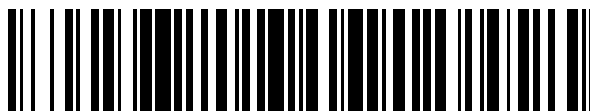


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 461**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2010 E 10168341 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2402038**

54 Título: **La transcriptasa inversa de la telomerasa como protección frente al envejecimiento**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2016

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN CENTRO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS CARLOS III
(50.0%)
C/ Melchor Fernández Almagro 3
28029 Madrid, ES y
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**BLASCO MARHUENDA, MARÍA ANTONIA;
BERNARDES, BRUNO;
BOSCH TUBERT, FÁTIMA y
AYUSO, EDUARD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 590 461 T3

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

DESCRIPCIÓN

La transcriptasa inversa de la telomerasa como protección frente al envejecimiento

Campo de la invención

5 Esta invención cae dentro del campo de la biología molecular, biotecnología y medicina. Más específicamente, se refiere a vectores de terapia génica para la mejora de ciertos marcadores de envejecimiento en mamíferos, y al alargamiento de la esperanza de vida.

Estado de la técnica

10 Un objetivo importante en la investigación sobre el envejecimiento es la mejora del estado de salud durante el envejecimiento. Un aumento en la esperanza de vida tiene poco significado si no está vinculada con la conservación de un estado saludable o una mejora de diversos parámetros relacionados con la edad (la llamada "esperanza de gozar de buena salud"). A menudo, la conservación o mejora de la esperanza de buena salud es acompañada por un aumento de la esperanza de vida (Bluher, Kahn *et al.* 2003; Conboy, Conboy *et al.* 2005; Tomas-Loba, Flores *et al.* 2008).

15 El envejecimiento es un proceso multifactorial que ha sido ajustado por la naturaleza a un amplio espectro de esperanzas de vidas, incluso en especies estrechamente relacionadas, lo que sugiere que el envejecimiento es un rasgo flexible susceptible a la influencia de una serie de rutas moleculares (Brown-Borg *et al.*, 1996. Nature 384, 33; Haigis & Guarente, 2006. Genes Dev. 20, 2913-2921; Kenyon, 2005. Cell 120, 449-460). Uno de tales procesos es el desgaste progresivo de los telómeros que ocurre asociados con el envejecimiento del organismo en los seres humanos (Harley *et al.*, 1990. Nature 345, 458-460) y en otros mamíferos, como los ratones (Flores *et al.*, 2008. Genes and Dev 22, 654-667). Los telómeros son estructuras especializadas en los extremos de los cromosomas, las cuales tienen un papel protector de los extremos de los cromosomas respecto a la reparación del DNA y las actividades de degradación (Blackburn, 2001. Cell 106, 661-673; de Lange, 2005. Genes Dev. 19, 2100-2110). Los telómeros en mamíferos consisten en repeticiones TTAGGG unidas a un complejo multi-proteína conocido como shelterina (de Lange, 2005. Genes Dev. 19, 2100-2110). Son necesarias unas repeticiones mínimas de TTAGGG y la integridad del complejo shelterina para la protección de los telómeros (Blackburn, 2001. Cell 106, 661-673; de Lange, 2005. Genes Dev. 19, 2100-2110). La telomerasa es una transcriptasa celular inversa (TERT, transcriptasa inversa de la telomerasa; también conocida como TP2; TRT; EST2; TCS1; hEST2) capaz de compensar la degradación de los telómeros a través de adiciones *de novo* de repeticiones TTAGGG en las terminaciones de los cromosomas usando un componente RNA asociado como molde (*Terc*, telomerase RNA component) (Greider and Blackburn, 1985. Cell 43, 405-413). La telomerasa se expresa en la mayoría de los compartimentos celulares en adultos, sin embargo, esto no es suficiente para mantener la longitud de los telómeros como lo demuestra el hecho de que el acortamiento de los telómeros se produce con la edad en la mayoría de los tejidos humanos y de ratón (Harley *et al.*, 1990. Nature 345, 458-460; Blasco, 2007. Nat Chem Biol. 3, 640-649; Flores *et al.*, 2008. Genes and Dev 22, 654-667).

35 La acumulación de telómeros cortos/dañados con el aumento de edad es considerada como una de las principales fuentes de daño al DNA asociadas al envejecimiento capaz de causar la pérdida de capacidad de regeneración de los tejidos y el envejecimiento sistémico del organismo (Flores, Cayuela *et al.* 2005; Schoeftner, Blanco *et al.* 2009). Esto está soportado tanto por el estudio del modelo de ratón deficiente en telomerasa como también por las enfermedades humanas que se caracterizan por mutaciones en componentes de la telomerasa, los cuales sufren de disfunción prematura en células madre adultas y de disminución de la longevidad debido a las tasas aceleradas de acortamiento de los telómeros incluso en la primera generación (Blasco, Lee *et al.* 1997; Lee, Blasco *et al.* 1998; Herrera, Samper *et al.* 1999; Mitchell, Wood *et al.* 1999; Vulliamy, Marrone *et al.* 2001; Yamaguchi, Calado *et al.* 2005; Garcia-Cao, Garcia-Cao *et al.* 2006; Armanios, Chen *et al.* 2007; Tsakiri, Cronkhite *et al.* 2007). Esta evidencia sugiere de una forma importante que la actividad de la telomerasa y la longitud de los telómeros son un factor limitante para la esperanza de vida en mamíferos, y que apoyan un modelo en el cual los telómeros cortos contribuyen activamente al envejecimiento limitando la renovación tisular. En este modelo, la telomerasa actúa como un gen de la longevidad en el contexto del organismo mediante la prevención de la degradación prematura de los telómeros asociados con la edad. La telomerasa, de hecho, confiere un potencial proliferativo indefinido a células en cultivo *in vitro* gracias a su capacidad para alargar los extremos de los cromosomas, lo que impide la erosión crítica de los telómeros asociada a la división celular y a la posterior activación de una respuesta de daño permanente del DNA (Counter, Avilion *et al.* 1992; BoADNr, Ouellette *et al.* 1998; Counter, Hahn *et al.* 1998).

55 Una predicción importante de este modelo es que la reducción de la tasa de acortamiento de los telómeros debería retrasar el envejecimiento. Así, la activación de la telomerasa se concibe como una estrategia potencial para rejuvenecer los tejidos, así como para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por el acortamiento de los telómeros de forma prematura.

Sin embargo, el acortamiento de los telómeros es una importante barrera para la proliferación incontrolada de células tumorales (Feldser and Greider, 2007. Cancer Cell 11, 461-469; Blasco, 2005. Nat Rev Genet 6, 611-622), y un aumento de la expresión de la telomerasa se asocia con un aumento en la susceptibilidad a desarrollar cáncer

tanto en ratones como en humanos. Una sobreexpresión de la transcriptasa reversa de la telomerasa, TERT, es una característica común en los cánceres humanos, lo que parece estar asociado a la habilidad de la telomerasa para conferir un potencial proliferativo ilimitado. No sorprende por lo tanto, que haya sido demostrado que una sobreexpresión de TERT aumenta la incidencia de cáncer en el contexto del modelo clásico de ratón transgénico para TERT, en el cual los ratones transgénicos normalmente se encuentran bajo los efectos constitutivos de la expresión de la telomerasa desde los primeros estadios de desarrollo. Sorprendentemente, la sobreexpresión de TERT en el contexto de ratones modificados resistentes al cáncer (*p.ej.* ratones Sp53/Sp16/SARF/TgTERT) es suficiente para hacer disminuir el daño de los telómeros con la edad, retrasar el envejecimiento y aumentar la media de longevidad en un 40% (Tomas-Loba, Flores *et al.* 2008).

5 Sin embargo, el riesgo de producir cáncer ha disuadido a los investigadores de los enfoques concebidos con terapia génica como una estrategia válida para retrasar el envejecimiento o para alargar la longevidad.

Con el fin de evitar el riesgo de tumores asociados a la sobreexpresión de la telomerasa, muchos estudios relacionados con el posible uso de la telomerasa en la mejora del marcador asociado con el envejecimiento se han centrado en la identificación y desarrollo de activadores farmacológicos de la actividad de la telomerasa. La activación de la telomerasa está concebida hoy en día como una estrategia potencial para rejuvenecer tejidos, así como para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por el acortamiento prematuro de los telómeros. Sin embargo, aún no se ha informado sobre fármacos activadores de la telomerasa, solamente sobre activadores nutricionales (Fauce, Jamieson *et al.* 2008). Su mecanismo de acción aún es poco conocido y no está claro si tienen una influencia en aumentar el riesgo de padecer cáncer o, incluso, si son capaces de mejorar la esperanza de gozar de buena salud y/o la esperanza de vida.

En este contexto, la utilidad de la telomerasa o los tratamientos relacionados con la telomerasa en la mejora de la esperanza de gozar de buena salud o en la esperanza de vida sigue siendo dudosa. Sin embargo, sería extremadamente valioso encontrar una forma de mejorar ciertos trastornos que aparecen con regularidad en la población adulta, tales como la osteoporosis, la intolerancia a la glucosa y la degeneración neuromuscular asociada a la pérdida de coordinación neuromuscular (los cuales son indicadores bien establecidos de la progresión del envejecimiento, se consideran marcadores de la esperanza de gozar de buena salud y parecen estar relacionados con el acortamiento de los telómeros) de una manera simple y efectiva, sin aumentar el riesgo de tumores espontáneos. Cualquier solución de ese tipo sería de particular interés si, además de mejorar estos trastornos, tuviera una influencia positiva en alargar la esperanza de vida de los individuos tratados.

30 La presente invención proporciona una solución a estos problemas.

Sumario de la invención

La invención se basa en el sorprendente hallazgo de que la terapia génica destinada a aumentar la expresión de la transcriptasa inversa de la telomerasa, cuando se administra a mamíferos adultos, aumenta significativamente la esperanza de vida tanto media como máxima. Además, este efecto se consigue sin aumentar significativamente la incidencia de cáncer (enfermedad neoplásica maligna), tal como se evaluó por el número de neoplasmas espontáneos evidentes entre la población tratada. El alargamiento de la esperanza de vida se acompaña de una clara mejora en algunos marcadores de la esperanza de gozar de buena salud que son convencionalmente considerados como marcadores de edad, tales como la osteoporosis, intolerancia a la glucosa con insensibilidad a la insulina, pérdida de memoria y degeneración neuromuscular asociada a la pérdida de coordinación neuromuscular.

Los ensayos y resultados expuestos en los Ejemplos de la presente solicitud demuestran la capacidad de una terapia génica basada en la telomerasa para mejorar el envejecimiento saludable y alargar la esperanza de vida y la esperanza de gozar de buena salud en un adulto o un organismo mamífero envejecido. Como tal, este trabajo constituye una prueba de principio para la viabilidad de la terapia génica anti-envejecimiento. Los efectos anti-envejecimiento proporcionados por la invención han sido observados por los inventores cuando la telomerasa se expresa a partir de un vector de terapia génica no integrativo y dirigido a tejidos post-mitóticos administrado a ratones adultos (1 año de edad) o ya mayores (2 años de edad), específicamente a partir de un vector de expresión basado en un virus adeno-asociado. Los efectos beneficiosos se prolongaron al menos durante 9 meses en el caso de los ratones tratados al año de edad. Los ratones tratados con telomerasa, tanto los de 1 año como los de 2 años de edad, tienen un aumento en la esperanza de vida media del 24% y del 13%, respectivamente. Las curvas de supervivencia se completaron en el caso de los ratones tratados a los 2 años de edad y también presentaron un aumento significativo (20%) en la esperanza de vida máxima.

En resumen, la expresión aumentada de TERT tiene efectos beneficiosos en tejidos tanto a través de la vía canónica (mediante la prevención de la pérdida crítica de los telómeros y la pérdida de viabilidad celular), como a través de la vía no canónica (vía de estimulación de Wnt/ β -catenina de las capacidades de auto-renovación de los tejidos adultos). Por lo tanto, la presente solicitud proporciona así la prueba de principio para la viabilidad de las intervenciones contra el envejecimiento en mamíferos adultos/viejos. Los organismos envejecidos acumulan daño en el DNA derivado de los telómeros y se demuestra en este documento que es posible reparar o retrasar la acumulación de este tipo de daño a través de la terapia génica de la telomerasa. Esto tiene consecuencias directas

en la salud de los organismos envejecidos incluyendo un aumento en la esperanza de vida media y máxima.

De acuerdo con ello, la invención proporciona un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) en la que el tratamiento no aumenta de manera significativa la incidencia de cáncer en el sujeto, el vector de ácido nucleico es un vector no integrativo y dirigido a tejidos post-mitóticos, el adulto es un humano y el trastorno relacionado con la edad es seleccionado del grupo de osteoporosis, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, pérdida de memoria y pérdida de la coordinación neuromuscular, o combinaciones de los mismos.

En la presente invención, se prefiere que la secuencia TERT empleada en el vector de terapia génica derive de la misma especie que el sujeto. Por ejemplo, la terapia génica en ratones se llevaría a cabo usando la secuencia de la TERT humana. La terapia génica en ratones se llevaría a cabo utilizando la secuencia de la TERT de ratón, como se describe en los ejemplos. En una variante, la TERT está codificada por la secuencia de ácido nucleico como la expuesta en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO: 3 (variantes de la TERT humana 1 y 2), o es un fragmento activo o un equivalente funcional de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. La secuencia polipeptídica codificada por SEQ ID NO: 1 se expone en la SEQ ID NO: 2. La secuencia polipeptídica codificada por SEQ ID NO: 3 se expone en la SEQ ID NO: 4.

Como se usa en este documento, "equivalente funcional" se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de TERT o un polipéptido que tiene actividad de TERT. El equivalente funcional puede mostrar 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100% o más actividad en comparación con la TERT codificada por la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3. Los equivalentes funcionales pueden ser artificiales u ocurrir en la naturaleza. Por ejemplo, las variantes naturales de la secuencia de TERT en una población caen dentro del alcance de equivalente funcional. Las secuencias de TERT derivadas de otras especies también caen dentro del alcance del término "equivalente funcional", en particular la secuencia de la TERT murina dada en la SEQ ID NO: 5. El equivalente funcional puede ser un ácido nucleico con una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. El equivalente funcional puede ser un polipéptido con una secuencia aminoacídica que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% de identidad con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. En el caso de equivalentes funcionales, la identidad de secuencia debe calcularse a lo largo de toda la longitud del ácido nucleico. Los equivalentes funcionales pueden contener una o más inserciones, deleciones y/o sustituciones de nucleótidos, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30 o más, en comparación con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3.

El término "equivalente funcional" también abarca secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido de TERT con al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO: 4, pero que muestran poca homología con la secuencia de ácido nucleico dada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 debido a la degeneración del código genético.

Tal como se utiliza aquí, el término "fragmento activo" se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de TERT o un polipéptido que tiene actividad de TERT, pero que es un fragmento del ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 3 o la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 o en la SEQ ID NO: 4. Un fragmento activo puede ser de cualquier tamaño siempre y cuando la actividad TERT se mantenga. Un fragmento tendrá como mínimo un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 100% de identidad con la SEQ ID NO: 1-4 a lo largo del alineamiento entre el fragmento corto y la SEQ ID NO: 1-4.

Pueden ser utilizadas las proteínas de fusión que incluyen estos fragmentos. Por ejemplo, se pueden incluir 5, 10, 20, 30, 40, 50 o incluso 100 residuos de aminoácidos de la secuencia del polipéptido, o de una secuencia homóloga, en cualquiera de los extremos C-terminal y/o N-terminal o en ambos sin perjudicar la habilidad del fragmento polipeptídico de plegarse correctamente y presentar actividad biológica.

La identidad de las secuencias puede calcularse mediante uno cualquiera de los diversos métodos descritos en la técnica, incluyendo por ejemplo BLAST (Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). "Basic local alignment search tool". J Mol Biol 215 (3): 403-410) y FASTA (Lipman, DJ; Pearson, WR (1985). "Rapid and sensitive protein similarity searches". Science 227 (4693): 1435-41; http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_list2.shtml) y variaciones de estos programas de alineamiento.

En un aspecto de la divulgación, el método de aplicar el tratamiento en el cual el vector comprende una secuencia codificante de la transcriptasa inversa de la telomerasa es para el uso como método de terapia génica. Los métodos y vectores de terapia génica son bien conocidos en la técnica y generalmente comprenden proporcionarle a un sujeto un ácido nucleico que codifica una proteína terapéuticamente activa. El ácido nucleico puede ser proporcionado de diversas maneras incluyendo proporcionar el DNA desnudo como plásmido o mini-círculos, el uso de liposomas o polímeros catiónicos u otras nano-partículas modificadas que contienen vectores de ácido nucleico, o vectores virales que encapsidan el ácido nucleico.

La terapia génica puede conseguirse usando la transformación estable de los organismos con un sistema de expresión inducible. Este aspecto de la divulgación no se extiende a sujetos humanos. La expresión de TERT se puede inducir en una fecha posterior después de la transformación, por ejemplo, una vez que el sujeto es un adulto

o un adulto envejecido, o empieza a mostrar signos de trastornos relacionados con la edad. Los sistemas de expresión inducibles adecuados son conocidos en la técnica e incluyen el sistema basado en la recombinasa CRE-LOX que es adecuado para el uso en ratones y el regulado por tetraciclina que puede ser usado en el tratamiento de sujetos humanos.

- 5 Como se discute anteriormente, es conocido que la sobreexpresión de TERT en animales transgénicos da lugar a un aumento en la incidencia de cáncer en los animales transgénicos. Sin querer estar limitados por la teoría, los inventores creen que esto se debe al menos en parte a la sobreexpresión de TERT en todas las etapas del desarrollo. La presente invención se limita a la expresión de TERT en un adulto que es un humano. Al limitar la presente invención al uso para el tratamiento de un humano adulto, y el uso de un vector dirigido a células post-mitóticas en los sujetos, la invención evita el problema de aumento de la incidencia de cáncer que se conoce en la técnica.

Los resultados divulgados en la presente solicitud demuestran que los vectores de terapia génica viral proporcionan una manera eficiente para proporcionar una expresión de TERT de manera sistemática a muchos tejidos. Por lo tanto, en un aspecto preferido de la presente divulgación, el vector de la terapia génica es un vector viral.

- 15 Los vectores de terapia génica viral son bien conocidos en la técnica. Los vectores para uso en la presente invención incluyen vectores no integrativos tales como los basados en retrovirus, adenovirus (AdV), virus adeno-asociados (AAV), lentivirus, poxvirus, alfavirus y virus herpes. Los inventores de la presente invención han demostrado el principio de la invención usando un vector AAV.

- 20 El uso de vectores virales no integrativos, tales como AAV, parece ser particularmente ventajoso. En un aspecto, es porque estos vectores no integrativos no causan ninguna modificación genética permanente. En segundo lugar, los vectores se dirigen a tejidos adultos, evitando tener a los sujetos bajo los efectos de la expresión constitutiva de la telomerasa desde las primeras etapas del desarrollo. Además, los vectores no integrativos incorporan eficazmente un mecanismo de seguridad que evita la sobreproliferación de las células que expresan TERT. Las células perderán el vector (y, como consecuencia, la expresión de la telomerasa) si comienza a proliferar rápidamente.

