 736 B1

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

DESCRIPCIÓN

Uso de agentes inductores GSE24.2 para la elaboración de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades que cursan con senescencia celular.

5

Sector de la técnica

Sector biotecnológico con aplicaciones en salud humana, y más concretamente compuestos biológicos - secuencias de nucleótidos, péptidos y células humanas transformadas - con aplicaciones terapéuticas para los seres humanos que padecen enfermedades relacionadas con el envejecimiento y la senescencia.

10

Estado de la técnica

Los telómeros están formados por múltiples repeticiones de la secuencia TTAGGG¹ los cuales se acortan en cada ciclo celular debido a la incapacidad de las DNA polimerasas de replicar el final de los cromosomas. El mantenimiento de los telómeros al final de los cromosomas se lleva a cabo por el complejo telomerasa. El componente proteico de este complejo, la transcriptasa telomerasa reversa humana (hTERT), contiene motivos catalíticos transcriptasa reversa, mientras que el componente telómero RNA dirige la acción de los trifosfatos desoxinucleótido (dNTPs) por medio de un molde interno complementario a la secuencia telomérica repetida TTAGGG²⁻³. Recientemente, se ha descrito que el complejo enzimático telomerasa humano está compuesto únicamente por dos componentes proteicos, hTERT y disquerina, y un componente RNA, hTR⁷. La disquerina es una pseudouridina sintasa putativa perteneciente a las ribonucleoproteínas de clase "H/ACA box", mientras que el motivo H/ACA está presente en la hTR. El complejo comprende finalmente dos moléculas de cada hTERT, hTR y disquerina.

15

20

25

30

35

La expresión de telomerasa está reprimida en la mayoría de las células somáticas de los tejidos adultos pero se mantiene alta en la mayoría de los cánceres, contribuyendo al fenotipo inmortal en estas células, ya que asegura la integridad de los cromosomas.⁶ Los niveles de telomerasa (hTERT) se regulan sobre todo a nivel transcripcional⁸ y en humanos se controla por una región reguladora en la región 5' del gen hTERT, la cual es requerida para una máxima activación y contiene un sitio de unión para myc (E-box)⁸⁻⁹. El factor de transcripción c-MYC estimula la expresión de hTERT mientras que la expresión reforzada de *mad1* reprime hTERT.¹⁰⁻¹¹ La regulación transcripcional de c-myc involucra múltiples promotores, de los cuales los más importantes son P1 y P2.¹² El elemento de hiper-sensibilidad III (NHEIII) a nucleasa del promotor de c-MYC controla entre el 85-90% de la transcripción de c-MYC y se identificó originalmente como el sitio más hipersensible a DNasaI.¹³ NHEIII contiene un sitio rico en purinas en una hebra del DNA que es capaz de establecer un equilibrio entre una estructura de duplex-hélice así como formas no-B en el DNA.¹⁴ La cadena de DNA enriquecida en purinas puede formar 2 estructuras intramoleculares de cuartetos G diferentes¹⁵ los cuales puesto que actúan como represores de la transcripción se han utilizado como dianas en terapia antitumoral.

40

El acortamiento de los telómeros, o la pérdida de su estructura secundaria, provoca que las células entren en senescencia y/o apoptosis. Estos dos procesos actúan como puntos de control biológicos que previenen la división celular descontrolada y la inestabilidad genética⁴⁻⁵. Los defectos en la regulación de la longitud de los telómeros están implicados en la patología de diferentes enfermedades como síndromes de envejecimiento prematuro y cáncer.⁶

45

Las células senescentes son células viables que detienen la síntesis de DNA, se aplanan y presentan un citoplasma rico de vacuolas, tienen un perfil de expresión génica distintivo y pueden identificarse por un ensayo bioquímico que visualice la actividad incrementada de la β -galactosidasa β -gal) asociada a senescencia a un pH ácido y por la incapacidad de duplicar las poblaciones en el tiempo.

50

La senescencia en células humanas se correlaciona con la erosión de los telómeros. Las células normales no transformadas son mortales debido al acortamiento de los telómeros en cada uno de los procesos de división celular. Por el contrario, las células cancerosas que expresan telomerasa estabilizan la longitud de los telómeros y se convierten en inmortales. Estos hallazgos inducen a la sugerir la hipótesis en la cual los telómeros actúan como un reloj biológico regulando el envejecimiento celular.

55

Uno de los síndromes de envejecimiento prematuro asociados a la erosión de los telómeros es la disqueratosis congénita (DC). Esta es una enfermedad rara, hereditaria y está caracterizada por fallo en la médula ósea y una mayor susceptibilidad a cáncer;¹⁶⁻¹⁸ que son las causas más importantes de muerte en estos pacientes. La forma ligada al cromosoma (X-DC) está causada principalmente por mutaciones puntuales en el gen DKC¹⁹⁻²⁰. Este gen codifica por la disquerina, una proteína de 58 Kd que contiene un dominio pseudouridina sintasa, que a su vez es componente del complejo de la telomerasa. La disquerina se une a las cajas H/ACA presentes en los SnoRNAs (pequeños RNAs nucleolares) y a hTR en vertebrados²¹. Los SnoRNAs funcionan como molde para la pseudouridilación del RNA mediada por la disquerina. Los RNAs H/ACA contienen dos horquillas de longitud variable, separadas por una región de cadena sencilla que incluye la caja H seguida por una secuencia corta que contiene el trinucleótido ACA²². Hay tres proteínas diferentes que se asocian con la DKC en la H/ACA de los SnoRNAs: Nap2, Gar1 y NOP10^{3,22-24}. DKC, Nap2 y NOP10 están íntimamente asociados y están involucrados en la estabilidad del complejo de ribonucleoproteínas, mientras que la interacción con Gar1 es más lábil y transitoria^{25, 26-28}. Por tanto, se requiere de la disquerina para la actividad telomerasa ya que es esencial para la acumulación de hTR,^{7, 24-29} y la pseudouridilación de los RNA ribosómicos³⁰. En los pacientes con DC, la inestabilidad cromosómica aumenta con la edad como una consecuencia de la disminución en actividad telomerasa y la incapacidad de mantener la estructura de los telómeros. En los linfoblastos

65

y fibroblastos de pacientes X-DC, la actividad telomerasa y los niveles de hTR están disminuidos ²¹ y los telómeros son más cortos que en las células que no están afectadas. El defecto en la actividad telomerasa se puede rescatar por expresión de hTERT y hTR.^{21, 31} Otras formas de disqueratosis congénita ocurren como el resultado de mutaciones o deleciones en hTR lo cual tiene como consecuencia en un aceleramiento en el acortamiento de los telómeros y muerte prematura. Este defecto sólo se puede rescatar por re-expresión de hTR.³¹

Recientemente, se ha descrito un elemento supresor genético (GSE) denominado 24-2, codificante de un dominio sintasa pseudouridina de la proteína disquerina que permite la recuperación de la actividad telomerasa en células de pacientes con DC-X lo que ha posibilitado el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas de esta enfermedad y de otras que cursen con alteración del complejo telomerasa (WO2007090911; SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS Y PÉPTIDOS GSE 24.2 DE LA DISQUERINA INDUCTORES DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN, COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS Y SUS APLICACIONES). Sin embargo, el conocimiento de nuevas actividades de este elemento GSE24.2 permitiría el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas y de investigación.

Descripción de la invención

Descripción breve

Un aspecto de la invención lo constituye el uso de un compuesto inductor o activador GSE24.2, en adelante uso de la invención, en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o situación patológica, preferentemente humana, causada por un proceso de senescencia.

Un aspecto particular de la invención lo constituye el uso de la invención donde el agente inductor GSE24.2 es una secuencia de nucleótidos, en adelante secuencia génica GSE 24.2 de la presente invención, que permite la expresión de una proteína o péptido inductor de la recuperación de la senescencia en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humanas, y que está constituida por una o varias secuencias de nucleótidos GSE 24.2 pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de nucleótidos constituida por una secuencia de nucleótidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO1),
- b) una variante de la secuencia de nucleótidos de a) que muestra una identidad en la secuencia de nucleótidos de al menos 90% con la SEQ ID NO1,
- c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- d) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera de a), b) y c).

Un aspecto más particular de la presente invención lo constituye el uso de la invención en la que la secuencia de nucleótidos de la secuencia GSE 24.2 de a) está constituida por la SEQ ID NO1.

Otro aspecto más particular de la presente invención lo constituye el uso de la invención en la que la secuencia de nucleótidos de la secuencia GSE 24.2 de c) está constituida por la SEQ ID NO3 ó la SEQ ID NO5, que codifican los dominios peptídicos Trub I y Trub II, respectivamente.

Además, otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso de la invención en el que el agente inductor GSE24.2 es una proteína o péptido, en adelante proteína GSE 24.2 de la presente invención, que presenta actividad de reversión de la senescencia en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humanas, y que comprende una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por una secuencia de aminoácidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO2),
- b) una variante secuencia de aminoácidos según la secuencia de a) que muestra una identidad en la secuencia aminoacídica de al menos 90% con el polipéptido de SEQ ID NO2,
- c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

Otro aspecto más particular de la presente invención lo constituye el uso de la invención en el que el agente inductor GSE24.2 es una proteína cuya secuencia de aminoácidos de a) está constituida por la SEQ ID NO2.

Otro aspecto más particular de la presente invención lo constituye el uso de la invención en el que el agente inductor GSE24.2 es una proteína cuya secuencia de aminoácidos de c) está constituida por la SEQ ID NO4 ó la SEQ ID NO6.

Otro aspecto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento de una enfermedad o patología que cursa con alteraciones de la senescencia, en adelante composición farma-

céutica de la presente invención, que comprende un compuesto ó agente compuesto activador GSE 24.2, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables y que es capaz de disminuir o revertir el proceso de senescencia, y obtenida mediante el uso de la invención.

5 Otro aspecto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o situación patológica, preferentemente humana, causada por un proceso de senescencia alterado.

10 Otro aspecto particular de la invención lo constituye una célula eucariota, preferentemente una célula humana, con el proceso de senescencia revertido o disminuido y que comprende el elemento GSE24.2 utilizado en la invención.

Descripción detallada

15 La presente invención se basa en que los inventores han observado que la expresión de la proteína GSE24-2 (SEQ ID NO1), un fragmento aislado de la disquerina (ver patente WO2007090911), era capaz de inducir la recuperación de la actividad telomerasa regulando los niveles de RNA de hTERT y hTR en distintos tipos de células; tanto en aquellas de enfermos de DC que expresan la forma mutada de disquerina (patente WO2007090911) como en aquellas (VA13) con un alelo tipo salvaje de DKC y con baja actividad de la telomerasa (Ejemplo 4). En este sentido, además en la presente invención se ha llevado a cabo por primera vez el uso del péptido GSE 24.2 directamente (no mediante su expresión génica), demostrándose su capacidad de reactivar la actividad telomerasa (Ejemplo 1).

20 Por otro lado, se ha observado que la proteína GSE24-2 activa la transcripción de la proteína hTERT modulando la expresión c-myc, ya que una molécula híbrida myc/mad abole completamente la activación transcripcional de hTERT. Mediante análisis de delección y mutagénesis se ha observado que la región activadora diana en el promotor del gen c-myc humano de la proteína GSE24-2 era el dominio NHEIII localizado más allá de la región P1. Más concretamente es una secuencia polipurina (Pu27) que se encuentra además en promotores de otros genes como el CCR5 y PDGFA, la cual se asocia a menudo con estructuras inusuales en el DNA.⁶¹, y que debe de mantenerse intacta para estimular la transcripción de c-myc (Ejemplo 3). Por lo tanto, la alteración de la estructura secundaria de cuartetos de G del sitio NHEIII altera la actividad de la proteína GSE24-2 por esta secuencia. Hay que destacar que existen pocas proteínas conocidas que interactúen y activen sitios NHE por lo que la proteína GSE24.2 puede representar una opción de regulación de genes en cuyos promotores se encuentre dicho dominio NHE. Uno de ellos en NM23-H2 ó NDP quinasa B, una proteína que se une a secuencias específicas del DNA y que tiene afinidad por el sitio NHE del promotor de c-myc. También activa la expresión de otros genes como el de la mieloperoxidasa, CD11b, CCR5 y reprime la expresión de otros como PDGFA.⁶¹⁻⁶² Esta proteína también se puede unir *in vitro* a secuencias enriquecidas en G⁶¹⁻⁶² tales como las que se encuentran el NHE del promotor de c-myc y los telómeros en humanos. Por lo tanto, un posible mecanismo por el cual el GSE24-2 puede activar la transcripción a través del NHE mediante la asociación con proteínas como NM23H2 las cuales faciliten su interacción con el DNA y, por tanto, producir un aumento en la transcripción.