- 25 Los ejemplos particulares de vectores no integrativos adecuados incluyen aquellos basados en adenovirus (AdV) en particular adenovirus *gutless*, virus adeno-asociados (AAV), lentivirus deficientes en la integrasa, poxvirus, alfavirus y virus herpes. Preferiblemente, el vector no integrativo usado en la invención es un vector no integrativo basado en un virus adeno-asociado, similar a las partículas naturales de virus adeno-asociados. Un AAV se dirige preferiblemente a los tejidos post-mitóticos, que son considerados más resistentes al cáncer que los altamente proliferativos. Los ejemplos de vectores no integrativos basados en virus adeno-asociados incluyen vectores basados en cualquier serotipo de AAV, es decir, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 y pseudotipos de AAV. La especificidad tisular se determina mediante el serotipo de la cápsida. El pseudotipado de los vectores AAV y las modificaciones por ingeniería genética de la cápsida para alterar su tropismo probablemente serán importantes para su uso en terapia.

- 35 Los vectores derivados de los virus adeno-asociados (AAVs) se han convertido en uno de los vectores de elección para muchas aplicaciones de transferencia génica debido a sus muchas propiedades deseables, incluyendo la capacidad para transducir un amplio rango de tejidos con alta eficiencia, baja inmunogenicidad y un perfil de seguridad excelente (Merten, Geny-Fiamma *et al.* 2005; Buning, Perabo *et al.* 2008), una toxicidad ausente en muchos modelos preclínicos (Niemeyer, Herzog *et al.* Blood 2009; Mas, Montane *et al.* Diabetes 2006; Jiang, Lillicrap *et al.* Blood 2006; Ghosh, Yue *et al.* Molecular therapy 2007; Tafuro, Ayuso *et al.* cardiovascular research 2009). Los vectores AAV transducen células post-mitóticas y pueden mantener la expresión génica a largo plazo (hasta varios años) tanto en modelos de enfermedad de animales pequeños y grandes (Niemeyer, Herzog *et al.* Blood 2009; Mas, Montane *et al.* Diabetes 2006; Jiang, Lillicrap *et al.* blood 2006; Ghosh, Yue *et al.* Molecular therapy 2007; Tafuro, Ayuso *et al.* cardiovascular research 2009). La seguridad y la eficacia de la transferencia génica con AAVs ha sido ampliamente estudiada en humanos con resultados alentadores en hígado, músculo, SNC y retina (Manno *et al.* Nat medicine 2006, Stroes *et al.* ATVB 2008, Kaplitt, Feigin, Lancet 2009; Maguire, Simonelli *et al.* NEJM 2008; Bainbridge *et al.* NEJM 2008).

- 50 El serotipo mejor caracterizado para los estudios de transferencia génica es AAV2 tanto en humanos como en modelos experimentales. AAV2 presenta un tropismo natural hacia los músculos esqueléticos, neuronas, células musculares lisas y hepatocitos. AAV2 es por tanto una buena elección como vector dirigido a estos tejidos, en particular para usarlo de acuerdo con la invención en el tratamiento de un trastorno relacionado con la edad asociado a uno de estos tejidos. Por ejemplo, el tratamiento de la degeneración neuromuscular puede ser dirigido al músculo esquelético y/o neuronas de esta manera.

- 55 Los nuevos serotipos aislados, tales como AAV7, AAV8 y AAV9 se han adoptado con éxito en estudios preclínicos (Gao, Alvira *et al.* PNAS 2002), y es posible que entren en Fase I de ensayos preclínicos en un futuro próximo. Aunque las respuestas inmunológicas detectadas en sujetos humanos tratados con AAV2 o AAV1 contra la cápsida de los AAV han sido limitadas (Manno *et al.* Nat Med 2006; Mingozzi *et al.* Nat Med 2007; Brantly *et al.* PNAS 2009; Mingozzi *et al.* blood 2009), la expresión a largo plazo del gen terapéutico es posible en función del tejido diana y de la vía de administración (Brantly *et al.* PNAS 2009; Simonelli *et al.* mol therapy 2010). Además, el uso de serotipos no

humanos, como AAV8 y AAV9, podría ser útil para superar estas respuestas inmunológicas en sujetos, y los ensayos clínicos acaban de empezar (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00979238). En conjunto, estos datos alentadores sugieren que los vectores AAV son herramientas útiles para tratar enfermedades humanas con un perfil alto de seguridad y eficiencia.

5 La elección de virus adeno-asociados de amplio tropismo, tales como los derivados del virus adeno-asociado del serotipo 9 (AAV9) es particularmente ventajosa cuando se tratan trastornos relacionados con la edad en general. Los virus AAV9 han mostrado una transducción eficiente en una amplia gama de tejidos, con alto tropismo por hígado, corazón y músculo esquelético (Inagaki *et al* Molecular Therapy 2006) y así los efectos beneficiosos de la terapia génica se pueden lograr en más tejidos. Además, los vectores AAV9 tienen una capacidad única de cruzar la
10 barrera hematoencefálica y dirigirse al cerebro tras una inyección intravenosa en ratones adultos y gatos (Foust *et al* Nature biotechnology 2009; Duque *et al* Molecular therapy *et al* 2009).

Además, se ha observado que la transducción de tejido con vectores AAV9 no tiene ningún impacto negativo en la longevidad de los ratones, como lo indica una supervivencia normal de los ratones tratados con AAV9-eGFP. De hecho, los resultados descritos aquí en ratones muestran que las intervenciones de terapia génica con expresión de
15 TERT a 1 año o a los 2 años de edad tienen claros efectos beneficiosos en muchos aspectos diferentes de la salud del ratón, incluyendo una osteoporosis retardada, mejor firmeza de la barrera epitelial, mejor tolerancia a la glucosa, mejor funcionamiento de la memoria y mejor coordinación neuromuscular.

En particular, estos signos de envejecimiento retardado se acompañan de un aumento significativo de la longevidad de aproximadamente 24% y 13% en los grupos de 1 año y 2 años de edad, respectivamente. La longevidad máxima también se incrementa en 5 meses en el grupo de 2 años de edad tratados con AAV9-mTERT comparados con los
20 controles tratados con AAV9-eGFP, lo que representa un aumento del 20% en la longevidad máxima (182 semanas vs 155 semanas, respectivamente).

Es importante destacar que los ratones tratados con AAV9-mTERT no desarrollaron mayor incidencia de cáncer, lo que ilustra la seguridad de este tipo de estrategia. Es probable que esto esté relacionado con el hecho de que lo
25 vectores AAV son vectores no integrativos, y por lo tanto la sobreexpresión de mTERT se pierde en células altamente proliferativas. Además, AAV se dirige preferentemente a los tejidos post-mitóticos, los cuales son considerados como más resistentes al cáncer que los altamente proliferativos.

Así, los vectores derivados de AAV9 son los vectores preferidos para las realizaciones de la invención, ya que permiten una amplia expresión de TERT en ratones adultos y en otros mamíferos como humanos, haciendo posible
30 la aplicación de los efectos beneficiosos de la expresión de la telomerasa en la esperanza de gozar buena salud y la longevidad a una amplia variedad de tejidos y de especies.

Por consiguiente, un vector para ser usado de acuerdo con la invención puede implicar un sistema en que la cápsida (que es la parte del virus que determina el tropismo del virus) del vector basado en virus adeno-asociados está
35 hecha con proteínas de la cápsida del virus adeno-asociado del serotipo 9 (AAV9). En los vectores para el uso de acuerdo con realizaciones preferidas de la invención, la secuencia de polinucleótidos empaquetada en la cápsida está flanqueada por dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de un virus adeno-asociado, preferiblemente del serotipo 2 el cual ha sido ampliamente caracterizado en la técnica, y presenta una región codificante localizada entre las ITRs. Como se ha indicado anteriormente, el ácido nucleico codifica un polipéptido de TERT funcional. En una realización particularmente preferida, la secuencia reguladora unida operativamente a la secuencia codificante de
40 TERT es el promotor del citomegalovirus (CMV), aunque hay otras secuencias reguladoras adecuadas conocidas por los expertos en la técnica.

En el tratamiento de trastornos relacionados con la edad, es ventajoso dirigir el tratamiento a los tejidos afectados. La elección del serotipo de AAV por la proteína de la cápsida del vector de terapia génica puede estar así basada en
45 el sitio deseado para la terapia génica. Si el tejido diana es músculo esquelético, por ejemplo, en el tratamiento de la pérdida de la coordinación neuromuscular, pueden utilizarse los vectores virales AAV1 y AAV6. Ambos serotipos son más eficientes en la transfección de músculo que otros serotipos de AAV. AAV3 es útil para transfectar células hematopoyéticas. Una revisión exhaustiva de los vectores para terapia génica basados en AAV se puede encontrar en Shi *et al*, (2008) "AAV-based targeting gene therapy" Am. J. Immunol. 4:51-65. Otros vectores virales con las propiedades requeridas se pueden usar en la presente invención. Heilbronn & Weger (2010) Handb Exp Pharmacol.
50 197:143-70 proporciona una revisión de los vectores virales que son útiles en terapia génica.

La presente divulgación describe un vector que comprende una secuencia codificante para la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) adecuado para su uso en terapia génica. Los vectores de terapia génica incluyen cualquier
55 tipo de partícula que comprenda un fragmento de polinucleótido que codifique la proteína transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT), operativamente unida a un elemento regulador como un promotor, que permite la expresión de una proteína TERT funcional demostrando actividad de transcriptasa inversa de la telomerasa en las células diana. Preferiblemente, TERT esta codificada por una secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o es un fragmento activo o un equivalente funcional de TERT.

El término vector de terapia génica en general incluye en su alcance moléculas de DNA desnudo tales como

- plásmidos o mini-círculos, es decir, moléculas de DNA circular que no contienen secuencias de DNA bacteriano, siempre y cuando la secuencia codificante de TERT y su elemento regulador ligado estén insertados en el plásmido, así como sistemas más complicados tales como partículas con la estructura de los viriones (partículas víricas), que comprenden al menos una cápsida y al menos una secuencia polinucleotídica, con un tamaño que permita a la
- 5 la secuencia polinucleotídica ser empaquetada dentro de la cápsida de una manera similar a la del genoma nativo del virus de origen de la cápsida. La secuencia de polinucleótidos debe incluir una región donde la secuencia codificante TERT y sus elementos reguladores unidos estén insertados de manera que la proteína transcriptasa inversa de la telomerasa pueda ser expresada a partir de esa secuencia polinucleotídica una vez que la partícula viral haya infectado a la célula.
- 10 Un vector de terapia génica para su uso según la invención es un vector no integrativo tal y como se define en la reivindicación 1, tal como un vector no integrativo basado en un virus adeno-asociado. A efectos de la invención, la elección de vectores no integrativos parece ser particularmente ventajosa, ya que no causan ninguna modificación genética permanente. También, como se ha mencionado anteriormente, dichos vectores incorporan un mecanismo de seguridad para evitar la sobreproliferación de las células que expresan TERT, que perderán el vector si las
- 15 células empiezan a proliferar rápidamente.
- Se prefiere el uso de vectores basados en virus adeno-asociados derivados de virus adeno-asociados de serotipo 9 (AAV9) ya que los efectos beneficiosos se pueden lograr en más tejidos (véase más arriba). En una realización particularmente preferida, la secuencia reguladora unida operativamente a la secuencia codificante de TERT es el promotor de citomegalovirus (CMV).
- 20 La secuencia de ácido nucleico que codifica TERT esta operativamente unida a una secuencia reguladora que guía la expresión de la secuencia codificante. Tal como se utiliza aquí, el término “elemento regulador” significa una secuencia de ácido nucleico que sirve como promotor, es decir, regula la expresión de una secuencia de ácido nucleico unida operativamente al promotor. Tales “elemento reguladores” o “promotores” pueden controlar la expresión de secuencias de ácido nucleico ligadas ya sea de manera constitutiva o inducible.
- 25 La secuencia reguladora puede ser un promotor constitutivo. Un ejemplo de una secuencia reguladora que es un promotor constitutivo es el promotor de citomegalovirus (CMV).
- La terapia génica basada en TERT de la presente invención mejora significativamente los marcadores moleculares de envejecimiento. En los Ejemplos incluidos en este documento, como se espera de la función canónica de TERT como el componente catalítico de la telomerasa, los ratones tratados con vectores AAV9-mTERT mostraron una
- 30 elongación significativa de los telómeros en una variedad de tejidos, que fue concomitante con una disminución significativa en la abundancia de telómeros cortos. Merece la pena mencionar aquí que la presencia de telómeros cortos, más que la disminución de la longitud media de los telómeros, constituye la causa última de la inestabilidad cromosómica (Hemann, Strong *et al.* 2001; Samper, Flores *et al.* 2001). Por otro lado, se ha demostrado recientemente que TERT tiene papeles independientes de la telomerasa como activador de algunos genes de la vía
- 35 de Wnt a través de la interacción con BRG1 (Millar 2009; Park, Venteicher *et al.* 2009), que a su vez pueden mediar en algunos de los efectos ya conocidos de TERT mejorando la movilización de células madre (Flores, Cayuela *et al.* 2005; Reya and Clevers 2005; Sarin, Cheung *et al.* 2005). En particular, los resultados de los ensayos de los Ejemplos de la presente solicitud muestran que los tejidos con mayor expresión de TERT también mostraron un
- 40 aumento en la expresión de β -catenina activa, así como de su gen diana ciclina D1. No se observaron aumentos significativos en otros genes diana de Wnt previamente relacionados con TERT, tales como Axin2 y CD44, aunque su expresión varió de manera amplia dependiendo del tipo de tejido. Es de notar que el aumento de ciclina D1 también fue acompañado de niveles en general más bajos de la expresión de p16 en algunos tejidos de ratón, un signo más de retraso en el envejecimiento y de extensión de las capacidades de renovación y proliferativas asociadas con la expresión de TERT.
- 45 La presente divulgación es eficaz para alargar tanto la esperanza de vida como la esperanza de gozar de buena salud.
- Tal como se utiliza aquí, el término “esperanza de vida” abarca tanto la esperanza de vida máxima (es decir, la edad máxima que cualquier miembro de una especie en particular ha alcanzado) como el promedio de vida. El promedio de vida puede ser la esperanza de vida media o la esperanza de vida promedio.
- 50 La esperanza de vida puede extenderse hasta un 5%, 10%, 15%, 20% o más, con referencia a la esperanza de vida esperada para esa especie, incluyendo humanos. Un aumento en la esperanza de vida puede ser un aumento de la esperanza de vida máxima posible para cualquier especie en particular de sujetos. Un aumento en la esperanza de vida puede ser un aumento de la esperanza de vida media de un individuo de esa especie que alcanza la edad adulta. Por lo tanto, un aumento de la esperanza de vida puede ser incrementar un 5%, 10%, 15%, 20% o más la
- 55 esperanza de vida máxima y/o incrementar un 5%, 10%, 15%, 20% la esperanza de vida media.
- Para el ser humano, se cree que la esperanza de vida máxima es alrededor de 120 años y que la esperanza de vida media para un individuo adulto en una nación desarrollada es de unos 70-80 años dependiendo de un número de factores que incluyen el sexo del individuo, la nutrición y la localidad. En términos de años, se espera que la

esperanza de vida se pueda alargar 1, 2, 5, 10, 15, o incluso 20 o más años.

Un aumento en la esperanza tiene poca utilidad si no se vincula a una conservación de un estado saludable o con una mejora de diversos parámetros relacionados con la edad. La invención también aumenta la esperanza de gozar de buena salud.

5 Tal como se usa en el presente documento, la esperanza de gozar de buena salud es el periodo de tiempo durante el cual un individuo está sano en general y libre de enfermedades crónicas. En concreto, un individuo estará sustancialmente libre de trastornos relacionados con la edad durante su esperanza de gozar de buena salud. Alargando la esperanza de gozar de buena salud, la presente invención conduce a un aumento de la edad media de aparición de los trastornos relacionados con la edad en comparación con una población no tratada.

10 La presente divulgación extiende el periodo de tiempo durante el cual un individuo está sano en general y libre de enfermedades crónicas y/o mejora trastornos que aparecen a menudo en la población envejecida y la población adulta en envejecimiento, incluyendo una reducción de la firmeza de la barrera epitelial, osteoporosis, intolerancia a la glucosa y degeneración neuromuscular asociada con la pérdida de coordinación neuromuscular. Estos son indicadores bien establecidos de la progresión del envejecimiento, y se consideran como marcadores de la
15 esperanza de gozar de buena salud.