30 Los resultados obtenidos en células X-DC y VA13 indican que el péptido GSE24-2 incrementa la actividad telomerasa a través de una combinación de dos mecanismos distintos: 1) activando la transcripción de hTERT y 2) aumentando los niveles de hTR mediante la estabilización de este RNA, sin que se afecte la actividad de su promotor. Adicionalmente, el GSE24-2 podría facilitar el ensamblaje de otras proteínas como hNaf1 o Nop10 en la caja H/ACA, aún en presencia de una disquerina defectiva.²⁸

45 Finalmente, y de forma sorprendente, en la presente invención se ha observado que el incremento de esta actividad telomerasa mediante la proteína GS24.2 provoca el rescate de la senescencia prematura de fibroblastos de pacientes con X-DC de tal forma que estas células recuperan la capacidad de multiplicarse, manteniendo dicha actividad hasta 140 días (Ejemplo 4, ver Figura 5). Esto estaría mediado por un aumento tanto en los niveles de hTERT como hTR. En este sentido, la proteína o el gen GSE24.2 pueden constituir una aproximación terapéutica de enfermedades y procesos patológicos que cursen con senescencia celular o constituir una herramienta para inmortalizar células eucariotas o para incrementar su capacidad proliferativa. En este sentido, Por otro lado, los resultados de la presente invención indican que la expresión de GSE24-no induce tumorigenicidad y que no provocaría un crecimiento celular aberrante (Ejemplo 3).

55 Por todo ello, GSE24.2 puede ser utilizado en la elaboración de un medicamento o reactivo de laboratorio útil para el tratamiento de enfermedades o procesos patológicos que cursen con un proceso de senescencia celular alterado o acelerado, incluyendo células que expresan la disquerina normal como las células VA13, o células que expresan formas mutadas como la disqueratosis congénita (DC) autosómica dominante o la anemia anaplásica.

60 Por tanto, un aspecto de la invención lo constituye el uso de un compuesto inductor o activador GSE24.2, en adelante uso de la invención, en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o situación patológica, preferentemente humana, causada por un proceso de senescencia. En la presente invención el término “composición farmacéutica” incluye además composiciones que comprende el agente GSE24.2 descrito y utilizado en la invención y que se utiliza en el campo de la investigación (como reactivo de laboratorio) o actividad industrial biotecnológica).

Tal como se utiliza en la presente invención el término “compuesto inductor o activador GSE24.2” se refiere a una secuencia de nucleótidos del fragmento GSE 24.2 de la disquerina o una secuencia proteínica o peptídica codificado

por dicha secuencia de nucleótidos y que es capaz de disminuir o revertir el proceso de senescencia en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humanas. En esta definición se incluye además aquellos compuestos o moléculas que permiten la expresión de una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína GSE 24.2. Un compuesto activador puede estar constituido por un péptido, una proteína o una secuencia de nucleótidos, un anticuerpo y un polisacárido.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “enfermedad o situación patológica causada por un proceso de senescencia ya sea normal o acelerado” se refiere a una enfermedad en la que las células y tejidos presentan una disminución, ya sea natural por envejecimiento o acelerada, de su capacidad proliferativa (véase concepto de senescencia descrito en el estado de la técnica de la presente invención). Así, este término tal como se utiliza en la presente invención se refiere también a situaciones fisiológicas alteradas por el envejecimiento natural de células humanas, preferentemente epiteliales o de alto nivel de proliferación, pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: células de la piel, preferentemente, de la epidermis, epitelio intestinal, córnea, hígado, pulmón, bulbo piloso, etc. o células del sistema hematopoyético, preferentemente, linfocitos, macrófagos y eritrocitos; células germinales de testículos y ovarios, etc., respectivamente, ya sean células somáticas, células troncales o embrionarias. Ejemplos de enfermedades o procesos patológicos humanos en los que el control del proceso de senescencia y/o actividad telomerasa pueden encontrarse, a título ilustrativo y no limitativo, en la revisión de Blasco MA (Blasco MA, Telomere length, stem cells and aging. *Nature Chemical Biology* 3 (10): 640-649, 2007; Crabbe L, Jauch A, Naeger CM, Holtgreve-Grez H., and Karlseder J. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *PNAS* 104 (7): 2205-2210, 2007).

La reversión o la disminución del proceso de senescencia celular puede utilizarse terapéuticamente en aquellas células con capacidad de dividirse que mantienen la homeostasis de los órganos, incrementándose de esta forma la capacidad celular regenerativa de tejidos, independiente de su causa, ya sea por envejecimiento, daño tisular por tóxicos, tras intervenciones quirúrgicas, e incluso en tejidos hipoplásicos de origen congénito o hereditarios, por ejemplo, hipoplasia pulmonar. Además, esta reversión o la disminución del proceso de senescencia celular puede ser utilizada para aumentar la capacidad de supervivencia de poblaciones de células madre, somáticas o embrionarias, en tratamientos de trasplante o terapia celular. En estos tratamientos, aunque las células madre expresan telomerasa, no pueden mantener la longitud de los telómeros por un período de tiempo prolongado ⁶ por lo que la transformación celular o el tratamiento con el péptido GSE24.2 incrementarán la vida operativa de estas células y por tanto la eficacia de estos tratamientos celulares. Así, por ejemplo, la presente composición farmacéutica puede utilizarse para la regeneración de la epidermis en personas ancianas o utilizarse para promover la regeneración de la piel en heridas o quemaduras de la piel, o en la estimulación de las células hematopoyéticas autólogas que se implantan a un paciente sometido a un tratamiento quimioterápico.

Así, un aspecto particular de la invención lo constituye el uso de la invención donde el agente inductor GSE24.2 es una secuencia de nucleótidos, en adelante secuencia génica GSE 24.2 de la presente invención, que permite la expresión de una proteína o péptido inductor de la recuperación de la senescencia en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humanas, y que está constituida por una o varias secuencias de nucleótidos GSE 24.2 pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de nucleótidos constituida por una secuencia de nucleótidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO1),
- b) una variante de la secuencia de nucleótidos de a) que muestra una identidad en la secuencia de nucleótidos de al menos 90% con la SEQ ID NO1,
- c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- d) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera de a), b) y c).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “variante” pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia SEQ ID NO1, 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 capaz de mimetizar la actividad de la secuencia GSE 24.2 (SEQ ID NO2) o de fragmentos de los mismos (SEQ ID NO4 y SEQ ID NO6).

La enzima disquerina pertenece a una familia de pseudina sintasa presente en varios organismos (ver Figura 3B, Mitchel *et al*, 1999). A partir de la información descrita en la presente invención - y en la patente WO2007090911- de distintos organismos existentes en la naturaleza un técnico experto en el sector de la técnica puede aislar o construir una secuencia de nucleótidos análoga a las descritas en la presente invención.

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

Un aspecto más particular de la presente invención lo constituye el uso de la invención en la que la secuencia de nucleótidos de la secuencia GSE 24.2 de a) está constituida por la SEQ ID NO1.

Otro aspecto más particular de la presente invención lo constituye el uso de la invención en la que la secuencia de nucleótidos de la secuencia GSE 24.2 de c) está constituida por la SEQ ID NO3 ó la SEQ ID NO5, que codifican los dominios peptídicos Trub I y Trub II, respectivamente.

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

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

Por tanto, otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de la invención en el que el agente inductor o activador GSE24.2 es un vector de expresión GSE 24.2 que comprende una secuencia de nucleótidos GSE
25 24.2 o una construcción genética GSE 24.2, descritas en la presente invención, y que permite la expresión de una proteína o péptido capaz de disminuir o revertir el proceso de senescencia en el interior de células de mamíferos, preferentemente humanos. Un ejemplo de una realización particular lo constituye el vector expresión de la invención
30 pLNCX 24.2 (ver también patente española WO2007090911).

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

Además, otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso de la invención en el que el agente inductor
50 GSE24.2 es una proteína o péptido, en adelante proteína GSE 24.2 de la presente invención, que presenta actividad de reversión de la senescencia en el interior de las células de un mamífero, preferentemente humanas, y que comprende una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por una secuencia de aminoácidos GSE 24.2 humana (SEQ ID NO2),
55
- b) una variante secuencia de aminoácidos según la secuencia de a) que muestra una identidad en la secuencia aminoacídica de al menos 90% con el polipéptido de SEQ ID NO2,
- c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
60
- d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

Según se entiende en el contexto de la presente invención, una variante de un polipéptido según se define en la secuencia SEQ ID NO2 es todo aquel péptido que se puede obtener a partir de dicha secuencia mediante sustitución,
65 inserción o delección de uno o más aminoácidos. En el caso de las variantes por sustitución, la sustituciones son preferentemente sustituciones conservativas, esto es, los aminoácidos se sustituyen por otros con características similares en cuanto a la propiedades de su cadena lateral. Así, sustituciones conservativas incluyen sustituciones dentro de los grupos de amino ácidos según la tabla 1.

| Tipo de cadena lateral | Amino ácido |
|---|-------------------------|
| Alifática apolar o ligeramente polares | Ala, Ser, Thr, Pro, Gly |
| Polar con carga neutra positiva | His, Arg, Lys |
| Polar con carga neutra negativa y las amidas correspondientes | Asp, Asn, Glu, Gln |
| Aromática | Phe, Tyr, Trp |
| Alifática de gran tamaño y apolar | Met, Leu, He, Val, Cys |

Adicionalmente, uno ó más de los aminoácidos de las variantes de la invención pueden estar sustituidos por aminoácidos no convencionales naturales o sintéticos como por ejemplo, beta-amino ácidos, ácido 2-aminoadípico, alpha-asparagina, ácido 2-aminobutanoico, ácido 2-aminocáprico, alpha-glutamina, alpha-metilalanina, ácido 2-aminopimélico, ácido gamma-amino-beta-hidroxibenzenopentanoico, ácido 2-aminosubérico, 2-carboxiazetidina, beta-alanina, ácido beta-aspartico, ácido 3,6 diaminohexanoico, ácido butanoico, ácido 4-amino 4-amino-3-hidroxi butanoico, ácido gamma-amino-beta-hidroxiciclohexanepentanoico, N5-aminocarbonilornitina, 3-sulfoalanina, ácido 2,4 diaminobutanoico, ácido diaminopimélico, ácido 2,3 diaminopropanoico, ácido 2,7 diaminosubérico, S-etiltiocisteina, ácido gamma-glutámico, ácido gamma-carboxiglutámico, ácido piroglutámico, homarginina, homocisteína, homohistinba, homoserina, ácido 2-hidroxiisovalérico, ácido 2-hidroxipentanoico, 5-hidroxisilina, 4-hidroxiprolina, 2-carboxioctahidroindol, 3-carboxiisquinolina, isovalina, ácido 2-hidroxipropanoico; ácido mercaptoacético, ácido mercaptobutanoico, 4-metil-3-hidroxiprolina, ácido mercaptopropanoico, norleucina, nortirosina, norvalina, ornitina, penicilamina, 2-fenilglicina, 2-carboxipiperidina, sarcosina, 1-amino-1-carboxiciclopentano, estatina, 3-tienilalanina, epsilon-N-trimetilisina, 3-tiazolialanina, ácido alpha-amino-2,4-dioxipirimidinapropanoico.

Adicionalmente, la invención contempla el uso de variantes de los péptidos de la invención en los que uno o más aminoácidos han sufrido modificaciones en su cadena lateral. Ejemplos de modificaciones de cadena lateral contempladas en la presente invención incluyen modificaciones de grupos amino tales como alquilación, amidación, acilación, carbomilación, trinitrobencilación, piridoxilación, modificaciones del grupo guanidino de los restos de arginina consistentes en la formación de condensados heterocíclicos; modificaciones de los grupos carboxilo mediante amidación, modificaciones de tirosinas mediante metoxilación, modificación del anillo imidazólico de la histidina mediante alquilación o N-carboxietilación, modificaciones de la prolina mediante hidroxilación en posición 4. Alternativamente, la invención contempla variantes de los péptidos de la invención mediante glicosilación, es decir, la adición de grupos de glicano bien en la cadena lateral serina y/o treonina (O-glicosilación) o en la cadena lateral asparagina y/o glutamina (N-glicosilación). Los glicanos que pueden incorporarse a los polipéptidos de la invención incluyen un número variable de unidades glucídicas (mono-, di-, tri, tetrasacáridos y sucesivos). Los monosacáridos que forman en glicano incluyen D-alosa, D-altrosa, D-glucosa, D-manosa, D-gulosa, D-idosa, D-galactosa, D-talosa, D-galactosamina, D-glucosamina, D-N-acetylglucosamina, D-N-acetylgalactosamina, D-fucosa o D-arabinosa.

Alternativamente, la invención contempla el uso de variantes de los polipéptidos descritos en la invención en los que se incluyen los estereoisómeros D de, al menos, uno de los aminoácidos que constituyen la cadena peptídica para dar así lugar a los isómeros retro-inversos.

En otra forma de realización, la invención contempla el uso de peptidomiméticos de los polipéptidos descritos en la invención, es decir, variantes en las que uno o más de los enlaces peptídicos ha sido reemplazado por un tipo alternativo de enlace covalente. Dichos peptidomiméticos se caracterizan por mostrar una mayor estabilidad al ser más resistentes a proteasas. Modificaciones del esqueleto peptídico incluyen la sustitución o la inserción en los elementos del enlace peptídico (-NH-, -CH-, -CO-) de grupos tales como -O-, -S-, -CH₂ en lugar de -NH-, -N-, -C-alquil p -BH- en lugar de -CHR y -CS-, -CH₂-, -SO_n-, -P=O(OH)- o -B(OH)- en lugar de -CO-. Adicionalmente, es posible aumentar la estabilidad de los péptidos de la invención usando grupos que bloqueen el extremo N-terminal tales como t-butiloxycarbonil, acetil, succinil, metoxisuccinil, suberil, adipil, dansil, benciloxycarbonil, fluorenilmetoxycarbonil, metoxiadipil, metoxisuberil y 2,3-dinitrofenil. Alternativa p simultaneamnte, es posible modificar el extremo C-terminal de los péptidos mediante amidación.

La determinación del grado de identidad entre las variantes y los polipéptidos definidos en la secuencia SEQ ID NO2 se lleva a cabo usando métodos y algoritmos informáticos ampliamente conocidos para el experto en la materia. Preferentemente, la identidad entre dos secuencias de amino ácidos se determina usando el algoritmo BLASTP (BLASTManual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 21 5: 403-410 (1990)). Preferiblemente, los polipéptidos objeto de uso en la invención muestran una identidad de secuencia con los polipéptidos definidos en las secuencias de SEQ ID NO:1 a 19 de al menos 50%, al menos 60%, al menos

ES 2 334 736 B1

70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%.

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

10 Otro aspecto más particular de la presente invención lo constituye el uso de la invención en el que el agente inductor GSE24.2 es una proteína cuya secuencia de aminoácidos de a) está constituida por la SEQ ID NO2.

Otro aspecto más particular de la presente invención lo constituye el uso de la invención en el que el agente inductor GSE24.2 es una proteína cuya secuencia de aminoácidos de c) está constituida por la SEQ ID NO4 ó la SEQ ID NO6.

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

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula o un organismo hospedador que contiene una construcción génica de la invención o un vector tal que definido en la invención. Cualquier tipo de organismo hospedador conocido para el experto en la materia puede ser usado en la presente invención, tales como una cepa bacteriana (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y similares), una cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* y similares), una planta transgénica (dicotiledoneas o monocotiledoneas), una célula de insecto, por ejemplo, baculovirus, una célula de mamífero (células COS, CHO, C127, HeLa y similares) y un transgénico no humano (por ejemplo, un ratón, una vaca, una cabra, un conejo, un cerdo, etc.).

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

50 Otro aspecto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento de una enfermedad o patología que cursa con alteraciones de la senescencia, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un compuesto ó agente compuesto activador GSE 24.2, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables y que es capaz de disminuir o revertir el proceso de senescencia, y obtenida mediante el uso de la invención.

55 Para uso en medicina, los compuestos y combinaciones de compuestos de la invención pueden ser formulados conjuntamente con un excipiente que es aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas.

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

65 En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (p.ej., comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, etc.) o líquida (p.ej., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.). En otra realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo, sin ser limitante, oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar

y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993.

Otro aspecto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o situación patológica, preferentemente humana, causada por un proceso de senescencia alterado.

No menos importante, otro aspecto particular lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de immortalización de células eucariotas, preferentemente humanas o de animales utilizados en investigación biomédica. La immortalización de células eucariotas es una práctica altamente necesaria en el campo de la investigación y desarrollo industrial biotecnológico ya que incrementa la vida útil de las mismas, piénsese en procesos de producción de proteínas recombinantes, preferentemente con aplicaciones biomédicas, o células normales que se utilizan para analizar los efectos de potenciales compuestos terapéuticos y en las que sería conveniente mayores periodos de tiempo para analizar los efectos secundarios a largo plazo.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye una célula eucariota, preferentemente una célula humana, con el proceso de senescencia revertido o disminuido y que comprende el elemento GSE24.2 utilizado en la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1.- *Efecto de la expresión del péptido GSE24-2 en la actividad telomerasa en respuesta al cisplatino.* (C) Actividad telomerasa tras el tratamiento de *in vitro* de extractos de células 293T con cisplatino y el péptido GSE24-2. Después de tratar *in vitro* extractos de células 293T con cisplatino y cantidades crecientes de péptido GSE24-2 purificado (líneas 3-5), péptido GSE24-2 inactivado por calor (línea 7) o un péptido control (línea 8) estos se utilizaron en una ensayo TRAP. Para realizar el ensayo telomerasa, se utilizó un molde específico con la secuencia telomérica. El experimento se repitió 3 veces con resultados similares. (D) Ensayos de retardo en gel con extractos de células que expresan GSE24-2. Los extractos nucleares de células que expresan el plásmido pcDNA3-9E1024-2 o pcDNA3-9E10 se sometieron a un ensayo de retardo en gel. Se usó una sonda TEL1 que contiene la secuencia telómero específica. La especificidad de unión se estableció mediante el uso de un anticuerpo específico 9E10 (línea 3) y el oligonucleótido CXext que hibridado al TEL1 actúa como un competidor (líneas 4-5). El experimento se repitió tres veces con similares resultados.

Figura 2.- *El GSE24-2 incrementa la actividad del promotor de hTERT.* (A) Las células 293T se cotransfectaron con pLNCX, DKC, GSE24-2, Cbf5, motivo I o motivo II (10 μg DNA por millón de células) y el plásmido reportero hTERT-luc (1 μg por millón de células). La actividad telomerasa fue medida 24 h después de la transfección. *Indica valores con una significación estadística $p < 0.05$. (B) Las células 293T (negro) y 293T24-2 (blanco) se cotransfectaron con el vector reportero hTERT-luc (1 μg por millón de células). Después de 24 horas, las células se trataron con cisplatino (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 8 h y se midió la actividad luciferasa. (C) Las células 293T se cotransfectaron con las construcciones indicadas (10 μg DNA por millón de células) y el vector reportero hTR-luc (1 μg por millón de células). La actividad luciferasa fue medida 24 horas después de la transfección. (D) Las líneas celulares fueron cotransfectadas con el vector reportero hTERT-luc y diferentes cantidades del vector de expresión para Mad/myc. La actividad luciferasa se midió 24 horas tras la transfección. (E) Las líneas celulares fueron cotransfectadas con el vector reportero HIV-luc y cantidades crecientes del vector de expresión mad/myc. 24 horas después de la transfección se estimularon con 50 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ durante 6 horas y se midió la actividad luciferasa. Como control de eficiencia de transfección se utilizó el vector CMV-Renilla (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por millón de células). Cada punto representa la media y desviación estándar de dos experimentos realizados por cuadruplicado.

Figura 3.- *El GSE24.2 induce su actividad a través del promotor del gen c-MYC.* (A) Representación esquemática del promotor de c-MYC indicando las diferentes construcciones usadas en los experimentos. (B) Las células 293T pLNCX y 293T GSE24-2 se transfectaron con diferentes construcciones del vector reportero c-MYC-luc (1 μg por millón de células). La actividad luciferasa fue medida 24 horas tras la transfección. Como control de eficiencia de transfección se utilizó el vector CMV-Renilla (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por millón de células). Cada punto representa la media y desviación estándar de dos experimentos realizados por cuadruplicado. (C) Representación esquemática de las mutaciones generadas en el NHE III. (D) Las líneas celulares indicadas fueron transfectadas con los vectores reporteros mutantes derivados del plásmido px3.2 (1 μg por millón de células). La actividad luciferasa fue medida 24 horas tras la transfección. Como control de eficiencia de transfección se utilizó el vector CMV-Renilla (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por millón de células). Cada punto representa la media y desviación estándar de dos experimentos realizados por cuadruplicado. (E) Las células MEF se transfectaron con los vectores de expresión pLNCX, DKC o GSE24-2. 24 horas tras la transfección se aisló RNA total y se midió la expresión del RNA del gen de ratón c-myc y α -actina mediante RT-PCR. El experimento se repitió tres veces con resultados similares. (F) Las células MEF se transfectaron con los vectores de expresión pLNCX, DKC o GSE24-2. 24 horas tras la transfección se aislaron extractos de proteína total, y se determinó la expresión de la proteína de ratón c-myc y α -tubulina mediante immunoblot utilizando anticuerpos específicos. Los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares.

Figura 4.- *El GSE24-2 reactiva la actividad telomerasa en células de pacientes con disqueratosis congenita ligada a cromosoma X y en células VA13.* (A) La actividad telomerasa se midió en de linfoblastos derivados de pacientes con disqueratosis congenita ligada a cromosoma X obtenidos de una madre portadora (DC-C) y los hijos afectados (DC-1, DC-2 y DC-3). Las células se transfectaron de forma transitoria con 3 μg de vector vacío (-) o el GSE24-2 (+) por

millón de células. La actividad telomerasa fue medida 24 horas más tarde. (B) Las células DC2 fueron transfectadas transitoriamente con 3 μg de los vectores de expresión pLNCX, GSE24-2 o DKC, por millón de células. La actividad telomerasa fue medida 24 horas más tarde. (C) Los niveles de expresión de hTERT y hTR en las células de uno de los pacientes (DC-3) transfectadas con 3 μg de vector vacío o GSE24.2 por millón de células. Los niveles de RNA fueron detectados por RT-PCR. La expresión de GAPDH fue utilizada como control. (D) Los fibroblastos derivados de pacientes con X-DC GMO1787 fueron infectados con los virus derivados de los vectores pLNCX o GSE24-2 y las líneas celulares estables utilizadas para determinar la actividad telomerasa (La cantidad total de proteína se indica en el triángulo). (E) Los niveles de expresión de hTERT y hTR en las células GMO1787 transfectadas con los plásmidos pLNCX y pGSE24-2 fueron determinados por RT-PCR. La expresión de GAPDH se utilizó como control. (F) Velocidad de crecimiento de las células GMO1787 infectadas como se describe en el panel D se ha estimado mediante la acumulación de duplicaciones de población en el tiempo. Todos los experimentos se han repetido tres veces, con resultados similares. (G) Actividad telomerasa en células VA13. Las células fueron transfectadas de forma transitoria con 16 μg del vector control pLNCX o GSE 24.2 por millón de células. La actividad telomerasa se midió 24 horas más tarde utilizando diluciones seriadas de extractos proteicos (La cantidad total de proteína se indica en los triángulos). (H) Niveles de expresión de hTERT y hTR en células VA13 transfectadas con 16 μg de los plásmidos pLNCX, DKC o GSE24-2/por millón de células. Los niveles de RNA se determinaron por RT-PCR. Los niveles de GAPDH fueron utilizados como control.

Figura 5.- *El péptido GSE24.2 recupera de la senescencia celular.* La velocidad de crecimiento de las células GMO1787 infectadas como se describe en el panel 4D se ha estimado mediante la acumulación de duplicaciones de población en el tiempo. Todos los experimentos se han repetido tres veces, con resultados similares.

Ejemplos de la invención

25 *Materiales y métodos*

Construcciones y líneas celulares. Las secuencias GSE24-2, DKC, DKC5', motivo I, motivo II y la región del gen CBF5 homóloga al GSE 24-2 fueron clonadas en el vector pLNCX (BD Biosciences, Madrid). La construcción con el promotor de hTERT ha sido obtenida del Dr. T.Kim³², la construcción con el promotor de hTR se obtuvo del Dr. N.Keith⁹, las del promotor de c-MYC (px3.2) de la Dra. A. Aranda y la construcción híbrida Myc/mad, pECL y pECLc-myc del Dr. J. León. El plásmido BABE-TERT se obtuvo de la Dra. K. Collins³¹. El plásmido PGATEV³³ se obtuvo del Dr. G. Montoya. El plásmido PGATEV-24-2 se obtuvo subclonando el fragmento 24-2 en los sitios NdeI/XhoI del plásmido pGATEV. El plásmido pCDNA3-9E10-24-2, se obtuvo subclonando el fragmento 24-4 entre los sitios EcoRI/XbaI del vector pCDNA3 conteniendo el epítipo 9E10-myc. Las células 293T (American Type Culture Collection) Phoenix se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% FBS. La línea celular VA13 se obtuvo del Dr. M. Serrano. Las células X-DC cells se obtuvieron del Coriell Cell Repository y se cultivaron en medio RPMI suplementado con 20% FBS. Los linfoblastos X-DC de la familia (DC, DC1, DC2 y DC3) se han descrito clínicamente³⁴⁻³⁵ y el gen de la disquerina presenta una única sustitución: T66A. Los fibroblastos de piel X-DC GMO1787 se cultivaron en DMEM suplementado 10% FCS y codifican por una proteína disquerina que carece de la leucina 37³¹. Los fibroblastos embrionarios murinos (MEF) se cultivaron en DMEM suplementado con 10% FBS y aminoácidos no esenciales (Gibco, Carlsbad, USA). Para transfecciones estables las células 293T se cotransfectaron con 10 μg /millón de células del GSE24-2 o pLNCX y 1 μg del plásmido p-BabePUR (Clontech) y seleccionadas para resistencia a puomicina 24 h después de la transfección. Las células Pam 212 fueron transfectadas con los vectores pECL, pECLc-myc o GSE24-2 y se seleccionaron para resistencia a G418. Para la infección de fibroblastos X-DC, las células Phoenix fueron transfectadas con los vectores derivados de pLNCX utilizando el método del fosfato calcico. 48 horas después de la transfección se recogieron los virus y se utilizaron para infectar fibroblastos X-DC durante 48 horas. Las líneas celulares estables se seleccionaron con G-418 (Gibco).

Librería de GSEs y selección con cisplatino. La librería de GSEs se construyó esencialmente como se describió anteriormente por Roninson *et al*³⁶.

Reactivos. El cisplatino, el inhibidor de la Telomerasa I y SP60125 fueron adquiridos de Calbiochem (San Diego, USA). El TNF α fue adquirido de Upstate (Charlottesville, USA).