En consecuencia, la divulgación tiene efectos beneficiosos en al menos uno de los siguientes grupos: reducir la incidencia de cáncer, retrasar y/o mejorar la osteoporosis, mejorar la firmeza de la barrera epitelial, mejorar la tolerancia a la glucosa, mejorar la función de la memoria y mejorar la coordinación neuromuscular. La mejora de los trastornos relacionados con la edad proporcionada por la divulgación puede ser como resultado de la reducción de los síntomas en un sujeto afectado o la reducción de la incidencia de la enfermedad o trastorno en una población comparada con una población no tratada.
20

Una característica importante de la invención es que la terapia génica asociada a la invención se consigue sin aumentar significativamente la incidencia de cáncer, tal como se determinó por el número de tumores espontáneos que son evidentes entre la población tratada. En la invención, el vector que comprende una secuencia codificante de la transcriptasa inversa de la telomerasa es para su uso en el tratamiento de al menos uno de los trastornos mencionados *sin* el uso concomitante de un supresor de cáncer.
25

Esto es algo inesperado para un experto en la materia, que tiene los conocimientos de los resultados obtenidos anteriormente con ratones transgénicos que sobreexpresaban TERT. Estos ratones muestran un incremento significativo en tumores espontáneos, una de las principales razones de por qué la activación de la sobreexpresión de TERT no se ha perseguido en el estado de la técnica para el tratamiento del envejecimiento. La única excepción a la incidencia de tumores ha sido con la sobreexpresión de la telomerasa en ratones modificados genéticamente resistentes al cáncer (Tomas-Loba, Flores *et al.* 2008). De hecho, una estrategia basada en la terapia génica con TERT para alargar la longevidad no tiene precedentes en el contexto de estudios de envejecimiento. Aunque los enfoques en terapia génica, en general, se prevén como una manera efectiva de proporcionar genes a tejidos adultos para corregir defectos genéticos o enfermedades, la terapia génica nunca ha sido concebida, según nuestro conocimiento, como una estrategia válida para retrasar el envejecimiento o alargar la longevidad.
30

Aunque los inventores no desean estar limitados por ninguna teoría, la falta de aumento de la incidencia de cáncer en los animales de ensayo descritos en el presente documento, en comparación con los individuos de control de la misma camada y los ratones transgénicos para TERT convencionales, puede ser debida al hecho de que el vector de terapia génica no fue administrado a los individuos durante el desarrollo del embrión, sino que fue administrado comparativamente en una etapa posterior de la vida. La diferencia con el estado de la técnica anterior podría surgir del hecho de que, en los estudios anteriores con ratones transgénicos, la expresión incrementada de TERT se fuerza desde el estadio de desarrollo temprano del embrión a través de modificaciones en la línea germinal, que podrían favorecer la expansión de las células cancerosas y el desarrollo de cáncer en un momento posterior de la vida. En consonancia con esta hipótesis, los autores de la invención se dispusieron a establecer si el aumento de la expresión de TERT en un momento más tardío de la vida (en ratones adultos y viejos) tiene efectos rejuvenecedores sin aumentar el riesgo de cáncer. Este escenario sería análogo al del enfoque donde más esfuerzos se han concentrado últimamente, el de la utilización de activadores farmacológicos de la telomerasa para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la edad o el incremento de la esperanza de gozar de buena salud de los individuos. La terapia génica basada en la telomerasa, es una alternativa al uso de los activadores de la telomerasa. Este enfoque está siendo obstaculizado debido a las dificultades para encontrar activadores farmacológicos de la telomerasa.
40
45
50

En consecuencia, es una característica de la invención que sólo los adultos han de ser tratados con el vector de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El tratamiento constitutivo durante toda la vida del sujeto se excluye explícitamente de la invención. De acuerdo con esta teoría, la invención utiliza un vector viral, como se ha explicado en detalle anteriormente.
55

La expresión de TERT después de la terapia génica usando los vectores según la invención persiste durante un periodo de varios meses a varios años. En ratones, la expresión de TERT se detectaba pasados 5 meses. En

monos, la expresión genética tras la terapia génica con un vector basado en AAV se ha detectado hasta 6 años después del tratamiento y hasta 8 años en perros (Rivera *et al* Blood 2005, and Niemeyer *et al* blood 2009). Por lo tanto, la frecuente repetición del tratamiento con los vectores de acuerdo con la invención no es necesaria. El sujeto puede ser tratado una vez. El sujeto puede ser tratado inicialmente, y luego ser tratado de nuevo una vez que los niveles de expresión de TERT hayan disminuido alrededor de un 50% respecto a los obtenidos inmediatamente tras el tratamiento. El tratamiento puede repetirse con el mismo vector o con uno alternativo para mantener la reducción de los trastornos relacionados con la edad si es necesario, por ejemplo anualmente, o una vez cada 5 años o una vez por década. Cuando se administra una segunda o posterior dosis, puede ser necesario usar un vector de terapia génica distinto, por ejemplo cuando se usa un vector basado en AAV y las posteriores administraciones pueden ser de un vector con cápsida derivado de un serotipo diferente al usado en la primera administración. Es posible que el sujeto desarrolle anticuerpos que neutralicen el primer vector de terapia génica, haciéndolo ineficaz si se administrara por segunda o posterior vez (Amado *et al* (2010) Science Translational Medicine 2(21):21ra16).

Inesperadamente, la presente divulgación, cuando se utiliza en el tratamiento de trastornos relacionados con la edad, conduce a una reducción en la incidencia de cáncer. La reducción en la tasa de incidencia de cáncer se puede medir mediante la comparación de la tasa de cáncer de un cáncer determinado en una población tratada con la tasa del mismo tipo de cáncer en una población control no tratada.

El método de terapia génica asociado a la divulgación tiene el efecto de tratar y/o prevenir diversas condiciones relacionadas con la edad y enfermedades, tal como se evalúa mediante marcadores y trastornos del envejecimiento concretos. La divulgación se refiere a un vector de terapia génica, como se describe en una cualquiera de las realizaciones expuestas anteriormente, para su uso en el tratamiento o la prevención en un sujeto humano adulto de al menos un trastorno o un marcador de envejecimiento que es seleccionado del grupo de reducción de la firmeza de la barrera epitelial, osteoporosis, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, pérdida de memoria, pérdida de coordinación neuromuscular, o combinaciones de los mismos. La terapia génica mejora al menos un marcador de envejecimiento, seleccionado por ejemplo, del grupo de firmeza reducida de la barrera epitelial, osteoporosis, artrosis, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, enfermedad cardiovascular, función reducida del corazón y circulatoria, función reducida de los pulmones, pérdida de memoria, pérdida de coordinación neuromuscular o disminución de la longevidad o combinaciones de los mismos.

La osteoporosis da como resultado una disminución de la densidad ósea y un aumento en la frecuencia de fracturas. Por lo tanto, la invención puede ser utilizada para el tratamiento o la prevención de la osteoporosis reduciendo cualquiera de estas medidas. La aparición de la osteoporosis se puede retrasar. La edad de aparición de la osteoporosis se puede aumentar en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% o más, y puede ser de 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 años o más. Si la osteoporosis ocurre cuando debe ocurrir, la invención reduce la tasa de disminución de la densidad ósea y/o la frecuencia de fracturas.

La densidad ósea se puede medir como se describe en el presente documento usando un dispositivo de exploración DEXA, o puede medirse por cualquier otro medio adecuado conocido en la técnica. Por "reduce la tasa de disminución de la densidad ósea" se quiere decir que la tasa de pérdida de densidad ósea en un sujeto tratado es menor que la tasa de disminución en un sujeto equivalente no tratado, o menor que la media de disminución en una población equivalente del mismo rango de edad. La tasa de disminución en la densidad ósea en un sujeto tratado puede ser del 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% o 10% respecto a un sujeto no tratado. Por lo general, la densidad ósea en un humano adulto sano varía entre los 1200 mg/cm² y 950 mg/cm² en función del sexo y del origen étnico. Dependiendo del punto de partida, la densidad ósea disminuye proporcionalmente, por ejemplo a un intervalo entre 1100 y 850 mg/cm² en un sujeto que se puede considerar envejecido.

La artrosis, también conocida como osteoartritis, describe un grupo de anomalías mecánicas que implican la degradación de las articulaciones, incluyendo el cartilago articular y el hueso subcondral. Los síntomas pueden incluir dolor, rigidez, bloqueo y también derrame, en las articulaciones. La divulgación se puede utilizar en el tratamiento o la prevención de la artrosis reduciendo cualquiera de estas medidas. En una realización, la divulgación retrasa la aparición de la artrosis. En una realización, la edad de aparición de la artrosis se incrementa en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% o más, y puede ser de 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 años o más.

La artrosis puede ser determinada mediante rayos X, en particular, mediante la observación de los siguientes indicios: estrechamiento del espacio articular, esclerosis subcondral (aumento de la formación ósea alrededor de la articulación), formación de quistes subcondrales y osteofitos, o puede ser medida mediante otro medio adecuado conocido en la técnica.

La intolerancia a la glucosa también se conoce en la técnica como tolerancia a la glucosa alterada y es un estado pre-diabético de disglucemia que está asociado con resistencia a la insulina y con un aumento de riesgo de enfermedad cardiovascular. La tolerancia a la glucosa se puede medir como se describe en la presente solicitud con la prueba de tolerancia a la glucosa. En los seres humanos, la prueba de tolerancia a la glucosa como se describe en "Definition, diagnosis and classification of *diabetes mellitus* and its complications: World Health Organization and International Diabetes Federation" (1999). Por "mejora de intolerancia a la glucosa" o "aminorar la intolerancia a la glucosa" en el contexto de la invención se quiere decir que la incidencia de la intolerancia a la glucosa puede disminuir en una población tratada en comparación con un control de población no tratada del mismo rango de edad.

En una realización, la edad de aparición de la intolerancia a la glucosa aumenta en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% o más, y puede ser 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 años o más. En una realización particular, la ocurrencia de intolerancia a la glucosa en una población tratada es un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% la de una población no tratada. Alternativamente, "mejora de intolerancia a la glucosa" o "mejorar la intolerancia a la glucosa" se puede referir a la reducción de la intolerancia a la glucosa en un sujeto individual tratado comparado con un sujeto no tratado. En esta realización, el nivel de glucosa OGTT a las 2 horas de un individuo tratado de acuerdo con la presente invención debería ser $\leq 7,8$ mmol/l (140 mg/dl).

La resistencia a la insulina difiere de la intolerancia a la glucosa. La resistencia a la insulina se mide usando la "pinza hiperinsulinémica euglucémica", la cual mide la cantidad de glucosa necesaria para compensar un aumento del nivel de insulina sin causar hipoglucemia en la forma descrita en DeFronzo R, Tobin J, Andres R (1979). "Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance". *Am J Physiol* 237 (3): E214-23. La tasa de infusión de glucosa durante los últimos 30 minutos de la prueba determina la sensibilidad de la insulina. Si se requieren niveles altos (7,5 mg/min o más), el paciente es sensible a la insulina. Los niveles muy bajos (4,0 mg/min o inferior) indican que el cuerpo es resistente a la acción de la insulina. Los niveles entre 4,0 y 7,5 mg/min indican tolerancia a la glucosa alterada.

Por "mejora en la resistencia a la insulina" o "aminorar la resistencia a la insulina" en el contexto de la invención se quiere decir que la incidencia de la resistencia a la insulina puede disminuir en una población tratada en comparación con un control de la población no tratada del mismo rango de edad. En una realización, la edad de aparición de resistencia a la glucosa aumenta en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% o más, y puede ser en 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 años o más. En una realización particular, la ocurrencia de resistencia a la insulina en una población tratada es de un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la de una población no tratada. Alternativamente, "mejora en la resistencia a la insulina" o "aminorar la resistencia a la insulina" puede referirse a la reducción de resistencia a la insulina en un sujeto individual tratado comparado con un sujeto no tratado. En esta realización, la tasa de infusión de glucosa durante los últimos 30 minutos de la prueba de un individuo tratado de acuerdo con la presente invención debería ser $\geq 7,5$ mg/min.

La mejora de la función de la memoria y el aminoramiento de la pérdida de memoria pueden evaluarse utilizando una serie de ensayos conocidos en la técnica, incluyendo el The Mini Mental State Examination (MMSE) (Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR; "Mini-mental state". *Un método práctico para la clasificación del estado cognitivo de los sujetos para el clínico. J Psychiatr Res.* 1975 Nov;12(3):189-98), la prueba de alteraciones cognitivas de seis elementos (6CIT) (Brooke P, Bullock R; Validation of a 6 item cognitive impairment test with a view to primary care usage. *Int J Geriatr Psychiatry.* 1999 Nov;4(11):936-40) o la Prueba Mental Abreviada (AMT) (Hodkinson HM; Evaluation of a mental test score for assessment of mental impairment in the elderly. *Age Ageing.* 1972 Nov;1(4):233-8.). La mejora en la función de la memoria y/o el aminoramiento de la pérdida de memoria darán lugar a una mejora en la puntuación en cualquiera de las pruebas citadas anteriormente. En el contexto de la invención, la mejora en la función de la memoria y/o el aminoramiento de la pérdida de memoria se puede ver en una mejora de la puntuación media en una prueba de memoria en una población tratada en comparación con una población control sin tratar. En una realización particular, la puntuación promedio de la prueba de memoria en una población tratada es 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% mayor que la de una población no tratada. La mejora en la función de la memoria y/o el aminoramiento de la pérdida de memoria también pueden ser vistos como un aumento de la edad media a la que se produce la pérdida de memoria detectable en primer lugar. En una realización, la edad de inicio de la pérdida de memoria, según la evaluación de uno cualquiera de los ensayos anteriores, se incrementa en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% o más, y puede ser 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 años o más.

La mejora en la coordinación neuromuscular puede evaluarse por uno o varios métodos de ensayos descritos en Dhesi JK *et al.* (*Age Ageing.* 2004;33(6):589-95). En el contexto de la invención, la mejora de la coordinación neuromuscular se puede ver en una mejora de la puntuación promedio en una prueba de coordinación neuromuscular en una población tratada en comparación con una población control sin tratar. La mejora puede ser de un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% mayor que la de la puntuación equivalente en una población sin tratar de la misma edad.

La firmeza de la barrera epitelial disminuye con la edad. La disminución de la firmeza de la barrera epitelial conduce a un aumento en el riesgo de lesiones de la piel, infección y un aumento de la pérdida de agua y la consiguiente deshidratación. La firmeza de la barrera epitelial se puede analizar mediante la evaluación de criterios morfológicos del envejecimiento en tejidos epiteliales tales como la piel y el intestino delgado. El estrechamiento de la capa de tejido adiposo subcutáneo es una característica morfológica asociada al envejecimiento, que, a su vez, está asociado con un mayor riesgo de lesiones de la piel e infecciones. Otros métodos para medir la firmeza de la barrera epitelial se describen en Tomas-Loba *et al* (2008) *Cell* 135:609-622. La mejora puede resultar en 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% mayor que la de la puntuación equivalente en una población sin tratar de la misma edad. Por ejemplo, el espesor de la capa epidérmica de un individuo tratado será entre 40 y 60 μm , preferiblemente entre 50 y 60 μm .

Otros marcadores de envejecimiento incluyen la enfermedad cardiovascular, el corazón y la función circulatoria y la función pulmonar como se describe en Balin AK *et al* "Practical handbook of human biologic age determination" CRC-press Boca Raton (1994).

- 5 La función pulmonar se puede expresar como la capacidad vital forzada (VEF: volumen espiratorio forzado, en 1 segundo). Un humano adulto sano tiene una capacidad vital entre 3 y 5 litros. Después de los 20 años la capacidad vital disminuye aproximadamente 250cm^3 cada diez años. La presente invención se espera que dé lugar a una mejora de la función pulmonar en sujetos envejecidos y/o haga disminuir la pérdida de capacidad pulmonar. Preferiblemente, el VEF de un sujeto tratado es de 3 a 5 litros.
- 10 La función cardíaca y la circulatoria se pueden medir utilizando el VO_2 máx. y/o la presión arterial. Un adulto sano no entrenado suele tener una VO_2 máx. en un intervalo de 35 a 45 ml/kg/min. La VO_2 máx. disminuye con la edad. Un humano adulto sano suele tener una presión arterial sistólica en un intervalo de 90-120 mm Hg y una presión arterial diastólica en un intervalo de 60-80 mm Hg. La presión arterial generalmente aumenta con la edad. La presente invención se espera que dé lugar a una mejora de la función cardíaca y la circulatoria en sujetos envejecidos. Preferiblemente, la VO_2 máx. de un sujeto tratado es de al menos 30 ml/kg/min y preferiblemente está entre 35 a 45 ml/kg/min y la presión arterial sistólica de un adulto envejecido tratado es menor de 120 mm Hg y preferiblemente entre 90-120 mm Hg y una presión arterial diastólica de un adulto envejecido tratado es menor de 80 mm Hg y preferiblemente entre 60-80 mm Hg.
- 15 La presente invención se refiere a vectores de terapia génica para su uso en el tratamiento de trastornos relacionados con la edad en un sujeto tal como se define en las reivindicaciones. El sujeto es un humano adulto.
- 20 De acuerdo con la presente divulgación, un "adulto" debería ser un individuo plenamente desarrollado que ha alcanzado la capacidad reproductiva, es fértil, o que evidencia características sexuales secundarias. Como se usa en este documento, el término adulto, cuando se aplica a los seres humanos por ejemplo, describe que la edad adulta temprana comienza alrededor de los 20 años de edad y se extiende hasta los 39; la edad adulta intermedia (40 a 59) y la edad adulta tardía (60+). A modo de comparación, un ratón de un año se puede considerar que es aproximadamente equivalente en edad a un humano de 45 años. Un ratón de 2 años se puede considerar que es aproximadamente equivalente en edad a un humano de 80 años.
- 25 Un adulto tratado de acuerdo con la invención puede estar envejecido. El término "envejecido" se aplica a una persona que es mayor que el periodo de la vida durante el cual los individuos de su especie están generalmente sanos y libres de enfermedades crónicas. Woolf *et al* in "Biological Age Markers as Predictors for Health and Disease" (4th Amlasian Conference and Exhibition on Anti-Aging and Aesthetic Medicine) afirma que la vitalidad de los órganos alcanza un pico entre las edades de 15 y 25 para las mujeres humanas y de 10 y 28 para los hombres humanos. Para los fines de la presente invención, "envejecido" pretende describir individuos humanos de al menos 30 años de edad, pero más preferiblemente de 45 años, 50 años, al menos 60, al menos 65, al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95 años o más.
- 35 El punto en el cual se considera que un sujeto está envejecido puede estar también relacionado con la longitud media de los telómeros. Por ejemplo, se sabe que en los seres humanos se produce la disminución de la longitud de los telómeros con la edad (Slagboom *et al* (1994) Am. J. Hum. Genet. 55:876-882). La media de la longitud del telómero en la infancia y la niñez es de aproximadamente 8 kb o más. Este valor desciende a alrededor de 7kb a la edad de 40 y hasta a aproximadamente 6kb a la edad de ochenta años. Por lo tanto se puede considerar un sujeto humano mayor o envejecido cuando la media de la longitud del telómero ha disminuido a alrededor de 7 kb.
- 40 Otra medida del envejecimiento es la proporción de telómeros cortos en comparación con los telómeros largos. Esto se puede medir como se describe en los ejemplos. La longitud de los telómeros se puede medir también como se describe en Slagboom *et al* o Canela *et al*. (2007, PNAS 104:5300-5305). La proporción de los telómeros cortos puede ser la fracción de los telómeros que presentan una intensidad por debajo de 50% de la media de la intensidad o la fracción de los telómeros por debajo de una cierta longitud, por ejemplo, 8kb, 7kb, 6kb, 5kb etc. Un sujeto puede ser considerado envejecido cuando el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70% o más de los telómeros de una muestra son cortos, por ejemplo 7kb.
- 45 En la presente divulgación, el tratamiento de un sujeto generalmente será inmediatamente antes de la edad en la que el sujeto es considerado sano en general y libre de enfermedades crónicas, es decir, inmediatamente antes de considerarlo como sujeto envejecido. En un humano, el tratamiento, por lo tanto se podría iniciar a los 40, 45, 50, 60 años de edad o más.
- 50 Sin embargo, el tratamiento puede ser administrado también en otras ocasiones. Cuando un sujeto se considera que tiene un riesgo particular de desarrollar un trastorno específico de la edad, el tratamiento puede llevarse a cabo antes de la aparición del trastorno relacionado con la edad. Por ejemplo, si un sujeto humano es considerado como alto riesgo de desarrollo de una enfermedad del corazón con 40 años, el tratamiento se puede iniciar a los 30, 35, 36, 37, 38, o 39 años. Lo mismo sucede con otros trastornos relacionados con la edad, como la osteoporosis, intolerancia a la glucosa, pérdida de memoria, pérdida de la coordinación neuromuscular.
- 55 En la presente invención, se prefiere que la secuencia TERT usada en el vector de terapia génica derive de la misma especie que el sujeto. Por ejemplo, la terapia génica en humanos se llevaría a cabo usando la secuencia humana TERT. La terapia génica en ratones se llevaría a cabo usando la secuencia TERT de ratón, como se describe en los ejemplos.

La presente divulgación proporciona información para preparar una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de cualquiera de los vectores de terapia génica que son para el uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno relacionado con la edad de acuerdo con la invención descrita anteriormente.

5 Se entiende por "composición farmacéutica" la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, haciendo que la composición sea adecuada para su uso diagnóstico o terapéutico in vitro, in vivo o ex vivo.

Se entiende por "composición" una combinación de agente activo y otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo un agente o marca detectable) o activo.

Una "cantidad eficiente" es una cantidad suficiente para dar lugar a resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficiente puede ser administrada en una o más administraciones, aplicaciones o dosis.

10 Por lo general, incluyen componentes además de los componentes activos (tales como el vector de terapia génica), por ejemplo, suelen incluir uno o más vehículo(s) farmacéuticos y/o excipiente(s). Una discusión detallada de estos componentes está disponible en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.

15 Las composiciones generalmente se administrarán a un sujeto en forma acuosa. Sin embargo, antes de la administración, la composición puede haber estado en una forma no acuosa. Por ejemplo, aunque algunos vectores virales se fabrican en forma acuosa, luego se envasan y se distribuyen y se administran también en forma acuosa, otros vectores virales son liofilizados durante la fabricación y se reconstituyen en una forma acuosa en el momento de uso. Así, una composición adecuada para la invención se puede secar, tal como una formulación liofilizada.

20 La composición puede incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, se prefiere que la composición esté sustancialmente libre de material mercurial (es decir, menos de 5µg/ml) por ejemplo libre de tiomersal.

25 Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro de sodio (NaCl), el cual puede estar presente entre 1 y 20 mg/ml por ejemplo sobre 10±2mg/ml NaCl. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro potásico, dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato disódico dihidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.

Las composiciones generalmente tendrán una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferiblemente entre 240-360 mOsm/kg, y más preferiblemente dentro del intervalo 290-310 mOsm/kg.

30 Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Los tampones más usados son: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón de histidina (en concreto con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Los tapones generalmente se incluyen en un rango de 5-20mM.

La composición puede incluir material para un sola administración, o puede incluir material para múltiples administraciones (es decir, un kit "multidosis"). Se prefiere la inclusión de un conservante en la forma multidosis. Como alternativa (o además) la inclusión de un conservante en composiciones multidosis, las composiciones pueden estar contenidas en un recipiente que tiene un adaptador aséptico para la eliminación del material.

35 Las composiciones adecuadas para su uso en seres humanos de acuerdo con la invención se administran normalmente en un volumen de 0.5ml, aunque a los niños se les puede administrar la mitad de la dosis (es decir aproximadamente 0.25ml).

40 Así como los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, la presente divulgación también describe una secuencia de ácido nucleico que codifica una TERT para su uso en terapia. La divulgación también describe un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT), para su uso en un método de terapia. En particular, la terapia puede tratar o mejorar un trastorno relacionado con la edad.

45 Como describen los métodos de tratamientos divulgados, la secuencia de ácido nucleico de TERT puede ser la secuencia indicada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o un fragmento funcional o un fragmento equivalente de la misma. La proteína TERT puede tener una secuencia como la indicada en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, o un fragmento funcional o un fragmento equivalente de la misma.

50 En la presente divulgación, todos los términos técnicos y científicos tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia al que pertenece la invención. A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra "comprende" y las variaciones sobre la misma no pretenden excluir otras características técnicas, componentes o pasos. Para el experto en la materia, la implicación de otros objetos, ventajas y características de la invención se verá en parte a partir de la descripción y en parte a partir de la práctica de la invención.

Ahora se describirá la invención en detalle, con referencia a los ejemplos y dibujos adjuntos. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan con fines ilustrativos y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

- Fig. 1: Protocolo para la obtención de vectores recombinantes adenovirales que contienen la secuencia codificante de la telomerasa (Fig. 1A) o la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (Fig. 2B). Los vectores se obtuvieron mediante un protocolo de triple transfección, donde se transfectaron células HEK293 que expresan las proteínas E1 adenovirales con: un casete que contiene la secuencia codificante deseada (mTERT: transcriptasa inversa de la telomerasa de ratón, o eGFP: proteína fluorescente verde potenciada) operativamente unida a un promotor de citomegalovirus humano (CMV) y con la señal de poliadenilación de SV40 (pA+) unida al extremo 3' de los vectores GFP, mientras que 3' UTR de TERT se mantuvo como señal poliA, flanqueada en ambos extremos por las repeticiones terminales invertidas de los virus adeno-asociados de serotipo 2 (ITR2); b) un plásmido capaz de expresar la proteína rep de los virus adeno-asociados de serotipo 2 (Rep2) y las proteínas de la cápsida de los virus adeno-asociados de serotipo 9 (Cap9); c) un plásmido capaz de expresar las proteínas restantes adenovirales para el ensamblaje de partículas virales ("plásmido auxiliar"). Al completar el ciclo viral, las partículas virales se purificaron y se titularon.
- Fig. 2: Eficacia de transducción viral. A. Esquema que muestra el diseño del experimento de administración. B. Medidas directas de GFP en la espalda afeitada de la piel de los ratones (n=3) tratados con vectores AAV9-eGFP y AAV9-mTERT. C, D. Medidas directas de GFP en los órganos indicados de los ratones (n=3) tratados con vectores AAV9-eGFP y AAV9-mTERT. E. Inmunohistoquímica con un anticuerpo que reconoce la GFP de los tejidos ya sea de los ratones tratados con AAV9-eGFP o con AAV9-mTERT. La cuantificación de al menos dos ratones independientes se usó para el análisis.
- Fig. 3: Expresión de mTERT mediada por AAV9 en ratones adultos y envejecidos: A. Esquema de los tratamientos AAV9 al primer año y al segundo año de edad. B. Medidas directas del GFP en la espalda afeitada de la piel de los ratones tratados con AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. Expresión de GFP en ratones tratados con AAV9-mTERT se estableció en 1. Se usaron dos ratones por grupo. C. Factor de cambio en los niveles de mRNA de mTERT en los ratones tratados con AAV9-mTERT respecto a la expresión del mRNA de mTERT en los controles AAV9-eGFP emparejados por edad. Los niveles de mTERT mRNA están corregidos por los valores de actina. Al menos 5 ratones por grupo fueron utilizados para el análisis. D. Extractos celulares enteros de los tejidos indicados del grupo de 1 año de edad fueron transferidos por adsorción por la presencia de mTERT usando un anticuerpo comercial. Panel superior, transferencia Western representativa. Panel inferior, cuantificación de los niveles de proteína mTERT de al menos dos ratones independientes. Los valores están normalizados respecto a la actina. Se utilizó la prueba t de Student para evaluar la significación estadística entre los grupos de la misma edad.
- Fig. 4. Retraso en el envejecimiento en ratones tratados con AAV9-mTERT. A. La densidad mineral ósea del fémur (DMO fémur) en los tiempos indicados después del tratamiento con cualquiera de los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. B. El espesor de la capa de grasa subcutánea en el momento de la muerte en ratones tratados con AAV9-mTERT y AAV9-eGFP. C. Tolerancia a la glucosa medida como el área bajo la curva (AUC) en los tiempos indicados después del tratamiento con los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. D. Los niveles de insulina en los tiempos indicados después del tratamiento con cualquiera de los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. E. La puntuación del modelo homeostático se midió como se describe en (Matthews, Hosker *et al.* 1985; Bonora, Targher *et al.* 2000). Los ratones tratados con AAV9-mTERT muestran un mejor resultado en diferentes tiempos posteriores al tratamiento. F. Niveles IGF-1 en los tiempos indicados tras el tratamiento con los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. G. La coordinación y el equilibrio se cuantificaron como el tiempo pasado en la rueda Rota-Rod, con un protocolo de aceleración constante. Se realizaron tres ensayos por ratón. H. Imagen representativa que muestra el diseño de la prueba de reconocimiento de objetos. I. La prueba de reconocimiento de objetos se llevó a cabo en los tiempos indicados después del tratamiento con cualquiera de los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. Los resultados se corresponden con la relación de tiempo que pasan en el nuevo objeto con respecto al tiempo que pasan con ambos objetos. J. La prueba de reconocimiento de objetos se llevó a cabo en los tiempos indicados después del tratamiento con cualquiera de los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. K. La coordinación neuromuscular se cuantificó como el porcentaje de ratones que pasan con éxito la prueba de la cuerda floja en los tiempos indicados después del tratamiento con cualquiera de los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. Se utilizó la prueba t de Student para evaluar la significación estadística entre los grupos de la misma edad.
- Fig. 5: El contenido de grasa y el peso corporal. A. El contenido de grasa de los ratones tratados con cualquiera de los vectores AAV9-eGFP o AAV9-mTERT en los tiempos indicados después del tratamiento. B. El peso corporal de los ratones indicados se da como media \pm SEM.
- Fig. 6. Aumento de la media y la longevidad máxima de los ratones tratados con AAV9-mTERT. A. Curvas de supervivencia de los grupos de ratones indicados. Los ratones todavía vivos se representando como una línea vertical. La significación estadística se evaluó mediante la prueba Logrank (grupos de 1 y 2 años de edad) así como la prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxon (GBW) (grupo 2 años de edad). B. Supervivencia a las 130 semanas. La significancia estadística se calculó mediante la prueba de χ^2 . C. Promedio y percentil 90 de esperanza de vida de los ratones de dos años tratados con los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. La significancia estadística se calculó mediante la prueba de t de Student. D. Porcentaje de ratones con el tumor maligno indicado en el momento de su muerte.

Fig. 7. Contribución insignificante del tratamiento con AAV9-eGFP para la supervivencia del ratón. A. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier representación) de los ratones tratados con AAV9-eGFP-y de los ratones Sp53 (Tomas-Loba, Flores *et al.* 2008). La prueba de Logrank indica ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre las curvas. B. Porcentaje de ratones que muestran las lesiones degenerativas indicadas en su momento de la muerte. El 10% de los ratones tratados con AAV9-eGFP presentó un fenotipo de hígado graso, el cual no estaba presente en los ratones tratados con AAV9-mTERT. C. Imágenes representativas de hígado graso. Las flechas apuntan a las gotas de grasa características de la enfermedad de hígado graso. Las secciones de hígado fueron teñidas con H&E.

Fig. 8. El tratamiento con AAV9-mTERT da como resultado una mayor longitud de los telómeros y una disminución de la abundancia de telómeros cortos A, B. Longitud del telómero determinada por Q-FISH de los tejidos indicados de los grupos de 1 año de edad (A) y del grupo de 2 años de edad (B) 1 mes después del tratamiento con los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. Los datos se presentan como media \pm SEM. C. Porcentaje de telómeros cortos (fracción de los telómeros que presentan una intensidad por debajo del 50% de la intensidad media) 1 mes después del tratamiento con los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. Los datos se presentan como media \pm SEM. D. Promedio de la longitud de los telómeros, determinado por HT-QFISH en las células blancas de la sangre en los tiempos indicados después del tratamiento con cualquiera de los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. La fracción de los telómeros que presentan menos de 5 Kb (que corresponde a los telómeros cortos) se muestra en el panel derecho. Se utilizó la prueba t de Student para evaluar la significación entre los grupos.

Fig. 9: Aumento de la longitud de los telómeros y disminución de la abundancia de los telómeros cortos en ratones tratados con AAV9-mTERT. A. Media de la longitud del telómero se determina por HT-QFISH en las células blancas de la sangre extraídos del mismo ratón en diferentes momentos después del tratamiento con los vectores AAV9 indicados. Los resultados se presentan por cada ratón individual (#1-11). B. Se muestra porcentaje de telómeros más cortos de 15Kb para los mismos ratones. Se utilizó la prueba t de Student para evaluar la significación estadística entre los grupos.

Fig. 10: Tejidos de los ratones tratados con AAV9-mTERT muestran un aumento de la expresión de la forma activa de la β -catenina y un mayor porcentaje de células positivas para ciclina D1. A. Análisis de transferencias Western representativas (β -catenina, β -catenina activa, y actina) de extractos totales de los tejidos indicados de ratones de 2 años tratados con vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP, 1 mes después del tratamiento. B. Cuantificación de la catenina activa en transferencia Western. Los valores son corregidos por los niveles de actina. Los datos son de intensidad media \pm SEM. C. Cuantificación de las células positivas para Ciclina D1 con respecto a las células totales obtenidas (entre 2×10^5 y 1×10^7 células por ratón, dependiendo del tejido) en los tejidos indicados de ratones tratados con vectores ya sea AAV9-mTERT o AAV9-EGFP, 1 mes post tratamiento. Se utilizó la prueba t de Student para las evaluaciones estadísticas. D. Imágenes representativas de inmunohistoquímica de ciclina D1 de diferentes tejidos de los ratones tratados con los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP, 1 mes post-tratamiento.

Fig. 11. Aumento de expresión de Ciclina D1 en los tejidos de los ratones tratados con AAV9-mTERT. A. Imágenes representativas de tinciones de Ciclina D1 en el hipocampo de ratones de 2 años tratados con los vectores AAV9-eGFP y AAV9-mTERT. B. Cuantificación de células positivas para Ciclina D1 a partir de dos experimentos independientes. C. Imágenes representativas de tinciones de Ciclina D1 en la piel de ratones de 2 años de edad tratados con vectores AAV9-eGFP y AAV9-mTERT. D. La cuantificación de células positivas para Ciclina D1 respecto al número total de células analizadas (entre 1×10^5 y 3×10^6 células por ratón) en ratones de la misma edad tratados con AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. Se utilizó la prueba t de Student para las evaluaciones estadísticas. E. Proporción de células positivas Ki67 con respecto al número total de células analizadas (entre 2×10^4 y 8×10^4 células por ratón) en secciones de piel de ratones tratados AAV9-eGFP o AAV9-mTERT. Se utilizó la prueba t de Student para los cálculos estadísticos.

Fig. 12. Efecto del tratamiento con AAV9-mTERT en dianas de Wnt. A. Transferencia Western representativa (Axin2, Actina) de los tejidos indicados de ratones de 2 años tratados con los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. La cuantificación de la expresión de Axin2 se muestra en el panel inferior. Los valores fueron corregidos para la actina y se corresponden a la intensidad media \pm SEM. B. niveles de mRNA de los genes diana de Wnt Axin2 (panel izquierdo) y CD44 (panel derecho) en los ratones tratados con los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. Los valores fueron corregidos por la actina y se representan como la media de 2 valores de Ct relativos a muestras de ratones AAV9-EGFP de la misma edad (n = 5 para cada grupo). C. Transferencia Western representativa (p16, Actina) de los tejidos indicados de ratones de 2 años tratados con los vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. La cuantificación de la expresión de p16 se muestra en el panel inferior. Los valores fueron corregidos por la actina y corresponden a la intensidad media \pm SEM. D. Expresión de mRNA de p16 en los tejidos indicados de los ratones tratados, bien con vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. Los datos se normalizaron con la actina y se representan como la media de 2 valores de Ct relativos a muestras de ratones AAV9-EGFP de la misma edad (n = 5 para cada grupo). Se utilizó la prueba t de Student para evaluar la significación entre los grupos analizados.

Ejemplos

Los ejemplos que se exponen a continuación se llevaron a cabo usando los siguientes materiales y técnicas:

Ratones

Los ratones fueron producidos en un área libre de patógenos en el CNIO, de acuerdo con las recomendaciones de la Federación de Asociaciones de Laboratorios Europeos de Ciencia Animal. Los ratones se mantuvieron con el 100% original de su fondo genético C57BL6. Se inyectó en la vena de la cola a grupos separados de ratones con 2×10^{12} vg/animal de cualquiera de AAV9-GFP o AAV9-mTERT con 360 días (AAV9-GFP n=11, AAV9-mTERT n=20) o 720 días (AAV9-GFP n=14, AAV9-mTERT n=23) de edad.

Los ratones fueron inspeccionados diariamente por un técnico autorizado y eran sacrificados cuando presentaban signos de morbilidad o tumores en conformidad con la Directrices de Criterios de Valoración Humanos para el Uso de Animales en Investigación Biomédica (Harrison, Strong *et al.* 2009). La fecha de la eutanasia se usó como una estimación de la esperanza de vida del ratón. Todos los ratones fueron sometidos a necropsia y análisis histopatológico.

Análisis histológico e inmunohistoquímico

La histopatología se realizó como se ha descrito anteriormente (Gonzalez-Suarez, Samper *et al.* 2001). Brevemente, los tejidos de ratón y los órganos fueron fijados durante toda la noche con una solución de formalina al 10% tamponado a pH neutro a 4°C, se deshidrataron a través de alcoholes graduados y xileno, y se incluyeron en parafina. El análisis histológico se llevó a cabo en secciones de 4-5 µm de acuerdo con los procedimientos estándar. Las patologías relacionadas con cáncer se agruparon de acuerdo a cuatro grupos como se describe (Tomas-Loba, Flores *et al.* 2008).

El análisis histopatológico se llevó a cabo por nuestro veterinario y las patologías degenerativas se agruparon como se ha descrito anteriormente.

La inmunohistoquímica se realizó sobre los tejidos sin parafina y procesados con hematoxilina y eosina (H&E) o los anticuerpos indicados Anti-GFP (Invitrogen, A11122), Anti-CiclinaD1 (Thermo Scientific, RM-9104, Clon SP4), Anti-Phospho-Smad2 (SER465/467, Chemicon AB3849) y Anti Ki-67 (DakoCytomation, M7249, clon TEC-3).

Vectores recombinantes AAV

Los vectores virales recombinantes adeno-asociados (AAV) se generaron siguiendo el procedimiento mostrado en la Fig.1, común tanto para los vectores que contienen la secuencia que codifica la telomerasa (AAV-TERT) y vectores control que contienen la secuencia que codifica una proteína verde fluorescente (AAV-GFP). Ambos vectores AAV se han hecho siguiendo un protocolo de triple transfección de células HEK293, las cuales son células capaces de complementar las proteínas E1 de adenovirus, cuyas secuencias de codificación no están presentes en el plásmido de adenovirus auxiliar. El protocolo se realizó de acuerdo con métodos estándar (Matsushita 1998 p938). Se utilizaron los siguientes elementos: a) el casete de interés con la columna vertebral del genoma de los vectores recombinantes adenovirales, que comprende la secuencia de codificación del gen de interés unido operativamente a un promotor flanqueado por ITRs de serotipo 2, b) el plásmido que contiene los genes AAV, el cual se puede modificar de acuerdo con el serotipo deseado: todos los genes rep del plásmido son del serotipo 2 y solamente la cápsida es del serotipo que se pretenda utilizar, c) los genes adenovirales esenciales se proporcionan en el tercer plásmido, ya que siempre es lo mismo.

Los casetes de expresión usados fueron i) GFP (proteína fluorescente verde) bajo el control del promotor CMV y la señal poliA de SV40 (ii) TERT murino (secuencia codificante: SEQ ID NO:1) bajo el control del promotor CMV. En los vectores AAV-TERT, el poliA de SV40 no se usó ya que la 5'UTR de TERT se mantuvo como señal poliA. La razón de lo anterior es que TERT murino es >3kb y el tamaño máximo para una correcta encapsidación incluyendo ITR+promotor+gen+poliA es de 4,7kb. Por lo tanto, la secuencia mTERT no tiene un poliA externo. De lo contrario, el vector tendría un tamaño mayor.