Producción y purificación del péptido GSE24-2: Las células DH5 α de *E. coli* fueron transformadas con el vector pGATEV GSE24-2 y los lisados se prepararon tal como se ha descrito previamente³³. La proteína de fusión fue purificada con glutation-sepharosa y la pureza analizada por electroforesis en gel. El GSE24-2 se obtuvo tras digestión con la proteasa TEV de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De forma rutinaria se obtuvo un 90% de la proteína digerida cuando según lo obtenido en electroforesis SDS-PAGE. La proteína fue pasada dos veces por una columna de Hi-Trap Ni-NTA para descartar colas de polihistidina, proteína no digerida la proteasa TEV e impurezas.

Mutagénesis dirigida. Las mutaciones de los residuos de guanina de la región NHEIII del promotor de c-MYC (px3.2) se realizó utilizando el kit Quickchange X-L site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Santa Clara, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayo de amplificación de repeticiones teloméricas (TRAP). La actividad telomerasa se midió utilizando el kit TRAPeze³⁷ telomerase detection kit (Intergen, Purchase, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo TRAP fue realizado titulando cada extracto proteico por la concentración total de la proteína presente en el mismo.

ES 2 334 736 B1

En los experimentos donde se indica se utilizó una sonda telomérica en el ensayo TRAP³⁸. La platinación *in vitro* fue llevada a cabo incubando con cisplatino directamente en la reacción TRAP.

5 *Immunoblots y anticuerpos.* Las células se lisaron tal como se había descrito previamente³⁹ y veinte μg de proteína se analizaron en geles SDS-PAGE al 10%. Los anticuerpos utilizados han sido: anti-pJNK (V7391, Promega, Madison, USA), anti-JNK1 (C-17, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA), anti p-P38 (Cell Signaling, Charlottesville, USA), 9-E10 (A14-Santa Cruz Biotechnologies) y anti-Flag (Invitrogen, Carlsbad, USA).

10 *Preparación de cDNA y RT-PCR.* El RNA total de las células fue extraído utilizando Trizol (Life Technologies, Carlsbad, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En cada reacción 2 microgramos de RNA total fueron transcritos a cDNA utilizando la transcriptasa reversa M-Mlv (Promega).

15 *Transfección y análisis de expresión génica.* Las células 293T se transfectaron transitoriamente utilizando el método de fosfato cálcico, tal como se ha descrito previamente³⁹. La cantidad total de DNA se mantuvo constante a 10 μg por millón de células. Las células X-DC se transfectaron transitoriamente por electroporación con 3 μg de pLNCX-GSE24-2 por millón de células. Las células VA13 MEFs fueron transfectadas con 16 μg de DNA/por millón de células utilizando lipofectamina plus (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los extractos de proteína se prepararon y la luciferasa fue medida utilizando un kit comercial (Promega). Cada ensayo fue realizado en triplicado y los experimentos fueron repetidos tres veces. La eficiencia de transfección fue corregida por co- transfección del plásmido p-CMV-Renilla.

20 *Ensayo de cambio de movilidad en gel.* Las células 293T fueron transfectadas con los plásmidos pCDNA3-E1024-2 o vector vacío y se generaron líneas estables por selección con G-418. Estas células expresan la proteína de fusión con epítipo E10-myc GSE24-2. La extracción de proteína nuclear⁴⁰ y las reacciones de binding fueron realizadas tal como se ha descrito anteriormente⁴¹. EL oligonucleótido TEL1 conteniendo la secuencia telomérica, y CXext que hibrida con la zona colgante de TEL1 (como control negativo)⁴¹ fueron marcados en el extremo 5' con T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs, Beverly, MA) y $\alpha^{32}\text{P}$ ATP (Amersham Biosciences, Orsay, France). La competición del binding del GSE24-2 se realizó con un anticuerpo contra el epítipo 9E10. Los complejos unidos a DNA fueron separados en geles no desnaturalizantes de acrilamida al 0,5% en tampón Tris Borate EDTA.

30 *Ensayos de viabilidad y de número de duplicaciones acumuladas (PLD).* El crecimiento y viabilidad celular fueron determinados utilizando el método de tinción con violeta cristal tal como se ha descrito previamente³⁹. Los fibroblastos DKC se mezclaron después de la infección y se seleccionaron las células resistentes a G-418. El crecimiento se midió en este cultivo cuantificando las PLDs desde el primer pase de las células después de la selección.

Ejemplo 1

El péptido GSE 24.2 *in vitro* rescata la actividad telomerasa

40 La secuencia telomérica TTAGGG es una diana para el cisplatino ⁴⁵. El resultado de la unión del cisplatino a esta región provoca la inhibición de la telomerasa y del acortamiento de los telómeros ⁴³. Por ello mismo, ya que la disquerina es uno de los componentes del complejo telomerasa ⁷ se procedió a estudiar el efecto del cisplatino y la expresión de GSE24-2 en la actividad telomerasa mediante un ensayo TRAP ³⁷(ver Materiales y Métodos), y se observó que células 293T transfectadas con un vector que permite la expresión GSE24-2 presentaban una mayor actividad telomerasa (Patente WO2007090911; descripción de la Fig. 1A).

50 En la presente memoria se describe por primera vez el uso del péptido SE 24.2 descrito previamente en un ensayo *in vitro* de inhibición de la actividad telomerasa mediante cisplatino utilizando extractos celulares de células 293T y una sonda telomérica, tratadas con cisplatino. En este ensayo, el péptido GSE24-2 se añadió de una manera dosis dependiente, para proteger la actividad telomerasa de los extractos (Figura 1C, líneas 3-5) de la inhibición de cisplatino. Por el contrario, el péptido GSE24-2 inactivado por calor o un péptido no relacionado fueron incapaces de rescatar la inhibición de la telomerasa inducida por cisplatino. (Fig 1C, líneas 7-8), indicando que el péptido GSE24-2 fue capaz de inhibir el crosslinking inducido por el cisplatino en telómeros *in vitro*. Además, se ha analizado la posible unión del péptido GSE24-2 a la secuencia telomérica utilizando ensayos de retardo en gel, utilizando un oligonucleótido que forma un bucle (TEL1) el cual reconstruye la secuencia de doble cadena del telómero con una pequeña secuencia 3' colgante 41. Se detectó un complejo específico GSE24-2/TEL1 (Fig 1D) en extractos de células expresando una proteína de fusión con el epítipo E10 y el GSE24-2 (El OGSE24-2). Los extractos de células expresando el vector vacío pCDNA3E10, no presentan unión al oligonucleótido. El oligonucleótido Cxext, el cual hibrida con la extensión 3' de cadena sencilla, inhibe completamente la formación del complejo GSE24-2/TEL1, y esta unión disminuye cuando se utiliza un anticuerpo (9E10) que compite con la proteína de fusión E10GSE24-2. En conjunto estos resultados indican que el GSE24-2 es capaz de unirse a secuencias teloméricas y que la falta de inhibición de actividad telomerasa por el cisplatino puede ser en parte un efecto protector del GSE24-2 sobre la sonda telomérica.

65

ES 2 334 736 B1

Ejemplo 2

El promotor de hTERT pero no el de hTR es activado por la proteína GSE24-2

5 Con anterioridad se observó que la capacidad de GSE24.2 de proteger frente a cisplatino se debía a la capacidad de mantener altos niveles de RNA de hTERT (WO2007090911). De acuerdo con esta hipótesis células 293T que sobreexpresan hTERT fueron más resistentes al cisplatino que las células control.

10 Puesto que el cisplatino induce una disminución en el mRNA de hTERT y la expresión del GSE24-2 parece compensar por este efecto, se investigó si podía deberse a cambio en transcripción de hTERT.⁵³ Se investigó la actividad del promotor de hTERT en células 293T por el GSE24-2 utilizando un vector reportero que contiene 3402 pb del promotor (hTERT).³³ La expresión de GSE24-2, pero no de DKC (pDKC), fue capaz de estimular la transcripción del promotor de hTERT en ensayos de transfección transitoria (Figura 2A). Además, el cisplatino estimula más la actividad del promotor en las células 393T expresando el GSE24-2 (cuadros vacíos) que en las células control (cuadros llenos) (Figura 2B). Estos resultados indican que la expresión del GSE24-2 fue capaz de estimular la transcripción aun en presencia del cisplatino, lo cual resulta en niveles incrementados del mRNA hTERT. Se ha sido capaz además de detectar estimulación de promotor de hTERT en células MEF (fibroblastos primarios de ratón) transfectadas con el plásmido GSE24-2 (datos no mostrados). No se observó ningún efecto de la expresión del GSE24-2 en el promotor de hTR⁹ utilizando células expresando DKC o GSE24-2 (Figura 2C). Por el contrario, el tratamiento con el inhibidor de JNK SP60125⁹ fue capaz de activar la actividad de este promotor (datos no mostrados) tal como se había descrito anteriormente¹¹. Estos resultados indican que la actividad del GSE24-2 es específica para la expresión de hTERT. Por otra parte, el fragmento de la disquerina 24-2, contiene dos dominios necesarios para la actividad pseudouridina sintasa, denominados motivo I (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4) y II (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6). Se subclonaron estos dos motivos en el vector pLNCX y una vez transfectados se observó que el motivo I, activa de forma significativa el promotor de hTERT. Por su parte, se observa que el efecto del fragmento completo de disquerina 24-2 es superior al del motivo I por separado, lo que indica que el motivo II también tiene efecto aditivo en la actividad telomerasa (Fig 2A).

30 La disquerina se identificó originalmente como un gen homólogo humano de cbf5⁵⁵ que muestra un 85% de identidad con el gen de *S. cerevisiae* Cbf5 a nivel de proteína⁵⁶. Por tanto clonamos del gen de levadura *S. cerevisiae* cbf5 la secuencia equivalente al GSE24-2 (SEQ ID NO2) en el vector pLNCX (pCBF5). La expresión de esta construcción también aumenta la expresión del promotor de hTERT (Figura 2A), pero no del promotor de hTR (Figura 2C). Esto indica un alto grado de conservación en la función de esta región de DKC.

35 Ejemplo 3

El dominio NHEIII del promotor c-MYC es la secuencia diana de GSE 24-2

40 El promotor de hTERT contiene dos cajas-E los cuales pueden unir heterodímeros myc/max^{32,57}. Una molécula híbrida que contiene el dominio de unión a DNA de c-myc el de transactivación de mad (pMad/myc) es capaz de unirse a las cajas E, y por tanto inhibe la transcripción dependiente de c-myc. La expresión de mad/myc fue capaz de inhibir la actividad del promotor de hTERT de una forma dependiente de dosis en las células control así como en células DKC (Figura 2D). Además, la expresión de myc/mad fue capaz de abolir la activación transcripcional mediada por la proteína GSE 24.2 en células GSE24-2. Esto indica que la activación de transcripción de hTERT inducida por el GSE24-2 es dependiente de c-myc (Figura 2D). La inhibición es específica ya que la transfección de la construcción myc/mad (pMad/myc) junto con un vector reportero para el promotor de NFκB (HIVLuc) no afecta la transcripción inducida por TNFα (Figura 2E).

50 Un vector reportero conteniendo 3.2 Kb del gen c-myc (px3.2myc), y que incluye los promotores P0, P1 y P2 unidos al gen de luciferasa (Figura 3A) fue transfectada en células controles in células GSE24-2. Se observó un aumento de tres veces la actividad del promotor en las células GSE24-2 en relación a las células control (Figura 3B). Un resultado similar se obtuvo cuando se transfectaron células 293T con el vector pLNCX o un plásmido expresando el GSE24-2 junto con el vector reportero px3.2myc (datos no mostrados). Tres mutantes de delección del promotor de c-myc fueron utilizados para definir la región necesaria para la activación mediada por el GSE24-2 (Figura 3A). Sólo aquellas construcciones que contenían los promotores distales P1 y P0, que incluían el NHEIII, fueron capaces de ser activadas en células GSE24-2, pero no en células controles (Figura 3B). Esto indica que el promotor proximal P2 no está involucrado en la activación mediada por el GSE.

60 Se obtuvieron diferentes mutantes del NHEIII mediante la sustitución de residuos de guanina de la región rica en purinas involucrada en mantener la estructura secundaria del cuarteto de G (Pu27). Se obtuvieron mutantes de G12A en el segundo grupo de G del cuarteto, G17A del segundo triplete de G y finalmente dos guaninas consecutivas (G26A/G27A) al final de la región rica en purinas (Figura 3C). Los resultados indican que sólo la secuencia original es activada por el GSE24-2 (Figura 3D). En su conjunto estos resultados sugieren que el GSE24-2 es capaz de inducir una modificación de la estructura secundaria de la región Pu27 en una conformación activa que permite la transcripción de c-myc.

También se estudió si los cambios observados en la actividad del promotor de c-myc se reflejaban en la expresión del mismo. Para ello se transfectaron células MEF de forma transitoria con vectores de expresión, vacío, DKC o GSE24-2 y a continuación se midieron los niveles de RNAm y de proteína de c-myc (Figura 3E y 3F). Tal como se esperaba sólo la expresión del GSE24-2 fue capaz de inducir una activación de la expresión, tanto de la proteína como del mRNA de c-MYC. Uno de los efectos no deseados de la expresión del GSE24-2 podría ser que el aumento en la expresión de c-MYC podría inducir transformación celular. Con el fin de evaluar esta posibilidad, se inocularon ratones atímicos con células Pam212, expresando tanto vector vacío, el gen humano c-myc, o el GSE24-2. Sólo los animales inoculados con células expresando c-myc desarrollaron tumores durante los primeros 10 días mientras que las células expresando el GSE24-2 no desarrollaron tumores aun después de tres meses tras la inoculación.