Las células HEK293 se cultivaron en frascos rotativos (Corning, Nueva York, USA) en un medio DMEM 10% FBS a 80% de confluencia y co-transfectadas con un plásmido que lleva el casete de expresión flanqueado por los ITRs virales de AAV2, un plásmido auxiliar que lleva los genes *rep2* AAV y *cap9* (amablemente proporcionados por K.A. High, Children's Hospital de Filadelfia) y un plásmido que lleva las funciones del adenovirus auxiliar (amablemente proporcionados por K.A. High, Children's Hospital de Filadelfia). Los vectores AAV fueron purificados con un método optimizado basado en dos gradientes de cloruro de cesio, dializado frente a PBS, filtrados y almacenados a -80°C hasta su uso (Ayuso *et al*/Gene therapy 2010). Los títulos de las partículas virales se determinaron de manera cuantitativa a través de la PCR en tiempo real.

Medición de la eficacia de transducción de los virus

A un grupo control de ratones con fondo genético 100% C57BL6 (AAV9-GFP n=5, AAV9-mTERT n=5) se le inyectó a los 360 días de edad siguiendo la metodología descrita anteriormente. A las 4 semanas de la inyección los ratones eran sacrificados y se sometieron a análisis patológico o a evaluaciones de expresión de GFP o de mTERT. La expresión de GFP de la piel y de los órganos internos fue determinada usando una luz de excitación a 488 nm y un sistema colector de imágenes (IVIS Imageing System 200 Series, Xenogen Corporation, Alameda, CA). La expresión

de la telomerasa en los diferentes tejidos fue analizada mediante transferencia western y RT-PCR cuantitativa.

Densidad ósea

5 La densidad mineral ósea se midió en animales vivos anestesiados, o post-mortem cuando se hace referencia, usando un dispositivo de exploración Dual Energy X-ray Absorptiometry (DEXA). La densidad mineral ósea (BMD) indica la densidad de minerales en los huesos de los ratones.

Mediciones de la piel

10 Se realizaron medidas de la capa de grasa subcutánea como se describe en (Tomas-Loba, Flores *et al.* 2008). Brevemente, se consideraron de 10 a 20 mediciones aleatorias a lo largo de la piel de al menos 5 ratones por cada grupo inyectado (3 secciones de piel por ratón). Los cortes de las secciones de piel se obtuvieron con un corte perpendicular a la superficie de la piel a un espesor de 5 mm se tiñeron con eosina-hematoxilina (H&E), y se utilizó el software J para las mediciones de la longitud.

Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal

15 Las curvas de glucosa se llevaron a cabo como se describe en otro lugar (Moynihan, Grimm *et al.* 2005). Brevemente, los ratones se mantuvieron en ayunas durante 8 horas, y se inyectó por vía intraperitoneal una solución de dextrosa al 50% (2 g/kg de peso corporal). Los niveles de glucosa en sangre se midieron con un glucómetro (Glucocard Memory 2, Arkray, Japón) en los tiempos indicados después de la inyección. Se llevó a cabo el análisis de datos como se describe en (Tomas-Loba, Flores *et al.* 2008).

Los niveles de insulina en sangre se midieron con el kit "Ultra-Sensitive Mouse Insulin ELISA" (Crystal Chem Inc. #90080), siguiendo las indicaciones el fabricante.

20 Contenido graso

El contenido graso se midió con el mismo procedimiento descrito para los requisitos de densidad mineral ósea, utilizando la exploración DEXA.

Análisis de los telómeros con O-FISH en secciones de parafina

25 La determinación de Q-FISH en secciones de tejido en parafina de ratones de 1 año a 2 se hibridaron con la sonda PNA-telomérica, y la intensidad de fluorescencia de los telómeros se determinó como se describe (Gonzalez-Suarez, Samper *et al.* 2001). El análisis cuantitativo de imagen se realizó utilizando el software Definiense Developer Cell (versión XD 1.2; Definiens AG). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba t de Student de dos colas para evaluar la significación (software GraphPad Prism).

PCR en tiempo real

30 El RNA total de los tejidos se extrajo con Trizol (Life Technologies). Las muestras de RNA fueron tratadas con DNase I, y usadas como molde para una reacción de transcripción inversa usando primers aleatorios y la Superscript transcriptasa inversa (Life Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR en tiempo real se realizó utilizando ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems), utilizando la mezcla DNA Master SYBR Green I (Applied Biosystems).

35 Los primers usados fueron:

- Actin-For*: GGCACCACACCTTCTACAATG (SEQ ID NO:7);
- Actin-Rev*: GTGGTGGTGAAGCTGTAG (SEQ ID NO:8);
- TERT-For*: GGATTGCCACTGGCTCCG (SEQ ID NO:9);
- TERT-Rev*: TGCCTGACCTCCTTGTGAC (SEQ ID NO:10).
- 40 *p16-For*: CGTACCCCGATTCAGGTGAT (SEQ ID NO: 11)
- p16-Rev*: TTGAGCAGAAGAGCTGCTACGT (SEQ ID NO:12)
- Axina2-For*: GGCAAAGTGGAGAGGATCGAC (SEQ ID NO:13)
- Axina2-Rev*: TCGTGGCTGTTGCGTAGG (SEQ ID NO:14)
- 45 *Ciclina D1 - For*: TGCGCCCTCCGTATCTTAC (SEQ ID NO:15)
- Ciclina D1 - Rev*: ATCTTAGAGGCCACGAACATGC (SEQ ID NO:16)
- CD44 - For*: CAGCTACTGGAGATCAGGATGA (SEQ ID NO: 17)
- CD44 - Rev*: GGAGTCCTTGGATGAGTCTCGA (SEQ ID NO:18)
- Klf4 - For*: GCGAACTCACACAGGCGAGAAACC (SEQ ID NO: 19)
- Klf4 - Rev*: TCGTTCCTCTTCTCCGACACA (SEQ ID NO:20)
- 50 *Tieg1 - For*: CCCATTGCCCTGCTCCTG (SEQ ID NO:21)
- Tieg 1 - Rev*: TGTGTCCGCCGGTGTCTGG (SEQ ID NO:22)

Los análisis estadísticos (prueba de t de Student) se realizaron con los valores de Ct descritos anteriormente (Muñoz, Blanco *et al.* 2005).

Transferencias Western

Las transferencias Western se realizaron en extractos celulares completos de los tejidos indicados. Los tejidos de los animales moribundos se recogieron e inmediatamente se congelaron post-mortem. Los anticuerpos utilizados fueron: Anti-h/mTERT (Calbiochem, 582005), Anti-β-Catenina (BD Laboratories, 610154), Anti-β-Catenina-activa (Millipore, 05-665), Anti-Axina2 (Abcam, 32197), Anti-TGFα (Abcam, 66043), Anti-Smad3 (Abcam, 28379), Anti-p16 (Santa Cruz, 1207), Anti-β-Actina (Sigma, A5441) and Anti-Tubulina (Abcam, 6161). La cuantificación se realizó con el software Scion Image.

Coordinación neuromuscular y ensayos de reconocimiento de objetos

La prueba de memoria de reconocimiento de objetos se llevó a cabo como se ha explicado antes (Bevins y Besheer 2006) y se explica brevemente en la **Fig. 2 h**. Para evaluar la coordinación motora y el equilibrio, los ratones se pusieron a prueba en un aparato Rota-Rod (modelo LE 8200); las medidas de puntuación de la latencia de la caída, con un protocolo de aceleración continua, de 4 a 40 rpm, durante un máximo de 60s en tres ensayos (Castelhanos-Carlos, Sousa *et al.* 2009). La prueba de la cuerda floja se realizó como se describe en otro lugar (Ingram y Reynolds 1986; Matheu, Maraver *et al.* 2007; Tomas-Loba, Flores *et al.* 2008).

Ejemplo 1: Expresión mediada por AAV9 de mTERT conduce a una transducción sistémica estable y eficiente en los tejidos de ratón

Como se ha explicado, los presentes inventores generaron un virus adeno-asociado (AAV) que lleva el cDNA de la TERT de ratón (mTERT) (SEQ ID NO: 1) bajo el control del promotor de CMV y que contiene las proteínas de la cápsida del AAV del serotipo 9, conocido por conferir tropismo para una amplia variedad de tejidos de ratón (AAV9-mTERT). Como control negativo y reportero de expresión AAV9, se generó una construcción análoga (AAV9-eGFP) que contiene la proteína fluorescente verde (eGFP) en lugar de mTERT.

En primer lugar, para evaluar el tropismo viral en el entorno experimental, un pequeño grupo de ratones de 1 año fueron sacrificados 1 mes después de la inyección, ya sea con vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP (Fig. 2, panel A). Los ratones inyectados con AAV9-eGFP mostraron un aumento de la señal de eGFP en la piel afeitada en comparación con los ratones inyectados AAV9-mTERT como se comprobó con la detección directa por fluorescencia eGFP (Fig. 2, panel B). Tras el sacrificio, fueron analizados los órganos internos por fluorescencia directa eGFP (Fig. 2, paneles C y D) o por inmunohistoquímica (IHC) con anticuerpos anti-eGFP (Fig. 2, panel E), mostrando un incremento significativo en la expresión de eGFP en ratones AAV9 EGFP en comparación con los cohortes AAV9-mTERT, que variaba en función del tejido diana. De acuerdo con el tropismo conocido de AAV9, hígado, riñón, músculo, corazón y pulmón fueron los tejidos diana preferenciales y, en menor medida, se encontró expresión significativa de eGFP en el cerebro y en la piel (Inagaki, Fuess *et al.* 2006; Zincarelli, Soltys *et al.*, 2008).

Para los estudios de longevidad y de envejecimiento, se inyectaron los vectores AAV9-mTERT o AAV9-EGFP a través de la vena de la cola (2×10^{12} vg / ratón) en dos grandes cohortes de 68 y 110 semanas de edad (en adelante denominados como grupos de 1 y 2 años de edad; ver Fig. 3, panel a), confirmándose una infección viral eficiente mediante la evaluación directa de la fluorescencia eGFP en animales vivos a las 2 semanas después de la infección (Fig. 3, panel B). Un mes después de la infección, los niveles de mRNA de TERT y de la proteína se incrementaron significativamente en varios tejidos de ratones inyectados con AAV9-mTERT en comparación con los controles AAV9-eGFP (Fig. 3, paneles C, D), incluyendo el hígado, riñón, pulmón, corazón, cerebro y el músculo. Aunque el factor de incremento aparente de los niveles de TERT mRNA era muy grande, los niveles de proteína mTERT se incrementaron de 5 a 20 veces, dependiendo del tejido diana (Fig. 3, panel E). Este nivel de sobreexpresión de proteína mTERT logrado mediante el uso de vectores de terapia génica está en el mismo rango de la sobreexpresión de mTERT alcanzado por los ratones transgénicos clásicos, incluyendo el modelo de ratón de larga vida Sp53/Sp16/SARF/TgTERT (González-Suarez, Samper *et al.* 2001; González-Suárez, Flores *et al.* 2002; Flores, Evan *et al.* 2006; Tomas-Loba, Flores *et al.* 2008).

En conjunto, estos resultados demuestran que AAV9 se puede utilizar como un transductor de genes fuerte y fiable in vivo, lo que permite un aumento significativo de la expresión de la proteína mTERT en una amplia gama de tejidos de ratón en el momento deseado del ciclo de vida de los ratones.

Ejemplo 2: la expresión ectópica de mTERT de manera tardía en la vida disminuye la incidencia de la osteoporosis relacionada con la edad y la intolerancia a la glucosa

La pérdida de hueso es un signo bien caracterizado del proceso de envejecimiento tanto en ratones como en seres humanos (Parfitt 1984; Ferguson, Ayers *et al.*, 2003), que resulta de la resorción ósea debido a la insuficiencia de osteoblastos. Como se muestra Fig. 4, panel A, a los 3-6 meses después del tratamiento con AAV9, la densidad mineral del fémur (DMO del fémur) fue significativamente mayor en los ratones AAV9-mTERT de ambos grupos de edad en comparación con controles AAV9-eGFP tratados de la misma edad, lo que sugiere un efecto beneficioso del aumento de la expresión de TERT en la prevención de la osteoporosis asociada con el envejecimiento en ratón. Como se esperaba, se observó una disminución significativa en la DMO del fémur en el grupo de control de 2 años de edad, en comparación con los ratones control de 1 año (Fig. 4, panel A).

Un biomarcador bien establecido de envejecimiento es la pérdida de la capa de tejido adiposo subcutáneo, que a su vez puede dar lugar a patologías asociadas con el envejecimiento como el deterioro de la cicatrización de heridas e infecciones (Steen 1988; Shimokata, Tobin *et al* 1989; De Boer, Andressoo *et al* 2002; Tomas-Loba, Flores *et al* 2008). De acuerdo con ello, se observó una disminución significativa en el espesor de la capa de grasa subcutánea en el grupo de control de 2 años de edad, en comparación con los controles de 1 año de edad (Fig. 4, panel B). Sorprendentemente, esta disminución no se produjo en los ratones tratados con AAV9-mTERT, en cambio, se observó una mejor preservación de la capa de grasa subcutánea en los ratones tratados con AAV9-mTERT del grupo de 2 años de edad en comparación con los controles de la misma edad tratados con AAV9-eGFP (Fig. 4, panel B).

La intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina también son indicadores bien establecidos de la progresión del envejecimiento (Bailey y Flatt 1982; Guarente 2006). Los ratones tratados con AAV9-mTERT del grupo de 1 año de edad mostraron una captación de glucosa más rápida a los 3 y 9 meses post-tratamiento en comparación con los controles tratados de la misma edad con AAV9-eGFP (Fig. 4, panel C). Además, los niveles significativamente más bajos de insulina en los ratones tratados con AAV9-mTERT de ambos grupos de edad sugieren una mejora de la sensibilidad a la insulina en comparación con los controles AAV9-eGFP, que presentan aumento de los niveles de insulina con el envejecimiento (Fig. 4, panel D) tratada. Cuanto mejor sea la captación de glucosa y la mejora de sensibilidad a la insulina de los ratones tratados con AAV9-mTERT se refleja en una mejora general de la puntuación en la evaluación del modelo homeostático (HOMA) 9 meses después del tratamiento en comparación con los ratones control tratados con AAV9-eGFP (Fig. 4, panel E) (Matthews, Hosker *et al* 1985; Heikkinen, Argmann *et al* 2007). De manera importante, la mejora la tolerancia a la glucosa y los niveles bajos de insulina en los ratones tratados con AAV9-mTERT fueron acompañados por altos niveles de IGF-1 en el grupo de ratones de 2 años AAV9-mTERT en comparación con los controles de la misma edad, que mostraron una mayor disminución en los niveles de IGF-1 en comparación con los controles de edad de 1 año (Fig. 4, panel F). Se sabe que una disminución de la expresión de IGF-1 ocurre con el aumento de la edad (Hammerman 1987), el mantenimiento de altos niveles de IGF-1 en el grupo de ratones tratados de 2 años de edad con AAV9-mTERT da una mejora de la salud de estos ratones como el resultado de la intervención de TERT. Es de destacar, que la mejora de tolerancia a la glucosa y los niveles bajos de insulina no se acompañaron de diferencias significativas en el contenido de grasa corporal como se detecta por los análisis de densitometría o en el peso corporal de las diferentes cohortes de ratón (Fig. 5).

Ejemplo 3: la expresión ectópica de mTERT de manera tardía en la vida mejora las puntuaciones en las pruebas neuromusculares y de reconocimiento de objetos

A continuación, para evaluar mejor los efectos sistémicos de la expresión de mTERT ectópico, se hicieron una serie de ensayos de comportamiento que ponen a prueba la capacidad de los ratones para realizar diferentes tareas, que se pierde progresivamente con el avance del envejecimiento. En particular, hemos evaluado (i) la coordinación y el equilibrio (prueba de Rota-Rod), (ii) la memoria (Prueba de Reconocimiento de un Objeto), así como (iii) la coordinación neuromuscular (la cuerda floja) (Ingram y Reynolds 1986; Bevins y Besheer 2006). La coordinación y el equilibrio mejoraron significativamente en el grupo de 2 años de edad, pasados 2 meses tras del tratamiento con AAV9-mTERT en comparación con los controles de la misma edad (Fig. 4, el panel G). Ambos grupos tratados, el 1 año de edad y el de 2 años con AAV9-mTERT, presentaron mejores resultados en el ensayo de reconocimiento de objetos en comparación con los controles, lo cual casi es significativo en el grupo de 1 año de edad (Fig. 4, el panel H-J). Es de destacar, la mejora de la memoria en el grupo de 1 año de edad tratado con AAV9-mTERT que se mantuvo al menos 9 meses después del tratamiento (Fig. 4, panel J). Por último, se observó una mejora muy clara en la prueba de la coordinación neuromuscular en los ratones de 1 año tratados con AAV9-mTERT que se mantuvo hasta 11 meses post-tratamiento en comparación con los ratones tratados AAV9-eGFP, que mostraron una disminución de la capacidad de realizar esta prueba con la edad (Fig. 4, el panel K). En conjunto, estos resultados demuestran que la expresión de mTERT mejora el buen estado de los órganos en general y la buena salud en ambos grupos de edad.

Ejemplo 4: Una terapia génica basada en TERT de manera tardía en la vida mejora significativamente la esperanza de vida sin incrementar el cáncer

Además de la actividad anti-envejecimiento descrita anteriormente de TERT y su capacidad para mejorar la esperanza de vida en ratones, se ha demostrado recientemente que TERT también aumenta la longevidad media de los ratones que son resistentes al cáncer debido a un aumento de la expresión de p53, p16 y supresores de tumores p19ARF (Sp53/Sp16/SARF/TgTERT) (Tomás-Loba, Flores *et al.*, 2008). Aquí, nos propusimos abordar si nuestro enfoque de terapia génica de TERT sería capaz no sólo de mejorar el estado de salud, sino también para extender la longevidad significativamente en los ratones tratados a una edad intermedia (1 año de edad) o en la vejez (2 años) sin aumentar la incidencia de cáncer.

Aunque todos los ratones utilizados en el estudio tienen un fondo genético de >95% C57B16, las comparaciones de la longevidad se hacen entre ratones tratados con AAV9-mTERT y AAV9-eGFP dentro de la misma cohorte de grupos de edad para evitar posibles diferencias entre los grupos. El análisis de las curvas de supervivencia indica una extensión significativa de la esperanza de vida en los ratones tratados con AAV9-mTERT en comparación con los controles en ambos grupos de edad (Fig. 6, panel A), lo que indica la magnitud de la expresión de TERT en la ampliación de la esperanza de gozar de buena salud de los diferentes grupos de edad. En particular, la expresión de

TERT condujo a un aumento en la supervivencia del 24% en el grupo de 1 año de edad y del 13% en el grupo de 2 años de edad ($p < 0,05$, tanto para los grupos de 1 y 2 años de edad) (Fig. 6, panel A).