Ejemplo 4

La actividad telomerasa en células VA13 y de pacientes X-DC, estimulada mediante GSE24-2, las recupera del proceso de senescencia

Se ha evaluado el efecto de la expresión de GSE24-2 en células derivadas de pacientes con X-DC. Se utilizaron linfoblastos comerciales derivados de una madre portadora (DC, alelo dkc normal) y sus tres hijos afectados clínicamente (DC1, DC2 y DC3, alelo dkc mutante). Estas células no se encuentran inmortalizadas y normalmente en cultivo entran en senescencia. Además de lo observado anteriormente, es decir, la expresión de GSE24-2 incrementa la actividad telomerasa en todas estas líneas celulares (Figura 4A), no se ha observado un incremento de la actividad telomerasa con la expresión de la disquerina completa (Figura 4B) tal como se ha descrito previamente²¹. Los niveles de RNA de hTERT y hTR están incrementados en las células transfectadas con GSE24-2 (Figura 4C) sugiriendo que la recuperación de la actividad telomerasa con la transfección de GSE24-2 se debe al incremento de ambas moléculas.

Por otro lado, los fibroblastos dérmicos primarios de pacientes X-DC se vuelven completamente senescentes en 3-4 semanas de cultivo continuo, mientras que las células normales proliferan hasta dos meses antes de alcanzar la fase senescencia²¹. Las células X-DC que expresan hTERT adquieren capacidad de dividirse por mayor tiempo y crecen de forma continuada durante varios meses²¹. La expresión de GSE24-2 en las células FIB1787 de X-DC, como ya se vio anteriormente, fue capaz de inducir un incremento de la actividad telomerasa (Figura 4D) mediante un incremento de la expresión de los niveles de RNA de hTR y hTERT en fibroblastos de X-DC (Figura 4E), y, sorprendentemente, que estas células eran capaces de crecer de forma continuada, (Figura 5), hasta 140 días (la duración de este periodo de tiempo está limitado por la presentación de la presente patente).

Más interesante, en la línea celular VA13 deficiente de telomerasa (forma salvaje de disquerina) que presentan una ausencia de hTERT y hTR⁵⁹ y que mantiene los telómeros mediante un mecanismo ALT, la expresión de GSE24-2 fue capaz de recuperar la actividad telomerasa (Figura 4G), los niveles de RNA de hTERT y de hTR (Figura 4H).

Referencias bibliográficas

- 1.- De Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*. 2002; 21: 532-540.
- 2.- Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell*. 2001; 106: 661-673.
- 3.- Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene*. 2002; 21: 564-579.
- 4.- Colgin LM, Reddel RR. Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. *Curr Opin Genet Dev*. 1999; 9: 97-103.
- 5.- Harley CB. Telomerase therapeutics for degenerative diseases. *Curr Mol Med*. 2005; 5: 205-211.
- 6.- Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005; 6: 611-622.
- 7.- Cohen SB, Graham ME, Lovrec GO, et al. Protein composition of catalytically active-human telomerase from immortal cells. *Science*, 2007; 315: 1850-1853.
- 8.- Zhao J Q, Hoare S F, McFarlane R, et al. Cloning and characterization of human and mouse telomerase RNA gene promoter sequences. *Oncogene*. 1998; 16: 1345-1350.
- 9.- Takakura M, Kyo S, Kanaya T, et al. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res*. 1999; 59: 551-5577.
- 10.- Gomez D, Aouali N, Renaud A, et al. Resistance to senescence induction and telomere shortening by a G-quadruplex ligand inhibitor of telomerase. *Cancer Res*. 2003; 63: 6149-6153.

ES 2 334 736 B1

- 11.- **Li H, Xu D, Li J, Berndt MC, Liu JP.** Transforming growth factor beta suppresses human telomerase reverse transcriptase (hTERT) by Smad3 interactions with c-Myc and the hTERT gene. *J Biol Chem.* 2006; 281: 25588-255600.
- 5 12.- **Levens D, Duncan R C, Tomonaga T, et al.** DNA conformation, topology, and the regulation of c-myc expression. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1997; 224: 33-46.
- 13.- **Siebenlist U, Hennighausen L, Battey J, Leder P.** Chromatin structure and protein binding in the putative regulatory region of the c-myc gene in Burkitt lymphoma. *Cell.* 1984; 37: 381-391.
- 10 14.- **Mirkin S M, Frank-Kamenetskii MD.** H-DNA and related structures. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1994; 23: 541-576.
- 15 15.- **Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH.** Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 11593-11598.
- 20 16.- **Bessler M, Wilson DB, Mason PJ.** Dyskeratosis congenita and telomerase. *Curr Opin Pediatr.* 2004; 16: 23-28.
- 17.- **Marrone A, Mason PJ.** Dyskeratosis congenita. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60: 507-517.
- 18.- **Mason PJ, Wilson DB, Bessler M.** Dyskeratosis congenita -- a disease of dysfunctional telomere maintenance. *In Curr Mol Med.* 2005; 5: 159-170.
- 25 19.- **Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, et al.** X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet.* 1998; 19: 32-38.
- 20.- **Knight SW, Heiss NS, Vulliamy TJ, et al.** X-linked dyskeratosis congenita is predominantly caused by mis-sense mutations in the DKC1 gene. *Am J Hum Genet.* 1999; 65: 50-58.
- 30 21.- **Mitchell J, Wood E, Collins K.** A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature.* 1999; 402: 551-555.
- 35 22.- **Normand C, Capeyrou R, Quevillon-Cheruel S, Mougin A, Henry Y, Caizergues-Ferrer M.** Analysis of the binding of the N-terminal conserved domain of yeast Cbf5p to a box H/ACA snoRNA. *RNA.* 2006; 12: 1868-82.
- 23.- **Henras A, Henry Y, Bousquet-Antonelli C, Noaillac-Depeyre J, Gélugne JP, Caizergues-Ferrer M.** Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs.; *EMBO J.* 1998; 17: 7078-7090.
- 40 24.- **Pogacic V, Dragon F, Filipowicz W.** Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10.. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 9028-40.
- 25.- **Wang C, Meier UT.** Architecture and assembly of mammalian H/ACA-small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins. *EMBO J.* 2004; 23: 1857-1867.
- 45 26.- **Henras AK, Capeyrou R, Henry Y, et al** Cbf5p, the putative pseudouridine synthase of H/ACA-type snoRNPs, can form a complex with Gar1 p and Nop10p in absence of Nhp2p and box H/ACA snoRNAs. *RNA.* 2004; 10: 1704-12.
- 50 27.- **Rashid R, Liang B, Baker D L, et al.** Crystal structure of a Cbf5-Nop10-Gar1 complex and implications in RNA-guided pseudouridylation and dyskeratosis congenita. *Mol Cell.* 2006; 21: 249-260.
- 28.- **Darzacq X, Kittur N, Roy S, et al** Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells. *J Cell Biol.* 2006; 173: 207-18.
- 55 29.- **Tollervey D, Kiss T.** Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9: 337-342.
- 30.- **Fu D, Collins K.** Distinct biogenesis pathways for human telomerase RNA and H/ACA small nucleolar RNAs. *Mol Cell.* 2003; 11: 1361-1372.
- 60 31.- **Wong JM, Collins K.** Telomerase RNA level limits telomere maintenance in X-linked dyskeratosis congenita. *Genes Dev.* 2006; 2: 2848-2858.
- 65 32.- **Oh S, Song YH, Kim UJ, Yim J, Kim TK.** *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.* 1999; 263: 361-365.

ES 2 334 736 B1

- 33.- **Kalinin A, Thomä NH, Iakovenko A, Heinemann I, Rostkova E, Constantinescu AT, Alexandrov K.** Expression of mammalian geranylgeranyltransferase type-II in *Escherichia coli* and its application for *in vitro* prenylation of Rab proteins. *Protein Expr Purif.* 2001; 22: 84-91.
- 5 34.- **Sirinavin C, Trowbridge AA.** Dyskeratosis congenita: clinical features and genetic aspects. Report of a family and review of the literature. *J Med Genet.* 1975; 12: 339-354.
- 35.- **Trowbridge AA, Sirinavin C, Linman JW.** Dyskeratosis congenita: hematologic evaluation of a sibship and review of the literature. *Am J Hematol.* 1977; 3: 143-152.
- 10 36.- **Roninson IB, Gudkov AV, Holzmayer TA, et al.** Genetic suppressor elements: new tools for molecular oncology. *Cancer Res.* 1995; 55: 4023-4028.
- 37.- **Wright WE, Shay JW, Piatyszek MA.** Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23: 3794-3795.
- 15 38.- **Gomez D, Mergny JL, Riou JF.** Detection of telomerase inhibitors based on g-quadruplex ligands by a modified telomeric repeat amplification protocol assay *Cancer Res.* 2002; 62: 3365-8.
- 20 39.- **Sanchez-Perez I, Perona R.** Lack of c-Jun activity increases survival to cisplatin. *FEBS Lett.* 1999; 453: 151-158.
- 40.- **Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lical JC.** 1997 Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 1997; 11: 463-75.
- 25 41.- **Gomez D, O'Donohue MF, Wenner T, Douarre C, Macadre J, Koebel P, Giraud-Panis MJ, Kaplan H, Kolkes A, Shin-ya K, Riou JF.** The G-quadruplex ligand telomestatin inhibits POT1 binding to telomeric sequences *in vitro* and induces GFP-POT1 dissociation from telomeres in human cells. *Cancer Res.* 2006; 66: 6908-12.
- 30 42.- **Redon S, Bombard S, Elizondo-Riojas MA, Chottard JC.** Platination of the (T2G4) 4 telomeric sequence: a structural and cross-linking study. *Biochemistry.* 2001; 40: 8463-8470.
- 43.- **Ishibashi T, Lippard SJ.** Telomere loss in cells treated with cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 4219-4223.
- 35 44.- **Parkinson GN, Lee M P, Neidle S.** Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature.* 2002; 417: 876-880.
- 45.- **Bednarek A, Shilkaitis A, Green A, et al.** Suppression of cell proliferation and telomerase activity in 4-(hydroxyphenyl)retinamide-treated mammary tumors. *Carcinogenesis.* 1999; 20: 879-883.
- 46.- **Kim JH, Kim, JH, Lee GE, Kim SW, Chung IK.** Identification of a quinoxaline derivative that is a potent telomerase inhibitor leading to cellular senescence of human cancer cells. *Biochem J.* 2003; 373: 523-529.
- 45 47.- **Hurley LH.** DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 188-200.
- 48.- **Sun D, Thompson B, Cathers BE, et al.** Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J Med Chem.* 1997; 40: 2113-2116.
- 50 49.- **Cuesta J, Read MA, Neidle S.** The design of G-quadruplex ligands as telomerase inhibitors. *Mini Rev Med Chem.* 2003; 3:11-21.
- 50.- **Chau NP, Deschatrette J, Wolfrom C** Reversal of hepatoma cells resistance to anticancer drugs is correlated to cell proliferation kinetics, telomere length and telomerase activity. *Anticancer Res.* 2005; 25: 3279-85.
- 55 51.- **Lin CP, Liu JD, Chow JM, Liu CR, Liu HE.** Small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, inhibits proliferation, downregulates human telomerase reverse transcriptase and enhances chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells. *Anticancer Drugs.* 2007; 18: 161-70.
- 60 52.- **Sun PM, Wei LH, Luo MY, Liu G, Wang JL, Mustea A, Kbnsen D, Lichtenegger W, Sehouli J.** The telomerase activity and expression of hTERT gene can serve as indicators in the anti-cancer treatment of human ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007; 130: 249-57.
- 65 53.- **Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO.** Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene.* 2001; 269: 1-12.

ES 2 334 736 B1

54.- **Meier UT, Blobel G.** NAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria. *J Cell Biol.* 1994; 127: 1505-14.

55.- **Meier UT.** The many facets of H/ACA ribonucleoproteins. *Chromosoma.* 2005; 114: 1-14.

56.- **Zucchini C, Strippoli P, Biolchi A, et al.** The human TruB family of pseudouridine synthase genes, including the Dyskeratosis Congenita 1 gene and the novel member TRUB1. *Int J Mol Med.* 2003; 11: 697-704.

57.- **Wu KJ, Grandori C, Amacker M, et al.** Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet.* 1999; 21: 220-224.

58.- **Mochizuki Y, He J, Kulkarni S, Bessler M, Mason PJ.** Mouse dyskerin mutations affect accumulation of telomerase RNA and small nucleolar RNA, telomerase activity, and ribosomal RNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 10756-10761.

59.- **Bryan TM, Marusic L, Bacchetti S, Namba M, Reddel RR** The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. *Hum Mol Genet.* 1997; 6: 921-6.

60.- **Kunifujii Y, Gotoh S, Abe T, Miura M, Karasaki Y.** Down-regulation of telomerase activity by anticancer drugs in human ovarian cancer cells. *Anticancer Drugs.* 2002; 13: 595-598.