Para examinar los efectos de TERT en la longevidad media y máxima, se determinó el porcentaje de animales que llegaron a la vejez en los dos grupos analizados. En particular, se encontró un aumento significativo en el porcentaje de ratones que sobrevivieron hasta las 130 semanas (Fig. 6, panel B), así como en la supervivencia media de los ratones de vida más larga (percentil 90%) (Fig. 6, panel C) en el grupo AAV9-mTERT en comparación con los controles, lo que indica que TERT influye en la media de supervivencia y también puede modular la longevidad máxima. De hecho, el ratón tratado AAV9-mTERT que más vivió superó por 27 semanas la longevidad máxima de los ratones control más mayores AAV9-eGFP, 182 semanas en comparación con 155 semanas, respectivamente (Fig. 6, panel A), lo que representa un 20% de aumento en la longevidad máxima.

Para probar si el tratamiento AAV9-eGFP podría tener un efecto negativo en la supervivencia, se compararon las curvas de supervivencia de control de los ratones tratados con AAV9-eGFP de ambos grupos de edad con los obtenidos para los controles de Sp53 en Tomas-Loba *et al* (Tomás-Loba, Flores *et al.*, 2008), utilizado por nosotros anteriormente como referencia para la longevidad normal (Fig. 7, panel a) (García-Cao, Cao-García *et al* 2002; Matheu, Maraver *et al* 2007). Sorprendentemente, las curvas de supervivencia de los ratones tratados con AAV9-eGFP mostraron que coinciden perfectamente con las de los ratones Sp53, lo que indica una longevidad normal de los ratones tratados con AAV9-eGFP de ambos grupos de edad.

Un inconveniente de la sobreexpresión de TERT en estudios con ratones transgénicos clásicos ha sido el aumento en la incidencia de cáncer, excepto para el caso de los ratones Sp53/Sp16/SARF/TgTERT resistentes al cáncer (González-Suarez, Samper *et al* 2001; Artandi, Alson *et al* 2002; Canela, Martín-Caballero *et al* 2004; Tomas-Loba, Flores *et al* 2008). Para determinar si nuestra estrategia de terapia génica para aumentar la expresión de TERT de manera tardía en la vida tenía efectos secundarios indeseables, se realizó un análisis patológico de todos los ratones en el estudio en su momento de la muerte. Los ratones tratados con AAV9-mTERT de ambos grupos de edad no mostraron un aumento significativo en la incidencia de cáncer en comparación con los controles AAV9-eGFP (Fig. 6, panel D; se observa un 4% en la incidencia de adenocarcinoma la cual corresponde a un solo adenocarcinoma en los pulmones de un solo ratón AAV9-mTERT). La falta de aumento de cáncer en ratones tratados con AAV9-mTERT en comparación con los transgénicos convencionales TERT (González-Suarez, Samper *et al* 2001; Artandi, Alson *et al* 2002; Canela, Martín-Caballero *et al* 2004) podría ser debido al hecho de que los transgénicos TERT tienen la expresión constitutiva de la telomerasa, desde el desarrollo embrionario temprano, mientras que la infección AAV9 está dirigida a los tejidos adultos de manera tardía en la vida, algo que puede disminuir significativamente el riesgo de desarrollar cáncer. Además, frente a los ratones transgénicos, los vectores de AAV no son integrativos y por lo tanto no aportan una modificación genética permanente. Por lo tanto, si ciertas células empiezan a proliferar rápidamente, perderán el vector de AAV y la expresión de TERT. Esto representa un mecanismo de seguridad para evitar el exceso de proliferación de células que expresan TERT. Por último, el hecho de que AAV alcance mejor los tejidos post-mitóticos también podría evitar la formación de un tumor ya que estos tejidos se consideran en general más resistentes a desarrollar tumores que los tejidos altamente proliferativos.

Sorprendentemente, los análisis histopatológicos revelaron una tendencia de los ratones AAV9-mTERT para tener menos patologías relacionadas con la inflamación, así como patologías relacionadas con el metabolismo (hígado graso) en comparación con el grupo tratado AAV9-eGFP (Fig. 7, los paneles B y C), lo que sugiere, además, que TERT mejora significativamente la esperanza de vida de los ratones.

Ejemplo 5: Expresión tardía de la telomerasa en la vida conduce a un alargamiento global de los telómeros y a la disminución en la abundancia de telómeros cortos en una amplia variedad de tejidos de ratón

El desgaste de los telómeros es un indicador ya conocido y una posible causa del envejecimiento (Harley, Fitcher *et al.* 1990; Canela, Vera *et al.* 2007; Jiang, Schiffer *et al.* 2008; Calado and Young 2009). La actividad de la telomerasa disminuye con la edad del ratón y esto explica el acortamiento de los telómeros de manera prominente observado en ratones de edades más avanzadas (Flores, Canela *et al.* 2008). A su vez, la expresión aumentada de TERT puede alargar la esperanza de vida y esto se cree que ocurre a través de la función canónica de la telomerasa en la extensión de los telómeros cortos, aunque trabajos recientes sugieren un papel no canónico de la telomerasa en la ruta de señalización de Wnt, lo que podría tener un alto impacto en el envejecimiento (Park, Venteicher *et al.* 2009).

En primer lugar, nos propusimos abordar si los órganos inducidos por TERT y con mejoras sistémicas descritos aquí están relacionados con un mejor mantenimiento de los telómeros. En concreto, se midió la longitud del telómero en una variedad de tejidos diferenciados (cerebro - córtex cerebral, corazón - ventrículos, pulmón, riñón - córtex, hígado - hepatocitos y músculo - fibras), pasado 1 mes del tratamiento ya fuese con vectores AAV9-mTERT o AAV9-eGFP. Con este fin, se utilizó la técnica FISH cuantitativa de telómeros (Q-FISH) en secciones de tejido de ratón, lo que permite la determinación de la intensidad de puntos del telómero dentro de los núcleos de un determinado tejido (Métodos) (Muñoz, Blanco *et al.* 2005). De acuerdo con una mayor expresión de mTERT, la mayoría de los tejidos de ratones tratados con AAV9-mTERT de ambos grupos de edad presentaban telómeros significativamente más largos que los controles de la misma edad AAV9-eGFP (Fig. 8, paneles A,B), lo que sugiere que la telomerasa estaba alargando los telómeros de manera eficiente. Para reforzar más este hecho, se midieron los porcentajes de telómeros cortos en las mismas secciones de tejido, ya que los telómeros cortos son el sustrato preferido de las

telomerasas. Un mes después del tratamiento con AAV9-mTERT, ambos grupos de edad mostraron una disminución significativa del porcentaje de telómeros cortos en comparación a los grupos tratados AAV9-eGFP, los cuales mostraron un aumento adicional de los telómeros cortos cuando se compararon con los ratones de 1 año y 2 de edad (Fig. 8, panel C). Digno de mencionar, es que se observó un mayor impacto de la expresión de TERT en el grupo de 2 años de edad, de nuevo de acuerdo con la preferencia de la telomerasa de los telómeros cortos. Todos estos datos, indican que una expresión aumentada de TERT en tejidos adultos a través de un enfoque de terapia génica resulta en una extensión funcional del telómero que actúa preferentemente en telómeros cortos.

Para entender mejor los efectos del tratamiento con AAV9-mTERT en la longitud de los telómeros, se realizó un estudio longitudinal mediante la medición de la longitud de los telómeros de los mismos individuos a los 3 y 8 meses después del tratamiento o al mes y a los 2 meses después del tratamiento en los grupos de 1 año y 2 años de edad, respectivamente. Para ello, se recogieron muestras de sangre de todos los ratones en el estudio en diferentes momentos y se determinó la longitud del telómero mediante el uso de la técnica Q-FISH de alto rendimiento (HT), previamente optimizado para muestras de sangre (Canela, Vera *et al.* 2007). Como era de esperar, la longitud media de los telómeros disminuyó con el tiempo en los ratones de control de ambos grupos de edad, lo que estaba relacionado con un aumento de los telómeros cortos (Fig. 8, Panel D). Por el contrario, los ratones tratados con AAV9-mTERT de ambos grupos de edad casi no mostraron una disminución de la longitud media de los telómeros en diferentes momentos después de la infección (Fig. 8, Panel D), relacionado con una disminución en el porcentaje de telómeros cortos con el tiempo (Fig. 8, Panel D). Ya que los vectores AAV9-mTERT transducen muy mal la médula ósea y el bazo, de ello se obtiene que los resultados pueden reflejar un mejor estado de salud de los ratones tratados con AAV9-mTERT en comparación con los controles AAV9-EGFP, de acuerdo con estudios previos que sugieren una relación entre el estado de salud y el mantenimiento de longitud de los telómeros (Ornish D, *et al.*, 2008; Lin J *et al.*, 2010).

Curiosamente, cuando se representó el comportamiento de los telómeros en cada ratón en dos tiempos distintos después del tratamiento (3 y 8 meses post-infección), se observó que 7 de cada 11 ratones tratados con AAV9-mTERT del grupo de edad de 1 año no mostraron disminución y ni siquiera un aumento neto en la longitud media de los telómeros en comparación con el punto de tiempo anterior (Fig. 9, panel A). Esto fue acompañado por 6 ratones de cada 11 que no mostraron incremento o ni siquiera una marcada disminución de porcentaje de telómeros cortos con el tiempo (Fig. 9, panel B). En contraste, 3 de cada 3 ratones tratados con AAV9-eGFP mostraron una disminución en la longitud media de los telómeros y un aumento en el porcentaje de telómeros cortos durante el mismo periodo de tiempo (Fig. 9, paneles A, B). En conjunto, estos datos indican que la expresión forzada de TERT de una manera tardía en la vida mediante el uso del enfoque de la terapia génica resulta en el rescate de telómeros cortos en varios tejidos y la prevención significativa de acortamiento de los telómeros en los linfocitos de sangre periférica de los mismos ratones. Este mantenimiento mejorado de los telómeros es tal vez el responsable de los efectos sistémicos anti-envejecimiento de la telomerasa y el aumento de la supervivencia observada en ambos grupos de ratones inyectados AAV9-mTERT.

Ejemplo 6: La expresión del telómero está asociada con un incremento de la expresión de β -catenina/ciclinaD1

Se han demostrado varias rutas celulares para modular el envejecimiento (Bishop, Lu *et al.*; Kenyon; Sahin y Depinho; Vaupel), en las cuales la expresión de la telomerasa y el mantenimiento de los telómeros tienen un amplio soporte experimental en estudios genéticos en ratones y seres humanos (Blasco, Lee *et al.* 1997; Herrera, Samper *et al.* 1999; Blasco 2007; Tomas-Loba, Flores *et al.* 2008). Aunque la expresión de TERT impide de manera significativa la acumulación de telómeros cortos, también es posible que al menos parte de los efectos anti-envejecimiento de TERT puedan estar mediados por su papel propuesto recientemente como cofactor en el promotor de genes diana de Wnt, que su vez es un jugador clave en la capacidad de auto-renovación de células madre adultas (Choi, Southworth *et al.* 2008; Park, Venteicher *et al.* 2009). Para evaluar esta posibilidad, se determinó la expresión de los genes diana TERT/Wnt β -catenina, Axina 2, CD44, así como de ciclina D1, una diana de la ruta de Wnt a través de β -catenina (Tetsu and McCormick 1999). También incluimos la expresión de p16, un inhibidor del ciclo celular cuyos niveles aumentan drásticamente asociados con el envejecimiento en ratones (Krishnamurthy, Ramsey *et al.* 2006; Molofsky, Slutsky *et al.* 2006).

El tratamiento con AAV9-mTERT conduce a un aumento de la forma activa de catenina en todos los tejidos probados, excepto para el hígado (Fig. 10, paneles A,B). El tratamiento AAV9-mTERT también conduce a un incremento de las células positivas para ciclina D1 comparadas con los grupos control de todos los tejidos con alto tropismo AAV9 (Fig. 10, paneles C,D), y esto también se observó en la capa basal de la piel y áreas neurogénicas del cerebro, tales como el hipocampo (Fig. 11). Esto último es de especial interés dado el claro beneficio del tratamiento AAV9-mTERT en las pruebas cognitivas (ver Fig. 4, paneles H-J). La expresión de otras dianas o efectores de la ruta TERT/Wnt, tales como CD44 y axina 2, sin embargo, no fueron consistentes con los niveles de expresión de TERT y fueron altamente dependientes del tipo de tejido, lo que sugiere que los efectos de TERT en algunos de los genes de la ruta de Wnt pueden ser regulados de una manera específica de tejido (Fig.12, paneles A, B).

Por último, consistentemente con la mejor firmeza del tejidos y retraso en el envejecimiento de los ratones tratados con AAV9-mTERT, se observó una disminución de los niveles de p16 en la mayoría de los órganos estudiados (Fig. 12, paneles C, D) a excepción del corazón, que mostró un aumento en los niveles de p16 como resultado de la

sobreexpresión de TERT.

En resumen, una serie de vías celulares implicadas en la renovación de los tejidos y en la firmeza celular, tales como las vías Wnt y p16, se ven afectadas después de un pulso de mTERT, que a su vez podría contribuir a un aumento de la esperanza de gozar de buena salud y la longevidad de los ratones tratados con TERT.

5 Referencias

- Armanios, M. Y., J. J. Chen, *et al.* (2007). "Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis." *N Engl J Med* 356(13): 1317-26.
- Artandi, S. E., S. Alson, *et al.* (2002). "Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in ageing mice." *Proc-Natl Acad Sci USA* 99(12): 8191-6.
- 10 Bailey, C. J. y P. R. Flatt (1982). "Hormonal control of glucose homeostasis during development and ageing in mice." *Metabolism* 31(3): 238-46.
- Bevins, R. A. y J. Besheer (2006). "Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'." *Nat Protoc* 1(3): 1306-11.
- Bishop, N. A., T. Lu, *et al.* "Neural mechanisms of ageing and cognitive decline." *Nature* 464(7288): 529-35.
- 15 Blasco, M. A. (2007). "Telomere length, stem cells and ageing." *Nat Chem Biol* 3(10): 640-9.
- Blasco, M. A., H. W. Lee, *et al.* (1997). "Telomere shortening and tumour formation by mouse cells lacking telomerase RNA." *Cell* 91(1): 25-34.
- Bluher, M., B. B. Kahn, *et al.* (2003). "Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue." *Science* 299(5606): 572-4.
- 20 BoADNr, A. G., M. Ouellette, *et al.* (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells." *Science* 279(5349): 349-52.
- Bonora, E., G. Targher, *et al.* (2000). "Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity." *Diabetes Care* 23(1): 57-63.
- 25 Buning, H., L. Perabo, *et al.* (2008). "Recent developments in adeno-associated virus vector technology." *J Gene Med* 10(7): 717-33.
- Calado, R. T. y N. S. Young (2009). "Telomere diseases." *N Engl J Med* 361(24): 2353-65.
- Canela, A., J. Martin-Caballero, *et al.* (2004). "Constitutive expression of T-cell lymphoma in Lck-Tert mice." *Mol Cell Biol* 24(10): 4275-93.
- 30 Canela, A., E. Vera, *et al.* (2007). "High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(13): 5300-5.
- Carter, B. J. (2005). "Adeno-associated virus vectors in clinical trials." *Hum Gene Ther* 16(5): 541-50.
- Castelhana-Carlos, M. J., N. Sousa, *et al.* (2009). "Identification methods in newborn C57BL/6 mice: a developmental and behavioural evaluation." *Lab Anim*.
- 35 Conboy, I. M., M. J. Conboy, *et al.* (2005). "Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment." *Nature* 433(7027): 760-4.
- Counter, C. M., A. A. Avilion, *et al.* (1992). "Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity." *EMBO J* 11(5): 1921-9.
- Counter, C. M., W. C. Hahn, *et al.* (1998). "Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 14723-8.
- 40 Choi, J., L. K. Southworth, *et al.* (2008). "TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program." *PLoS Genet* 4(1): e10.
- de Boer, J., J. O. Andressoo, *et al.* (2002). "Premature ageing in mice deficient in DNA repair and transcription." *Science* 296(5571): 1276-9.
- 45 Fauce, S. R., B. D. Jamieson, *et al.* (2008). "Telomerase-based pharmacologic enhancement of antiviral function of human CD8+ T lymphocytes." *J Immunol* 181(10): 7400-6.
- Ferguson, V. L., R. A. Ayers, *et al.* (2003). "Bone development and age-related bone loss in male C57BL/6J mice." *Bone* 33(3): 387-98.
- Flores, I., A. Canela, *et al.* (2008). "The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments." *Genes Dev* 22(5): 654-67.
- 50 Flores, I., M. L. Cayuela, *et al.* (2005). "Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior." *Science* 309(5738): 1253-6.
- Flores, I., G. Evan, *et al.* (2006). "Genetic analysis of myc and telomerase interactions in vivo." *Mol Cell Biol* 26(16): 6130-8.
- 55 Garcia-Cao, I., M. Garcia-Cao, *et al.* (2002). "'Super p53' mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumour resistant and age normally." *EMBO J* 21(22): 6225-35.
- Garcia-Cao, I., M. Garcia-Cao, *et al.* (2006). "Increased p53 activity does not accelerate telomere-driven ageing." *EMBO Rep* 7(5): 546-52.
- Gonzalez-Suarez, E., J. M. Flores, *et al.* (2002). "Cooperation between p53 mutation and high telomerase transgenic expression in spontaneous cancer development." *Mol Cell Biol* 22(20): 7291-301.
- 60 Gonzalez-Suarez, E., E. Samper, *et al.* (2001). "Increased epidermal tumours and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes." *EMBO J* 20(11): 2619-30.