61.- **Postel EH, Berberich SJ, Rooney JW, Kaetzel DM.** Human NM23/nucleoside diphosphate kinase regulates gene expression through DNA binding to nuclease-hypersensitive transcriptional elements. *J Bioenerg Biomembr.* 2000; 32: 277-284.

62. **Nosaka K, Kawahara M, Masuda M, Satomi Y, Nishino H.** Association of nucleoside diphosphate kinase nm23-H2 with human telomeres. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 243: 342-348.

ES 2 334 736 B1

REIVINDICACIONES

1. Uso de la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, o una variante funcional de la misma, que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, una variante o un fragmento biológicamente activo de la SEQ ID NO: 2, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o situación patológica causada por una alteración de la telomerasa que da lugar a un proceso de senescencia.

2. Uso de una secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior, donde la secuencia nucleotídica es la SEQ ID NO: 3, o una variante funcional de la misma, y la aminoacídica del fragmento biológicamente activo consiste en la SEQ ID NO: 4.

3. Uso de una secuencia nucleotídica según la reivindicación 1, donde la secuencia nucleotídica es la SEQ ID NO: 5, o una variante funcional de la misma, y la secuencia aminoacídica del fragmento biológicamente activo consiste en la SEQ ID NO: 6.

4. Uso de un péptido que consiste en la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2, o en una variante funcional o un fragmento biológicamente activo de la SEQ ID NO: 2, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o situación patológica causada por una alteración de la telomerasa que da lugar a un proceso de senescencia.

5. Uso de un péptido según la reivindicación anterior, donde la secuencia aminoacídica del fragmento biológicamente activo consiste en la SEQ ID NO: 4.

6. Uso de un péptido según la reivindicación 4, donde la secuencia aminoacídica del fragmento biológicamente activo consiste en la SEQ ID NO: 6.

7. Uso de una construcción genética que comprende:

a) una secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, ó

b) la secuencia nucleotídica según (a) incluida en un vector de expresión, unida de manera operativa a, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o situación patológica causada por una alteración de la telomerasa que da lugar a un proceso de senescencia.

8. Uso de un vector de expresión, **caracterizado** porque comprende una secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una construcción genética según la reivindicación 7, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o situación patológica causada por una alteración de la telomerasa que da lugar a un proceso de senescencia.

9. Uso de un vector de expresión según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el vector de expresión es el plásmido pLNCX 24.2.

10. Uso de células genéticamente modificadas, **caracterizadas** porque comprenden la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, la construcción genética según la reivindicación 7, o el vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en las que se expresa el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o situación patológica causada por una alteración de la telomerasa que da lugar a un proceso de senescencia.

11. Uso de células según la reivindicación anterior, donde las células son eucariotas no humanas.

12. Uso de células según la reivindicación 10, donde las células son eucariotas humanas obtenidas por medios que no involucren la destrucción de embriones humanos.

13. Uso de células según cualquiera de las reivindicaciones 11-12 para la regeneración de tejidos.

14. Uso de una composición que comprende:

(a) una secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3,

(b) una secuencia aminoacídica según cualquiera de las reivindicaciones 4-6,

(c) una construcción genética según la reivindicación 7,

(d) un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 8-9,

(e) una célula genéticamente modificada según la reivindicación 10,

ES 2 334 736 B1

(f) una célula eucariota no humana genéticamente modificada según la reivindicación 11,

(g) una célula eucariota humanas genéticamente modificadas y obtenida por medios que no involucren la destrucción de embriones humanos según la reivindicación 11,

5 o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o situación patológica causada por una alteración de la telomerasa que da lugar a un proceso de senescencia.

10 15. Uso de una composición según la reivindicación 14, donde el proceso de senescencia afecta a células con alto nivel de proliferación.

15 16. Uso de una composición según la reivindicación 15, donde las células con alto nivel de proliferación son células epiteliales.

17. Uso de una composición según la reivindicación 15, donde las células con alto nivel de proliferación pertenecen al grupo que se selecciona de la lista que comprende: células del sistema hematopoyético y fibroblastos.

20 18. Uso de una composición según la reivindicación 17, donde las células del sistema hematopoyético son linfocitos.

19. Uso de una composición según la reivindicación 14, para obtener líneas celulares inmortalizadas.

25 20. Uso de una composición según la reivindicación anterior, donde las células son células humanas.

21. Uso de una composición según la reivindicación 20, donde las células humanas son adultas.

30

35

40

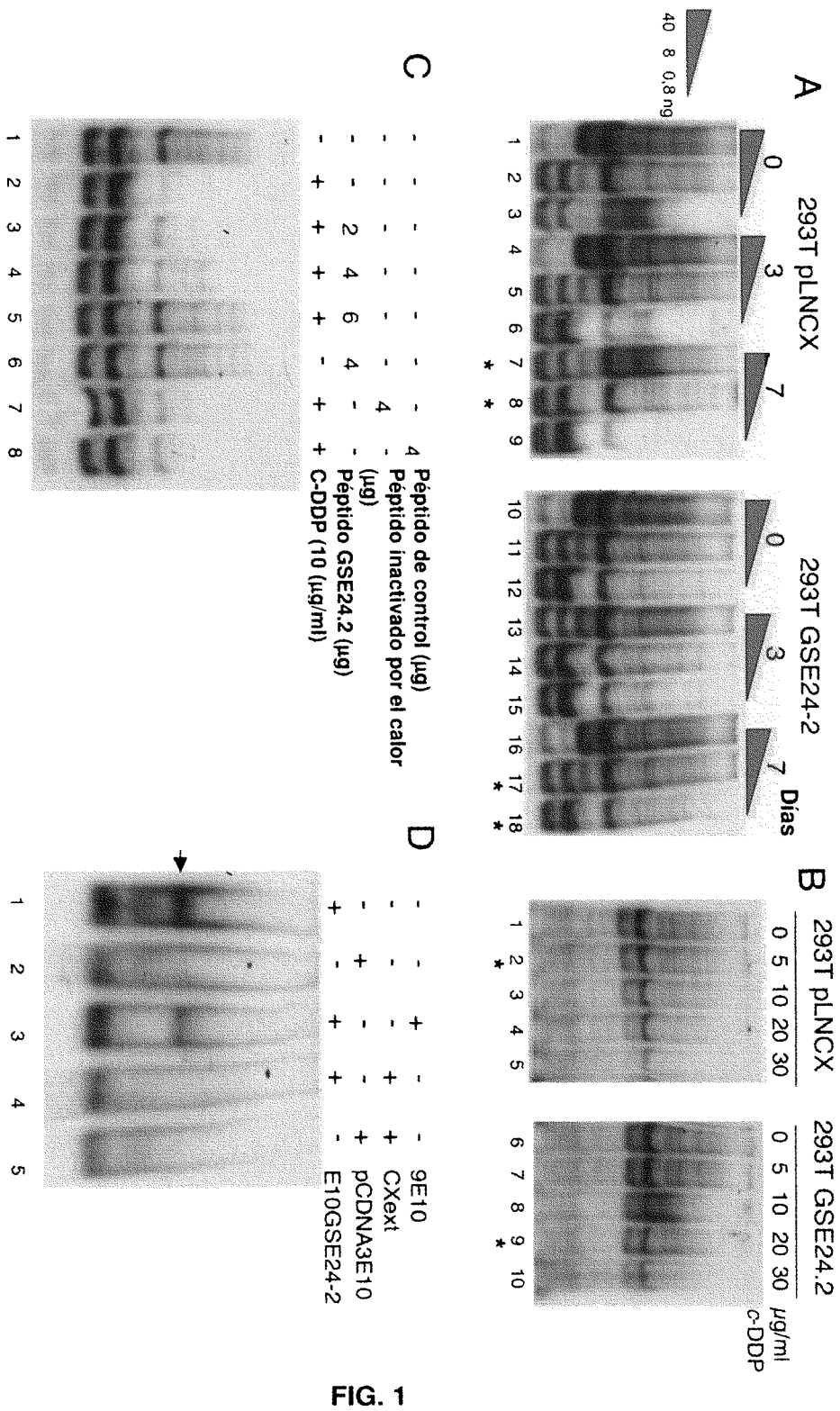
45

50

55

60

65



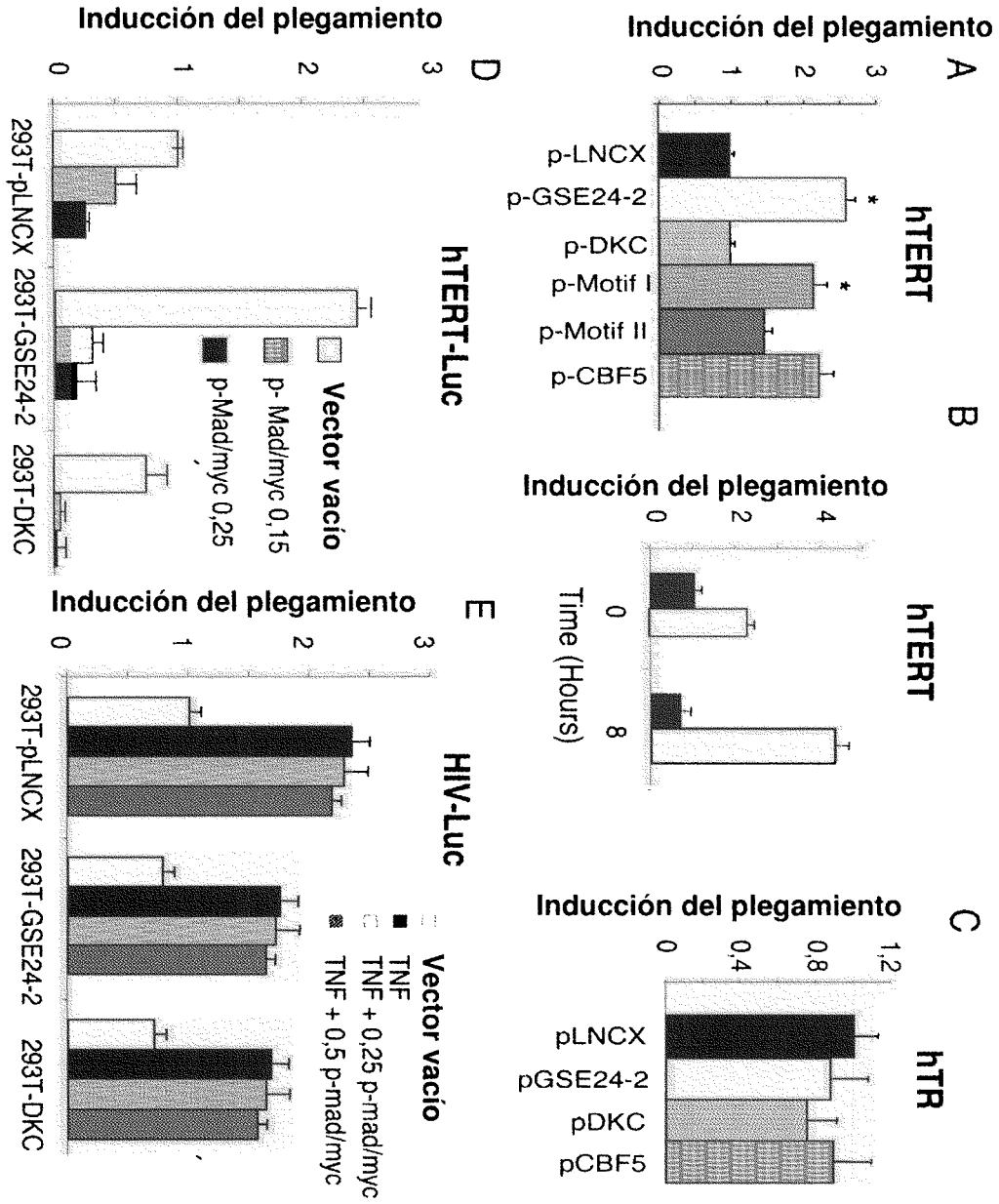


FIG. 2

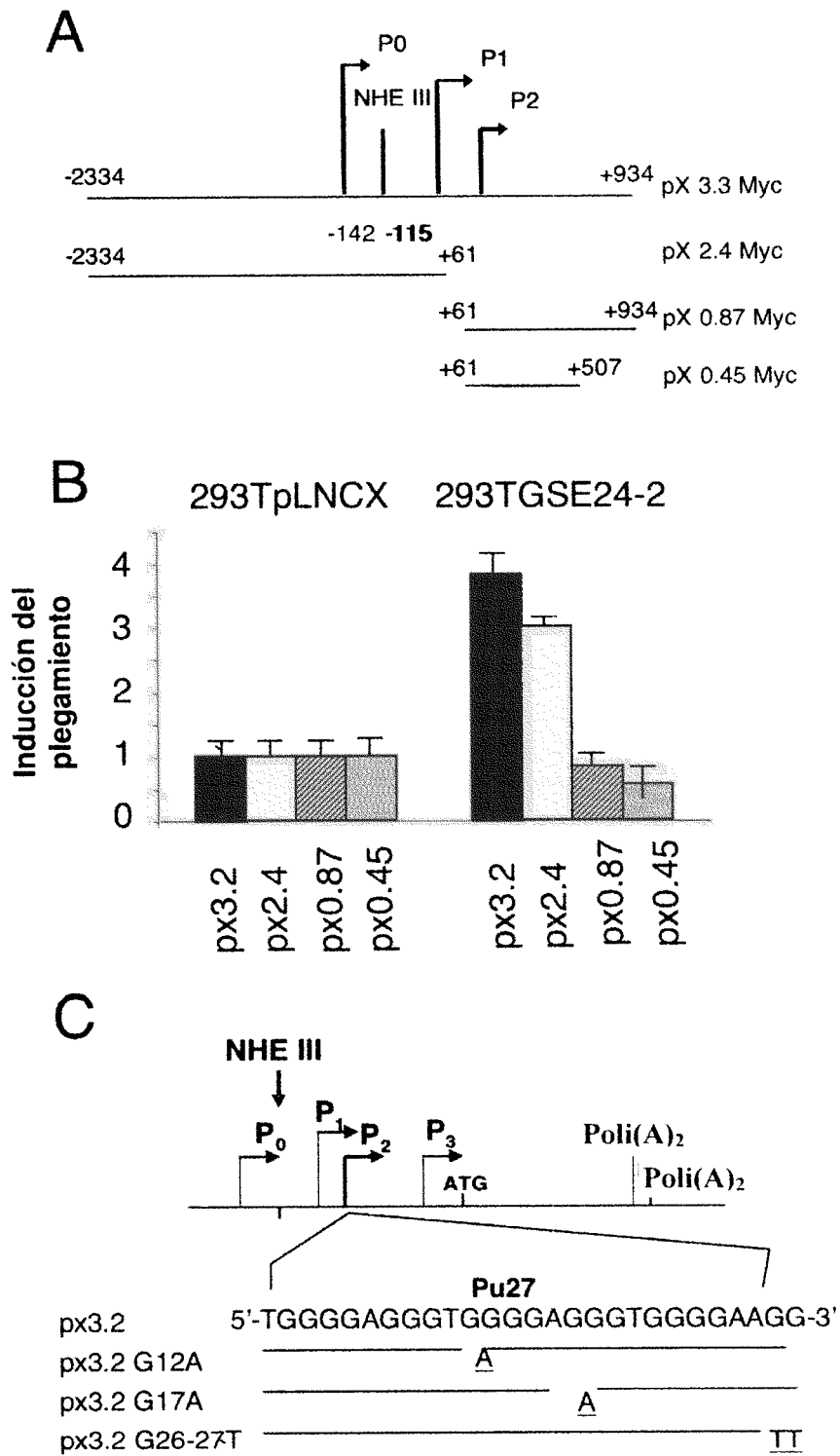


FIG. 3

D 293T_{PLNCX} 293T_{GSE24-2}

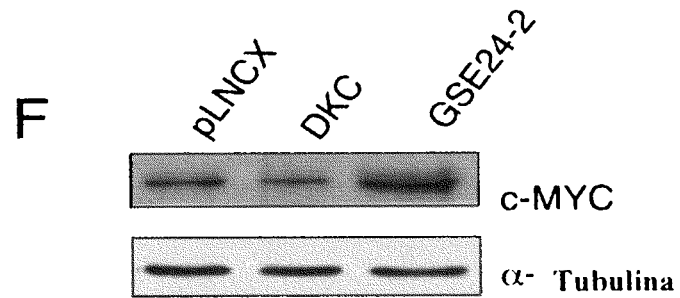
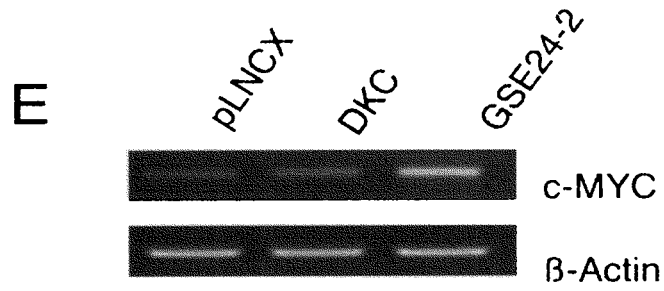
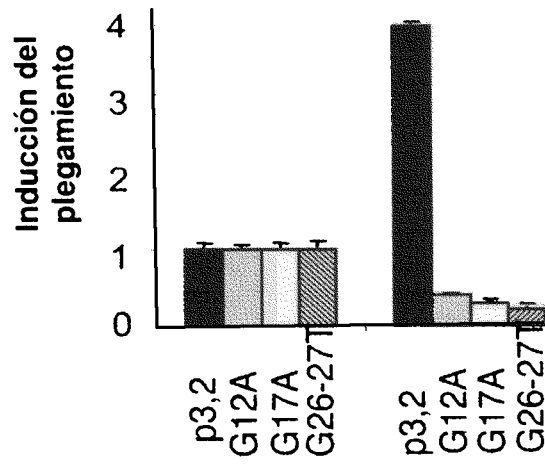


FIG. 3 (CONTINUACIÓN)

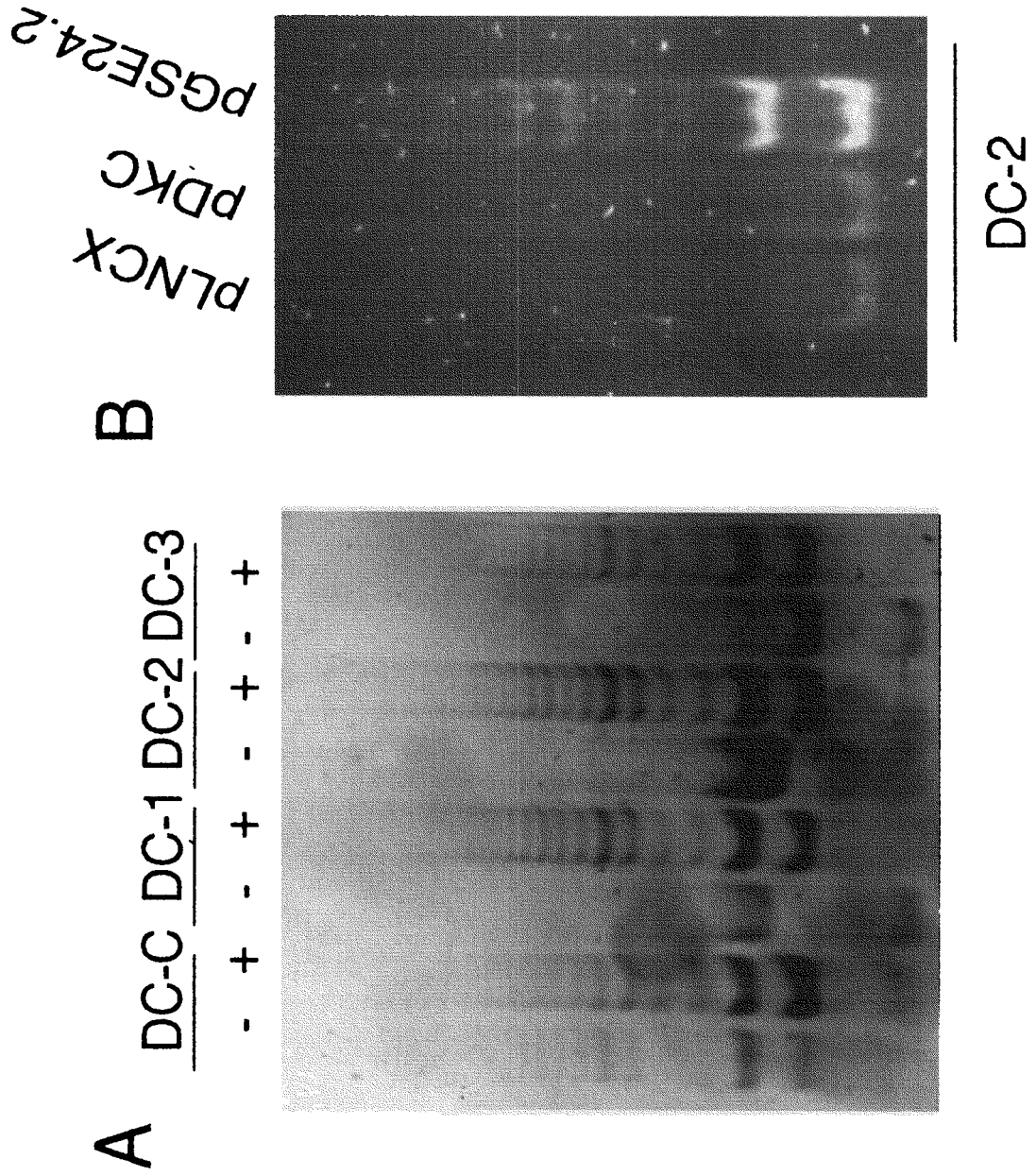


FIG. 4 (A y B)

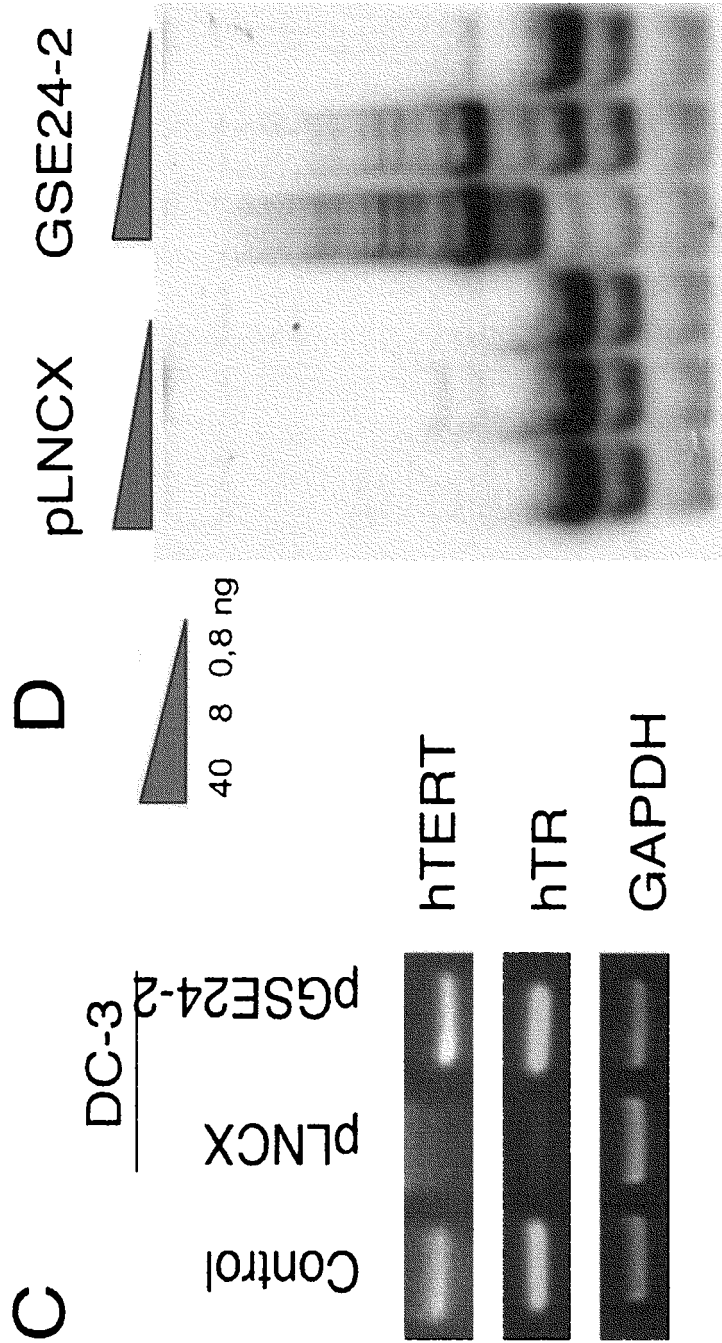


FIG. 4 (C y D)