- Guarente, L. (2006). "Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome." *Nature* 444(7121): 868-74.
- Hammerman, M. R. (1987). "Insulin-like growth factors and ageing." *Endocrinol Metab Clin North Am* 16(4): 995-1011.
- 5 Harley, C. B., A. B. Futcher, *et al.* (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." *Nature* 345(6274): 458-60.
- Harrison, D. E., R. Strong, *et al.* (2009). "Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice." *Nature* 460(7253): 392-5.
- Heikkinen, S., C. A. Argmann, *et al.* (2007). "Evaluation of glucose homeostasis." *Curr Protoc Mol Biol* Capítulo 29: Unidad 29B 3.
- 10 Hemann, M. T., M. A. Strong, *et al.* (2001). "The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability." *Cell* 107(1): 67-77.
- Herrera, E., E. Samper, *et al.* (1999). "Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres." *EMBO J* 18(11): 2950-60.
- 15 Inagaki, K., S. Fuess, *et al.* (2006). "Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8." *Mol Ther* 14(1): 45-53.
- Ingram, D. K. y M. A. Reynolds (1986). "Assessing the predictive validity of psychomotor tests as measures of biological age in mice." *Exp Ageing Res* 12(3): 155-62.
- Jiang, H., E. Schiffer, *et al.* (2008). "Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human ageing and disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(32): 11299-304.
- 20 Kenyon, C. J. "The genetics of ageing." *Nature* 464(7288): 504-12.
- Krishnamurthy, J., M. R. Ramsey, *et al.* (2006). "p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential." *Nature* 443(7110): 453-7.
- Lee, H. W., M. A. Blasco, *et al.* (1998). "Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs." *Nature* 392(6676): 569-74.
- 25 Lin J, Epel E, Cheon J, Kronke C, Sinclair E, Bigos M, Wolkowitz O, Mellon S, Blackburn E (2010). "Analyses and comparisons of telomerase activity and telomere length in human T and B cells: insights for epidemiology of telomere maintenance". *J Immunol Methods*. 31;352(1-2):71-80. Epub 2009 Oct 21
- Matheu, A., A. Maraver, *et al.* (2007). "Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway." *Nature* 448(7151): 375-9.
- 30 Matthews, D. R., J. P. Hosker, *et al.* (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." *Diabetologia* 28(7): 412-9.
- McKay, J. D., R. J. Hung, *et al.* (2008). "Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33." *Nat Genet* 40(12): 1404-6.
- Merten, O. W., C. Geny-Fiamma, *et al.* (2005). "Current issues in adeno-associated viral vector production." *Gene Ther* 12 Suppl 1: S51-61.
- 35 Millar, S. E. (2009). "Cell biology: The not-so-odd couple." *Nature* 460(7251): 44-5.
- Mitchell, J. R., E. Wood, *et al.* (1999). "A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita." *Nature* 402(6761): 551-5.
- Molofsky, A. V., S. G. Slutsky, *et al.* (2006). "Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing." *Nature* 443(7110): 448-52.
- 40 Moynihan, K. A., A. A. Grimm, *et al.* (2005). "Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice." *Cell Metab* 2(2): 105-17.
- Munoz, P., R. Blanco, *et al.* (2005). "XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature ageing and cancer." *Nat Genet* 37(10): 1063-71.
- 45 Ornish D, Lin J, Daubenmier J, Weidner G, Epel E, Kemp C, Magbanua MJ, Marlin R, Yglecias L, Carroll PR, Blackburn EH. (2008). "Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study". *Lancet Oncol*. 9(11):1048-57. Epub 2008 Sep 15. Erratum in: *Lancet Oncol*. 2008 Dec;9(12):1124..
- Parfitt, A. M. (1984). "Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: cellular mechanisms and biomechanical consequences." *Calcif Tissue Int* 36 Suppl 1: S123-8.
- 50 Park, J. I., A. S. Venteicher, *et al.* (2009). "Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin." *Nature* 460(7251): 66-72.
- Rafnar, T., P. Sulem, *et al.* (2009). "Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types." *Nat Genet* 41(2): 221-7.
- Reya, T. y H. Clevers (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." *Nature* 434(7035): 843-50.
- 55 Sahin, E. y R. A. Depinho "Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing." *Nature* 464(7288): 520-8.
- Samper, E., J. M. Flores, *et al.* (2001). "Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature ageing in Terc^{-/-} mice with short telomeres." *EMBO Rep* 2(9): 800-7.
- Sarin, K. Y., P. Cheung, *et al.* (2005). "Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells." *Nature* 436(7053): 1048-52.
- 60 Schoeftner, S., R. Blanco, *et al.* (2009). "Telomere shortening relaxes X chromosome inactivation and forces global transcriptome alterations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(46): 19393-8.
- Shimokata, H., J. D. Tobin, *et al.* (1989). "Studies in the distribution of body fat: I. Effects of age, sex, and obesity." *J Gerontol* 44(2): M66-73.
- Steen, B. (1988). "Body composition and ageing." *Nutr Rev* 46(2): 45-51.
- 65 Tafuro, S., E. Ayuso, *et al.* (2009). "Inducible adeno-associated virus vectors promote functional angiogenesis in adult organisms via regulated vascular endothelial growth factor expression." *Cardiovasc Res* 83(4): 663-71.

- Tetsu, O. y F. McCormick (1999). "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells." *Nature* 398(6726): 422-6.
- Tomas-Loba, A., I. Flores, *et al.* (2008). "Telomerase reverse transcriptase delays ageing in cancer-resistant mice." *Cell* 135(4): 609-22.
- 5 Tsakiri, K. D., J. T. Cronkhite, *et al.* (2007). "Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(18): 7552-7.
- Vaupel, J. W. "Biodemography of human ageing." *Nature* 464(7288): 536-42.
- Vulliamy, T., A. Marrone, *et al.* (2001). "The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita." *Nature* 413(6854): 432-5.
- 10 Yamaguchi, H., R. T. Calado, *et al.* (2005). "Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia." *N Engl J Med* 352(14): 1413-24.
- Zincarelli, C., S. Soltys, *et al.* (2008). "Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection." *Mol Ther* 16(6): 1073-80.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110>	FUNDACIÓN CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS CARLOS III; UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA					
5	<120> La transcriptasa inversa de la telomerasa como protección frente al envejecimiento					
	<130> EP-865					
10	<160> 22					
	<170> SeqWin99, versión 1.02					
	<210> 1					
15	<211> 4018					
	<212> DNA					
	<213> Homo sapiens					
	<400> 1					
20	caggcagcgc	tgcgtcctgc	tgcgcacgtg	ggaagccctg	gccccggcca	cccccgcat 60
	gccgcgcgct	ccccgctgcc	gagccgtgcg	ctccctgctg	cgcagccact	accgcgaggt 120
	gctgcccgtg	gccacgttcg	tgcggcgcct	ggggcccccag	ggctggcggc	tgggtgcagcg 180
	cggggaccgc	gcggttttcc	gcgcgctggt	ggcccagtg	ctgggtgtcg	tgccctggga 240
	cgcacggccg	cccccgccg	cccctcctt	ccgccaggtg	tctgcctga	aggagctggt 300
25	ggccccgagt	ctgcagaggc	tgtgcgagcg	cggcgcgaag	aacgtgctgg	ccttcggctt 360
	cgcgctgctg	gacggggccc	gcgggggccc	ccccgaggcc	ttcaccacca	gcgtgcgcag 420
	ctacctgccc	aacacggtga	ccgacgcact	gcgggggagc	ggggcgtggg	ggctgctgct 480
	gcgcccgcgt	ggcgacgacg	tgctggttca	cctgctggca	cgctgcgcgc	tctttgtgct 540
	ggtggctccc	agctgcgctt	accaggtgtg	cgggcccggc	ctgtaccagc	tcggcgtgct 600
30	cactcaggcc	cggccccccg	cacacgctag	tggaccccga	aggcgtctgg	gatgcgaacg 660
	ggcctggaac	catagcgtca	gggaggcccg	ggtcccctg	ggcctgccag	ccccgggtgc 720
	gaggaggcgc	gggggcagtg	ccagccgaag	tctgcccgtg	ccccagagcc	ccaggcgtgg 780
	cgtgcccctt	gagccggagc	ggagcccctt	tgggcagggg	tcttggggcc	accggggcag 840
	gacgcgtgga	ccgagtgacc	gtggtttctg	tgtggtgtca	cctgcccagc	ccgccgaaga 900
35	agccacctct	ttggaggggt	cgctctctgg	cacgcgccac	tcccaccat	ccgtggggccg 960
	ccagcaccac	gcggggcccc	catccacatc	gcggccacca	cgctcccctg	acacgccttg 1020
	tcccccggtg	tacgcccaga	ccaagcactt	cctctactcc	tcaggcgaca	aggagcagct 1080
	gcggcccctc	ttcctactca	gctctctgag	gcccagcctg	actggcgctc	ggaggctcgt 1140
	ggagaccatc	tttctgggtt	ccaggccctg	gatgccaggg	actccccgca	ggttgccccg 1200
40	cctgcccagc	cgctactggc	aaatgcggcc	cctgtttctg	gagctgcttg	ggaaccacgc 1260
	gcagtgcccc	tacgggggtg	tcctcaagac	gcactgcccg	ctgcgagctg	cggtcaccac 1320
	agcagccggt	gtctgtgccc	gggagaagcc	ccagggtctt	gtggcggccc	ccgaggagga 1380
	ggacacagac	ccccgctgcc	tgggtgcagc	gctcccagcc	cacagcagcc	cctggcaggt 1440
	gtacggcttc	gtgcgggctt	gcctgcgccc	gctggtgccc	ccaggcctct	ggggctccag 1500
45	gcacaacgaa	cgccgcttcc	tcaggaacac	caagaagttc	atctcccctg	ggaagcatgc 1560
	caagctctcg	ctgcaggagc	tgacgtgga	gatgagcgtg	cgggactcgc	cttggctgcg 1620
	caggagcccc	ggggttggct	gtgttccggc	cgcagagcac	cgctctgctg	aggagatcct 1680
	ggccaagttc	ctgcactggc	tgatgagtgt	gtacgtcgtc	gagctgctca	ggtctttctt 1740
	ttatgtcacg	gagaccacgt	ttcaaaaaga	caggctcttt	ttctaccgga	agagtgtcgt 1800
50	gagcaagtgt	caaagcattg	gaatcagaca	gcacttgaag	aggggtgcagc	tgccgggagct 1860
	gtcgggaagca	gaggtcaggc	agcatcgagg	agccaggccc	gcctgctgca	cgctccagact 1920
	ccgcttcac	ccccagcctg	acgggctgcg	gccgattgtg	aacatggact	acgtcgtggg 1980
	agccagaacg	ttccgcagag	aaaagagggc	cgagcgtctc	acctcgaggg	tgaaggcact 2040
	ggtcagcgtg	ctcaactacg	agcgggcgcg	gcgcccgggc	ctcctggggc	cctctgtgct 2100
55	gggcctggac	gatatacaca	gggcctggcg	caccttcgtg	ctgcgtgtgc	gggcccagga 2160
	cccgcgcctt	gagctgtact	ttgtcaaggt	ggatgtgacg	ggcgcgtacg	acaccatccc 2220
	ccaggacagc	ctcacggagg	tcatcgccag	catcatcaaa	ccccagaaca	cgtactgctg 2280
	gcgtcgggat	cccgtggctc	agaaggcccg	ccatggggc	gtccgcaagg	ccttcaagag 2340
	ccacgtctct	acccttgacg	acctccagcc	gtacatgcga	cagttcgtg	ctcacctgca 2400
60	ggagaccagc	ccgctgaggg	atgccgtcgt	catcgagcag	agctcctccc	tgaatgaggc 2460
	cagcagtgcc	ctcttcgacg	tcttctctacg	cttcatgtgc	caccacgccc	tgccgatcag 2520
	gggcaagtcc	tacgtccagt	gccaggggat	cccgcagggc	tccatcctct	ccacgctgct 2580
	ctgcagcctg	tgctacggcg	acatggagaa	caagctgttt	gcggggattc	ggcgggacgg 2640
	gctgctcctg	agtttggtg	atgatttctt	gtttggtgaca	cctcacctca	cccacgcgaa 2700
65	aaccttctct	aggaccctgg	tccgaggtgt	ccctgagtat	ggctgcgtgg	tgaacttgcg 2760
	gaagacagtg	gtgaacttcc	ctgtagaaga	cgaggccctg	ggtggcacgg	cttttgttca 2820
	gatgccggcc	cacggcctat	tcccctggtg	cggcctgctg	ctggataccc	ggaccctgga 2880
	ggtgcagagc	gactactcca	gctatgcccc	gacctccatc	agagccagtc	tcaccttcaa 2940
	ccgcggcttc	aaggctggga	ggaacatg	tcgcaaac	tttggggtct	tgccgctgaa 3000
70	gtgtcacagc	ctgtttctgg	atgttcaggt	gaacagcctc	cagacgggtg	gcaccaacat 3060

ES 2 590 461 T3

```

ctacaagatc ctccctgctgc aggcgtacag gtttcacgca tgtgtgctgc agctccatt 3120
tcatcagcaa gtttggaga accccacatt tttcctgctgc gtcattctctg acacggcctc 3180
cctctgctac tccatcctga aagccaagaa cgcagggatg tcgctggggg ccaagggcgc 3240
cgccggccct ctgcccctcg aggcctgtgca gtggctgtgc caccaagcat tcctgctcaa 3300
5 gctgactcga caccgtgtca cctacgtgcc actcctgggg tcaactcagga cagcccagac 3360
gcagctgagt cgggaagctcc cggggacgac gctgactgcc ctggaggccg cagccaacct 3420
ggcactgccc tcagacttca agaccatcct ggactgatgg ccacccgccc acagccagggc 3480
cgagagcaga caccagcagc cctgtcacgc cgggctctac gtcccagga gggagggggc 3540
gcccacaccc aggcctgcac cgctgggagt ctgaggcctg agtgagtgtt tggccgaggc 3600
10 ctgcatgtcc ggctgaaggc tgagtgtccg gctgaggcct gagcgagtgt ccagccaagg 3660
gctgagtgtc cagcacacct gccgtcttca cttccccaca ggctggcgct cggctccacc 3720
ccagggccag cttttcctca ccaggagccc ggcttccact cccacatag gaatagtcca 3780
tccccagatt cgccattgtt caccctcgc cctgcctcc tttgcctcc acccccacca 3840
tccaggtgga gaccctgaga aggaccctgg gagctctggg aatttgaggt gaccaaaggt 3900
15 gtgccctgta cacaggcag gaccctgac ctggatgggg gtccctgtgg gtcaaattgg 3960
ggggaggtgc tgtgggagta aaatactgaa tatatgagtt tttcagtttt gaaaaaaa 4018

<210> 2
<211> 1132
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
25 Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
1 5 10 15

His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
30 20 25 30

Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
35 35 40 45

Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
35 50 55 60

Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
65 70 75 80

40 Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val
85 90 95

Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro
45 100 105 110

Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr
115 120 125

50 Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val
130 135 140

Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val
145 150 155 160

55 Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr
165 170 175

Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly
60 180 185 190

Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg
195 200 205

65 Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg
210 215 220

Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg
225 230 235 240

70 Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp
245 250 255

```

ES 2 590 461 T3

Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val
260 265 270

5 Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala
275 280 285

10 Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His
290 295 300

Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro
305 310 315 320

15 Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly
325 330 335

Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro
340 345 350

20 Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser
355 360 365

Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln
370 375 380

25 Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His
385 390 395 400

30 Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg
405 410 415

Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln
420 425 430

35 Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu
435 440 445

Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe
450 455 460

40 Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser
465 470 475 480

45 Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser
485 490 495

Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met
500 505 510

50 Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys
515 520 525

Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe
530 535 540

55 Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe
545 550 555 560

60 Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr
565 570 575

Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His
580 585 590

65 Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln
595 600 605

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
610 615 620

70 Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val

ES 2 590 461 T3

	625		630		635		640
	Gly Ala Arg Thr	Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser					
5		645			650		655
	Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg						
		660			665		670
10	Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg						
		675			680		685
	Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro						
		690			695		700
15	Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile						
		705			710		715
	Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln						
20					725		730
	Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His						
		740			745		750
25	Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp						
		755			760		765
	Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser						
		770			775		780
30	Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu						
		785			790		795
	Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His						
35					805		810
	Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro						
		820			825		830
40	Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp						
		835			840		845
	Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu						
		850			855		860
45	Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala						
		865			870		875
	Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys						
50					885		890
	Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu						
		900			905		910
55	Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe						
		915			920		925
	Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser						
		930			935		940
60	Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe						
		945			950		955
	Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly						
65					965		970
	Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn						
		980			985		990
70	Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln						
		995			1000		1005

ES 2 590 461 T3

```

gcagagctcc tccctgaatg aggccagcag tggcctcttc gacgtcttcc tacgcttcat 2460
gtgccaccac gccgtgcgca tcaggggcaa gtcctacgtc cagtgccagg ggatcccgca 2520
gggctccatc ctctccacgc tgctctgcag cctgtgctac ggcgacatgg agaacaagct 2580
5 gtttgcgggg attcggcggg acgggctgct cctgcgtttg gtggatgatt tcttgttggg 2640
gacacctcac ctcacccacg cgaaacctt cctcaggacc ctggtcgag gtgtccctga 2700
gtatggctgc gtggtgaact tgcggaagac agtggggaac ttccctgtag aagacgaggc 2760
cctgggtggc acggcttttg ttcagatgcc ggcccacggc ctattcccct ggtgcggcct 2820
gctgctggat acccggaccc tggaggtgca gagcgactac tccagctatg cccggacctc 2880
catcagagcc agtctcacct tcaaccgagg cttcaaggct gggaggaaca tgcgtcgcaa 2940
10 actctttggg gtcttcgggc tgaagtgtca cagcctgttt ctggatttgc aggtgaacag 3000
ctccagacg gtgtgcacca acatctacaa gatcctcctg ctgcaggcgt acaggtttca 3060
cgcagtgtgt ctgcagctcc catttcatca gcaagtttgg aagaacccca catttttctc 3120
gcgcgtcatc tctgacacgg cctccctctg ctactccatc ctgaaagcca agaacgcagg 3180
gatgtcgctg ggggccaagg gcgcgcggcg ccctctgccc tccgaggccg tgcagtggct 3240
15 gtgccaccaa gcattcctgc tcaagctgac tcgacaccgt gtcacctacg tgccactcct 3300
ggggtcactc aggacagccc agacgcagct gagtcggaag ctcccgggga cgacgctgac 3360
tgccttgagg gccgcagcca acccggcact gccctcagac ttcaagacca tcctggactg 3420
atggccaccc gccacagcc aggccgagag cagacaccag cagccctgtc acgcccggct 3480
ctacgtccca gggaggaggg ggcggcccac acccaggccc gcaccgctgg gagtctgagg 3540
20 cctgagtgat tgtttggcgg aggcctgcat gtcgggtga aggtgagtg tccggctgag 3600
gcctgagcga gtgtccagcc aagggtgag tgtccagcac acctgcccgt ttcacttccc 3660
cacaggctgg cgctcggctc caccaccagg ccagcttttc ctcaccagga gcccggcttc 3720
cactccccac ataggaatag tccatcccca gattcgccat tgttcacccc tcgcccctgcc 3780
ctccttttgc ttccaccccc accatccagg tggagacctt gagaaggacc ctgggagctc 3840
25 tgggaatttg gagtgaccaa aggtgtgccc tgtacacagg cgaggacctt gcacctggat 3900
gggggtccct gtgggtcaaaa ttgggggggag gtgctgtggg agtaaaaatac tgaatatatg 3960
agtttttcag ttttgaaaaa aa 3982

30 <210> 4
    <211> 1120
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

35 <400> 4
Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
1 5 10 15

40 His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
20 25 30

Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
35 40 45

45 Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
50 55 60

Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
65 70 75 80

50 Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val
85 90 95

Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro
100 105 110

55 Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr
115 120 125

60 Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val
130 135 140

Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val
145 150 155 160

65 Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr
165 170 175

70 Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly
180 185 190