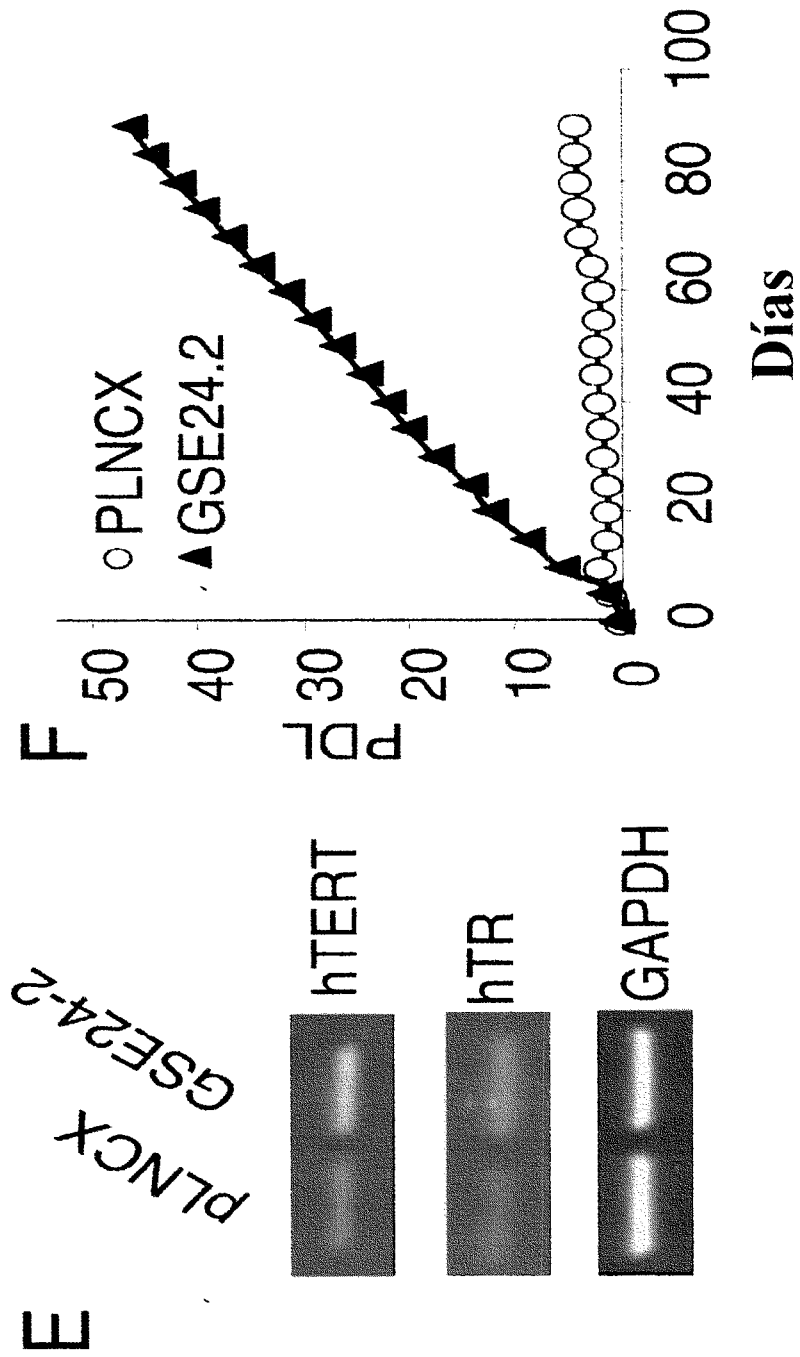


FIG. 4 (E y F)

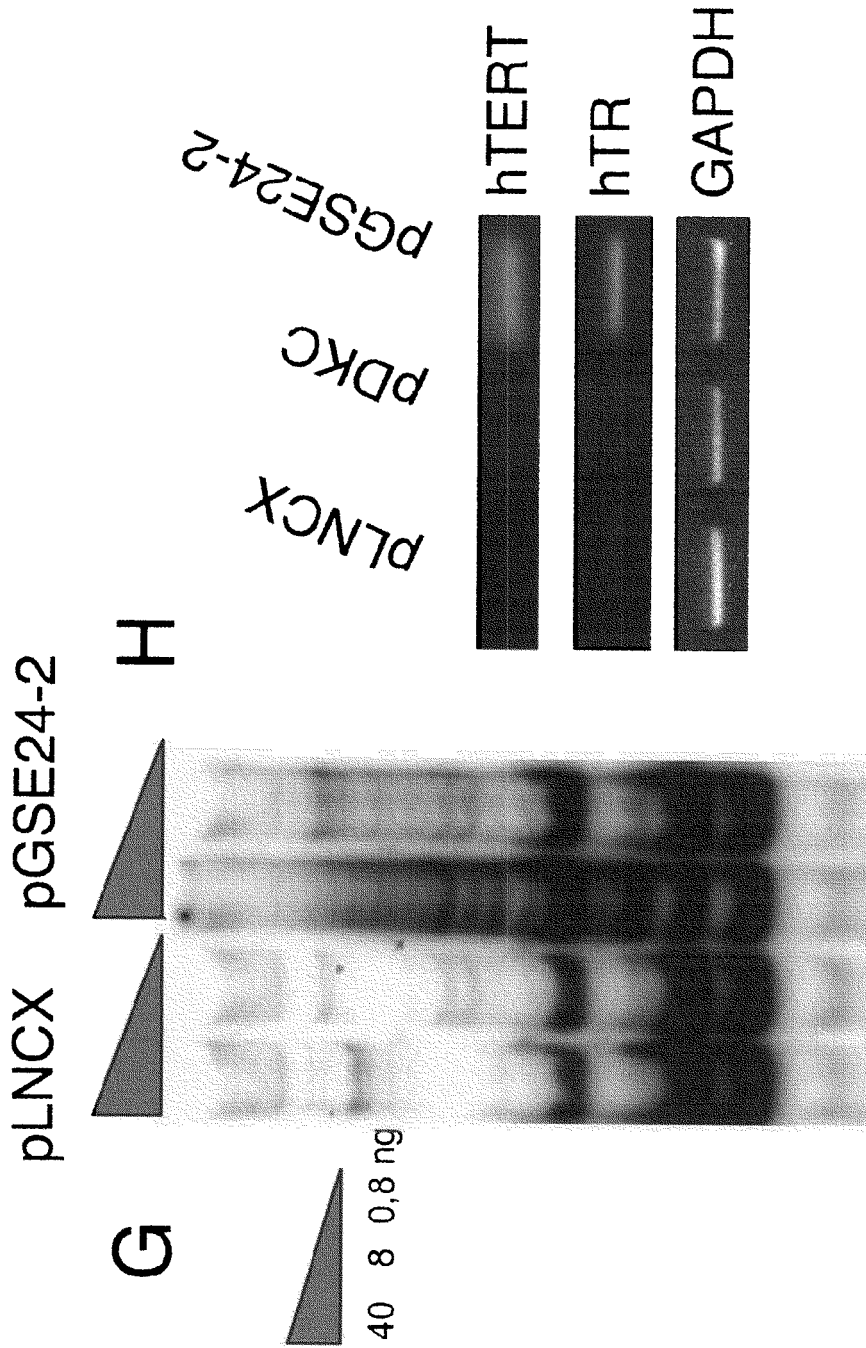


FIG. 4 (G)

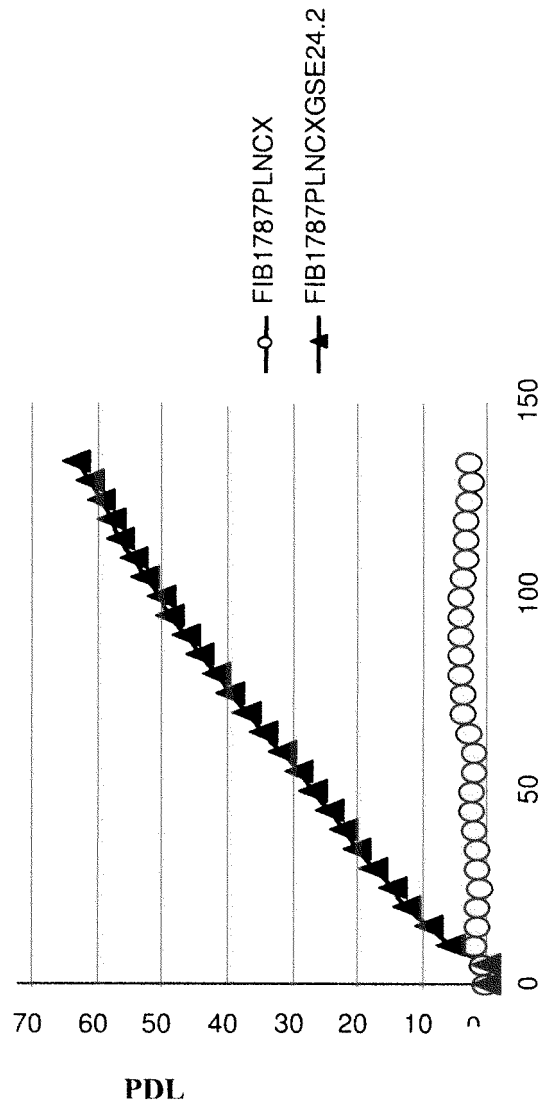


FIG. 5

ES 2 334 736 B1

LISTA DE SECUENCIAS

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

10 <120> USO DE AGENTES INDUCTORES GSE24.2 PARA LA ELABORACIÓN DE COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES QUE CURSAN CON SENESCENCIA CELULAR

15 <130> ES1641.550

20 <150>

25 <151>

30 <160> 6

35 <170> PatentIn version 3.3

40 <210> 1

45 <211> 165

50 <212> DNA

55 <213> *Homo sapiens*

60 <220>

65 <221> CDS

70 <222> (1)..(165)

75 <223> Secuencia GSE 24.2

80 <400> 1

| | | |
|----|---|-----|
| 40 | 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 | |
| 45 | 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 | |
| 50 | ggt act ctg gat ccc aag gtg act ggt tgt tta atc gtg tgc ata gaa | 144 |
| | Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val Thr Gly Cys Leu Ile Val Cys Ile Glu | |
| | 35 40 45 | |
| 55 | cga gcc act cgc ttg gtg aag | 165 |
| | Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys | |
| | 50 55 | |

60 <210> 2

65 <211> 55

70 <212> PRT

75 <213> *Homo sapiens*

ES 2 334 736 B1

<400> 2

```

    Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val
    1           5           10           15
5    Val Ala Trp Ile Arg Arg Ile Leu Arg Val Glu Lys Thr Gly His Ser
           20           25           30
10   Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val Thr Gly Cys Leu Ile Val Cys Ile Glu
           35           40           45
15   Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys
           50           55

```

<210> 3

<211> 54

20 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(54)

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(50)

<223> Dominio Trub I

35

<400> 3

```

    ggt ttc att aat ctt gac aag ccc tct aac ccc tct tcc cat gag gtg      48
    Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val
    1           5           10           15
40   gta gcc
    Val Ala      54

```

45 <210> 4

<211> 18

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

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

```

60 <210> 5

<211> 75

<212> DNA

65 <213> *Homo sapiens*

<220>

ES 2 334 736 B1

```

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

5 <220>
  <221> misc_feature
  <222> (4)..(50)
  <223> Dominio Trub II
10
  <400> 5

15      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      1          5          10          15

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

<210> 6
<211> 25
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

35      Ile Glu Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys
          20          25

40

45

50

55

60

65

```



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 334 736

②1 N° de solicitud: 200703106

②2 Fecha de presentación de la solicitud: **23.11.2007**

③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤1 **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤6 Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | WO 2007090911 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID-FUNDACIÓN GENERAL y UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA) 16.08.2007, todo el documento. | 1-21 |
| A | WESTIN, E.R., et al. Telomere restoration and extension of proliferative lifespan in dyskeratosis congenita fibroblasts. Aging Cell. Junio-2007. Vol. 6, n° 3, páginas 383-394. | |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

01.03.2010

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 38/45 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

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

A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, EBI (UniProt, aaGeneSeq, Euro Patents, Japan Patents, US Patents, PDB, EMBL All, naGeneSeq)

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.03.2010

Declaración

| | | |
|--|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones | SÍ |
| | Reivindicaciones 1-21 | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones | SÍ |
| | Reivindicaciones 1-21 | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|-------------------------------------|-------------------|
| D01 | WO 2007090911 A1 | 16-08-2007 |
| D02 | WESTIN, E.R., et al. | 06-2007 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe el uso de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos correspondientes al elemento supresor genético 24.2 (en adelante, GSE24.2) para la elaboración de medicamentos útiles para la recuperación de la actividad telomerasa en enfermedades o procesos de senescencia debidos a acortamiento o erosión de telómeros. Además de las secuencias concretas, describe la introducción de las mismas en células eucariotas mediante distintos vectores de expresión.

Se ha encontrado en el estado de la técnica un documento que divulga las secuencias empleadas en la solicitud, y los mismos usos que se reivindican en la solicitud. Así, en el documento D01 encontramos que las secuencias SEQ ID NO 1, 2, 11, 12, 13 y 14 corresponden a las secuencias SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente, de la solicitud, por lo que tales secuencias no pueden considerarse nuevas. Del mismo modo que en la solicitud, en D01 se introducen estas secuencias en células eucariotas (incluso se emplea el mismo vector de expresión que el utilizado en la solicitud, pLNCX) y se consigue un aumento en los niveles de expresión y una activación de la actividad telomerasa en las células, lo que lleva asociado una mayor capacidad de supervivencia de las células. Asimismo, D01 describe una composición farmacéutica que contiene las secuencias de GSE24.2 y su uso para tratar patologías que cursan con alteraciones de la actividad telomerasa, incluyendo las causadas por envejecimiento celular. Por último, también en D01 se describen células modificadas genéticamente y que contienen las secuencias de GSE24.2 reivindicadas en la solicitud.

Por consiguiente, y dado que lo divulgado en el documento D01 anticipa las reivindicaciones de la solicitud, no se considera que ésta cumpla los requisitos de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.

Por otra parte, en el documento D02 se describe un método para recuperar la actividad telomerasa en células de enfermos con disqueratosis congénita mediante la reconstitución de los componentes de la enzima telomerasa, el efecto que esta recuperación de actividad tiene en la longitud de los telómeros y la vida de las células, y el potencial de utilizar tal proceso para prevenir la senescencia prematura. Aunque se trata de un proceso muy semejante al de la solicitud, el método de recuperación de la actividad telomerasa no supone la utilización de las secuencias de GSE24.2, sino la expresión retroviral de los propios componentes de la telomerasa en las células afectadas. Por tanto, aunque el efecto conseguido es el mismo, el documento D02 no parece afectar en modo alguno la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud, por lo que se considera que dicho documento forma parte del estado de la técnica general del campo de la solicitud.