```

ES 2 590 461 T3

	Pro	Arg	Arg	Arg	Leu	Gly	Cys	Glu	Arg	Ala	Trp	Asn	His	Ser	Val	Arg	
			195					200					205				
5	Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Arg	Arg	Arg	
		210					215					220					
	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	Pro	Leu	Pro	Lys	Arg	Pro	Arg	Arg	
	225					230					235					240	
10	Gly	Ala	Ala	Pro	Glu	Pro	Glu	Arg	Thr	Pro	Val	Gly	Gln	Gly	Ser	Trp	
					245					250					255		
	Ala	His	Pro	Gly	Arg	Thr	Arg	Gly	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Phe	Cys	Val	
15				260					265					270			
	Val	Ser	Pro	Ala	Arg	Pro	Ala	Glu	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Gly	Ala	
			275					280					285				
20	Leu	Ser	Gly	Thr	Arg	His	Ser	His	Pro	Ser	Val	Gly	Arg	Gln	His	His	
	290						295					300					
	Ala	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Trp	Asp	Thr	Pro	
	305					310					315					320	
25	Cys	Pro	Pro	Val	Tyr	Ala	Glu	Thr	Lys	His	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ser	Gly	
					325					330						335	
	Asp	Lys	Glu	Gln	Leu	Arg	Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro	
30				340					345					350			
	Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Phe	Leu	Gly	Ser	
			355					360					365				
35	Arg	Pro	Trp	Met	Pro	Gly	Thr	Pro	Arg	Arg	Leu	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln	
	370					375						380					
	Arg	Tyr	Trp	Gln	Met	Arg	Pro	Leu	Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Asn	His	
	385				390						395					400	
40	Ala	Gln	Cys	Pro	Tyr	Gly	Val	Leu	Leu	Lys	Thr	His	Cys	Pro	Leu	Arg	
					405					410					415		
	Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Ala	Gly	Val	Cys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Gln	
45				420					425					430			
	Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Asp	Pro	Arg	Arg	Leu	
			435				440						445				
50	Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Gln	His	Ser	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Tyr	Gly	Phe	
	450					455						460					
	Val	Arg	Ala	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	Leu	Trp	Gly	Ser	
	465				470					475						480	
55	Arg	His	Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Leu	Arg	Asn	Thr	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser	
				485						490					495		
	Leu	Gly	Lys	His	Ala	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Thr	Trp	Lys	Met	
60				500					505					510			
	Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ala	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Val	Gly	Cys	
			515					520					525				
65	Val	Pro	Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe	
	530					535						540					
	Leu	His	Trp	Leu	Met	Ser	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Phe	
	545				550						555					560	
70	Phe	Tyr	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Gln	Lys	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr	
				565						570					575		

ES 2 590 461 T3

	Arg	Lys	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Gly	Ile	Arg	Gln	His
				580					585					590		
5	Leu	Lys	Arg	Val	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Gln
			595					600					605			
	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile
10		610					615					620				
	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Asn	Met	Asp	Tyr	Val	Val
	625					630					635					640
15	Gly	Ala	Arg	Thr	Phe	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Ser
					645					650					655	
	Arg	Val	Lys	Ala	Leu	Phe	Ser	Val	Leu	Asn	Tyr	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg
				660					665					670		
20	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Leu	Asp	Asp	Ile	His	Arg
			675					680					685			
	Ala	Trp	Arg	Thr	Phe	Val	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Gln	Asp	Pro	Pro	Pro
25		690					695					700				
	Glu	Leu	Tyr	Phe	Val	Lys	Asp	Arg	Leu	Thr	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Ile
	705					710					715					720
30	Ile	Lys	Pro	Gln	Asn	Thr	Tyr	Cys	Val	Arg	Arg	Tyr	Ala	Val	Val	Gln
					725					730					735	
	Lys	Ala	Ala	His	Gly	His	Val	Arg	Lys	Ala	Phe	Lys	Ser	His	Val	Ser
				740					745					750		
35	Thr	Leu	Thr	Asp	Leu	Gln	Pro	Tyr	Met	Arg	Gln	Phe	Val	Ala	His	Leu
			755					760					765			
	Gln	Glu	Thr	Ser	Pro	Leu	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Ile	Glu	Gln	Ser	Ser
40		770					775					780				
	Ser	Leu	Asn	Glu	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	Phe	Leu	Arg	Phe
	785					790					795					800
45	Met	Cys	His	His	Ala	Val	Arg	Ile	Arg	Gly	Lys	Ser	Tyr	Val	Gln	Cys
					805					810					815	
	Gln	Gly	Ile	Pro	Gln	Gly	Ser	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu
				820					825					830		
50	Cys	Tyr	Gly	Asp	Met	Glu	Asn	Lys	Leu	Phe	Ala	Gly	Ile	Arg	Arg	Asp
			835					840					845			
	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Val	Asp	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Thr	Pro	His
55		850					855					860				
	Leu	Thr	His	Ala	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Gly	Val	Pro
	865					870					875					880
60	Glu	Tyr	Gly	Cys	Val	Val	Asn	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Asn	Phe	Pro
					885					890					895	
	Val	Glu	Asp	Glu	Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Ala	Phe	Val	Gln	Met	Pro	Ala
				900					905					910		
65	His	Gly	Leu	Phe	Pro	Trp	Cys	Gly	Leu	Leu	Leu	Asp	Thr	Arg	Thr	Leu
			915					920					925			
	Glu	Val	Gln	Ser	Asp	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ala	Arg	Thr	Ser	Ile	Arg	Ala
	930						935					940				
70	Ser	Leu	Thr	Phe	Asn	Arg	Gly	Phe	Lys	Ala	Gly	Arg	Asn	Met	Arg	Arg

ES 2 590 461 T3

	945	950	955	960
	Lys Leu Phe Gly Val	Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp		
5		965	970	975
	Leu Gln Val Asn Ser	Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile		
		980	985	990
10	Leu Leu Leu Gln Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro			
		995	1000	1005
	Phe His Gln Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile			
		1010	1015	1020
15	Ser Asp Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala			
		1025	1030	1035
	Gly Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu			
20		1045	1050	1055
	Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg			
		1060	1065	1070
25	His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln			
		1075	1080	1085
	Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu			
		1090	1095	1100
30	Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp			
		1105	1110	1115
				1120
35	<210> 5			
	<211> 3426			
	<212> DNA			
	<213> Mus musculus			
40	<400> 5			
	gtgggaggcc catcccggcc ttgagcacia tgaccgcgpc tcctcgttgc cccgcggtgc			60
	gctctctgct gcgcagccga taccgggagg tgtggccgct ggcaaccttt gtgcggcgcc			120
	tggggcccga gggcagggcg cttgtgcaac ccggggacc ccgaatctac cgcacttttg			180
	ttgcccaatg cctagtgtgc atgcaactgg gctcacagcc tccacctgcc gacctttcct			240
45	tccaccaggt gtcacccctg aaagagctgg tggccagggt tgtgcagaga ctctgcgagc			300
	gcaacgagat aaactgtctg gcttttggct ttgagctgct taacgaggcc agaggcgggc			360
	ctcccatggc cttcactagt agcgtgcgta gctacttgcc caacactggt attgagacct			420
	tgctgtctag tgggtcatgg atgctactgt tgagccgagt gggcgacgac ctgctggctc			480
	acctgctggc acactgtgct ctttatcttc tgggtcccc cagctgtgcc taccagggtg			540
50	gtgggtctcc cctgtacca atttgtgcca ccacggatat ctggccctct gtgtccgcta			600
	gttacaggcc caccggacc gtgggcagga atttactaa ccttaggttc ttacaacaga			660
	tcaagagcag tagtcgccag gaagcaccga aaccctggc cttgccatct cgaggtacaa			720
	agaggcatct gagtctcacc agtacaagtg tgccttcagc taagaaggcc agatgctatc			780
	ctgtccccgag agtggaggag ggacccccaca ggcagggtgct accaacccca tcaggcaaat			840
55	catgggtgcc aagtctgct cggcccccg aggtgcctac tgcagagaaa gattgtctt			900
	ctaaaggaat ggtgtctgac ctgagctctc ctgggtcggg tgctgtgtaa cacaagccca			960
	gctccacatc tctgctgtca ccaccccgcc aaaatgcctt tcagctcagg ccatttattg			1020
	agaccagaca tttcctttac tccaggggag atggccaaga gcgtctaacc ccctcattcc			1080
	tactcagcaa cctccagcct aacttgactg gggccaggag actgggtggag atcatctttc			1140
60	tgggtcctca gctcaggaca tcaggaccac tctgcaggac acaccgtcta tcgctcagat			1200
	actggcagat gcggcccctg ttccaacagc atctgggtgaa ccatgcagag tgccaatatg			1260
	tcagactcct caggtcaccat tgcaggtttc gaacagcaaa ccaacagggt acagatgcct			1320
	tgaacaccag cccaccgcac ctcatggatt tgctccgctt gcacagcagt ccctggcagg			1380
	tatatgggtt tcttcggggc tgtctctgca aggtgggtgct tgctagtctc tggggtacca			1440
65	ggcacaatga gcgcccgttc ttaagaact taagaagtt catctcgttg gggaaatacg			1500
	gcaagctatc actgcaggaa ctgatgtgga agatgaaagt agaggattgc cactggctcc			1560
	gcagcagccc ggggaaggac cgtgtccccg ctgcagagca ccgtctgagg gagaggatcc			1620
	tggctacggt cctgttctggt ctgatggaca catacgtggg acagctgctt aggtcattct			1680
	tttacatcac agagagcaca ttccagaaga acaggctctt cttctaccgt aagagtgtgt			1740
70	ggagcaagct gcagagcatt ggagtcaggc aacaccttga gagagtgcgg ctacgggagc			1800
	tgtcacaaga ggaggtcagg catcaccagg acacctggct agccatgccc atctgcagac			1860

ES 2 590 461 T3

```

tgcgcttcat ccccaagccc aacggcctgc ggcccattgt gaacatgagt tatagcatgg 1920
gtaccagagc tttgggcaga aggaagcagg cccagcattt caccagcgt ctcaagactc 1980
tcttcagcat gctcaactat gagcggacaa aacatcctca ccttatgggg tcttctgtac 2040
5 tgggatgtaa tgacatctac aggacctggc gggcctttgt gctgctgtg cgtgctctgg 2100
accagacacc caggatgtac tttgtaagc cagatgtgac cggggcctat gatgccatcc 2160
cccagggtaa gctggtggag gttggtgcca atatgatcag gcactcggag agcacgtact 2220
gtatccgcca gtatgcagtg gtccggagag atagccaagg ccaagtccac aagtccttta 2280
ggagacaggt caccaccctc tctgacctcc agccatacat gggccagttc cttaaagcatc 2340
10 tgcaggattc agatgccagt gcactgagga actccgttgt catcgagcag agcatctcta 2400
tgaatgagag cagcagcagc ctgtttgact tcttcctgca cttcctgctg cacagtgtcg 2460
taaagattgg tgacaggtgc tatacgcagt gccagggcat cccccagggc tccagcctat 2520
ccaccctgct ctgcagtctg tgtttcggag acatggagaa caagctgttt gctgaggtgc 2580
agcgggatgg gttgctttta cgttttggtg atgactttct gttggtgacg cctcacttgg 2640
15 accaagcaaa aaccttctc agcaccctgg tccatggcgt tcttgagtat gggtgcatga 2700
taaacttgca gaagacagtg gtgaacttcc ctgtggagcc tggtagcctg ggtggtgacg 2760
ctccatacca gctgctgct cactgccttc ttccctgggtg tggccttgctg ctggacactc 2820
agactttgga ggtgttctgt gactactcag gttatgcccc gacctcaatt aagacgagcc 2880
tcaccttcca gagtgtcttc aaagctggga agaccatgcg gaacaagctc ctgtcggctc 2940
20 tgcggttgaa gtgtcacggt ctatctctag acttgcaggt gaacagcctc cagacagtct 3000
gcatcaatat atacaagatc ttctgcttcc aggcctacag gttccatgca tgtgtgattc 3060
agcttccctt tgaccagcgt gttaggaaga acctcacatt ctttctgggc atcatctcca 3120
gccaagcctc ctgctgctat gctatcctga aggtcaagaa tccaggaatg aactaaagg 3180
cctctggctc ctttctctc gaagccgcac attggctctg ctaccaggcc ttctgctca 3240
25 agctggctgc tcattctgtc atctacaaat gtctcctggg acctctgagg acagcccaaa 3300
aactgctgtg ccggaagctc ccagaggcga caatgacct ccttaaagct gcagctgacc 3360
cagccctaag cacagacttt cagaccattt tggactaacc ctgtctcctt cegctagatg 3420
aacatg 3426

30 <210> 6
    <211> 1122
    <212> PRT
    <213> Mus musculus

35 <400> 6
Met Thr Arg Ala Pro Arg Cys Pro Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
1 5 10 15

40 Arg Tyr Arg Glu Val Trp Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
20 25 30

Pro Glu Gly Arg Arg Leu Val Gln Pro Gly Asp Pro Lys Ile Tyr Arg
35 40 45

45 Thr Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Met His Trp Gly Ser Gln Pro
50 55

Pro Pro Ala Asp Leu Ser Phe His Gln Val Ser Ser Leu Lys Glu Leu
65 70 75 80

50 Val Ala Arg Val Val Gln Arg Leu Cys Glu Arg Asn Glu Arg Asn Val
85 90 95

Leu Ala Phe Gly Phe Glu Leu Leu Asn Glu Ala Arg Gly Gly Pro Pro
100 105 110

55 Met Ala Phe Thr Ser Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Ile
115 120 125

60 Glu Thr Leu Arg Val Ser Gly Ala Trp Met Leu Leu Leu Ser Arg Val
130 135 140

Gly Asp Asp Leu Leu Val Tyr Leu Leu Ala His Cys Ala Leu Tyr Leu
145 150 155 160

65 Leu Val Pro Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Ser Pro Leu Tyr
165 170 175

70 Gln Ile Cys Ala Thr Thr Asp Ile Trp Pro Ser Val Ser Ala Ser Tyr
180 185 190

```

ES 2 590 461 T3

	Arg	Pro	Thr	Arg	Pro	Val	Gly	Arg	Asn	Phe	Thr	Asn	Leu	Arg	Phe	Leu	
			195					200					205				
5	Gln	Gln	Ile	Lys	Ser	Ser	Ser	Arg	Gln	Glu	Ala	Pro	Lys	Pro	Leu	Ala	
		210					215					220					
	Leu	Pro	Ser	Arg	Gly	Thr	Lys	Arg	His	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Thr	Ser	
	225					230					235					240	
10	Val	Pro	Ser	Ala	Lys	Lys	Ala	Arg	Cys	Tyr	Pro	Val	Pro	Arg	Val	Glu	
					245					250					255		
	Glu	Gly	Pro	His	Arg	Gln	Val	Leu	Pro	Thr	Pro	Ser	Gly	Lys	Ser	Trp	
15				260					265					270			
	Val	Pro	Ser	Pro	Ala	Arg	Ser	Pro	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	Glu	Lys	Asp	
			275					280					285				
20	Leu	Ser	Ser	Lys	Gly	Lys	Val	Ser	Asp	Leu	Ser	Leu	Ser	Gly	Ser	Val	
	290						295					300					
	Cys	Cys	Lys	His	Lys	Pro	Ser	Ser	Thr	Ser	Leu	Leu	Ser	Pro	Pro	Arg	
	305					310					315					320	
25	Gln	Asn	Ala	Phe	Gln	Leu	Arg	Pro	Phe	Ile	Glu	Thr	Arg	His	Phe	Leu	
					325					330					335		
	Tyr	Ser	Arg	Gly	Asp	Gly	Gln	Glu	Arg	Leu	Asn	Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	
30				340					345					350			
	Ser	Asn	Leu	Gln	Pro	Asn	Leu	Thr	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Ile	
			355					360					365				
35	Ile	Phe	Leu	Gly	Ser	Arg	Pro	Arg	Thr	Ser	Gly	Pro	Leu	Cys	Arg	Thr	
	370						375					380					
	His	Arg	Leu	Ser	Arg	Arg	Tyr	Trp	Gln	Met	Arg	Pro	Leu	Phe	Gln	Gln	
	385					390					395					400	
40	Leu	Leu	Val	Asn	His	Ala	Glu	Cys	Gln	Tyr	Val	Arg	Leu	Leu	Arg	Ser	
					405					410						415	
	His	Cys	Arg	Phe	Arg	Thr	Ala	Asn	Gln	Gln	Val	Thr	Asp	Ala	Leu	Asn	
45				420					425					430			
	Thr	Ser	Pro	Pro	His	Leu	Met	Asp	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Ser	Ser	Pro	
			435					440					445				
50	Trp	Gln	Val	Tyr	Gly	Phe	Leu	Arg	Ala	Cys	Leu	Cys	Lys	Val	Val	Ser	
	450						455					460					
	Ala	Ser	Leu	Trp	Gly	Thr	Arg	His	Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Phe	Lys	Asn	
	465					470					475					480	
55	Leu	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser	Leu	Gly	Lys	Tyr	Gly	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	
					485					490						495	
	Glu	Leu	Met	Trp	Lys	Met	Lys	Val	Glu	Asp	Cys	His	Trp	Leu	Arg	Ser	
60				500					505					510			
	Ser	Pro	Gly	Lys	Asp	Arg	Val	Pro	Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	
			515					520					525				
65	Arg	Ile	Leu	Ala	Thr	Phe	Leu	Phe	Trp	Leu	Met	Asp	Thr	Tyr	Val	Val	
	530						535					540					
	Gln	Leu	Leu	Arg	Ser	Phe	Phe	Tyr	Ile	Thr	Glu	Ser	Thr	Phe	Gln	Lys	
	545					550					555					560	
70	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr	Arg	Lys	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	
					565						570					575	

ES 2 590 461 T3

	Ile	Gly	Val	Arg	Gln	His	Leu	Glu	Arg	Val	Arg	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser
				580					585					590		
5	Gln	Glu	Glu	Val	Arg	His	His	Gln	Asp	Thr	Trp	Leu	Ala	Met	Pro	Ile
			595					600					605			
	Cys	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asn	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val
10		610					615					620				
	Asn	Met	Ser	Tyr	Ser	Met	Gly	Thr	Arg	Ala	Leu	Gly	Arg	Arg	Lys	Gln
	625					630					635					640
15	Ala	Gln	His	Phe	Thr	Gln	Arg	Leu	Lys	Thr	Leu	Phe	Ser	Met	Leu	Asn
				645						650					655	
	Tyr	Glu	Arg	Thr	Lys	His	Pro	His	Leu	Met	Gly	Ser	Ser	Val	Leu	Gly
				660					665					670		
20	Met	Asn	Asp	Ile	Tyr	Arg	Thr	Trp	Arg	Ala	Phe	Val	Leu	Arg	Val	Arg
			675					680					685			
	Ala	Leu	Asp	Gln	Thr	Pro	Arg	Met	Tyr	Phe	Val	Lys	Ala	Asp	Val	Thr
25		690					695					700				
	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ala	Ile	Pro	Gln	Gly	Lys	Leu	Val	Glu	Val	Val	Ala
	705					710					715					720
30	Asn	Met	Ile	Arg	His	Ser	Glu	Ser	Thr	Tyr	Cys	Ile	Arg	Gln	Tyr	Ala
				725						730					735	
	Val	Val	Arg	Arg	Asp	Ser	Gln	Gly	Gln	Val	His	Lys	Ser	Phe	Arg	Arg
				740					745					750		
35	Gln	Val	Thr	Thr	Leu	Ser	Asp	Leu	Gln	Pro	Tyr	Met	Gly	Gln	Phe	Leu
			755					760					765			
	Lys	His	Leu	Gln	Asp	Ser	Asp	Ala	Ser	Ala	Leu	Arg	Asn	Ser	Val	Val
40		770					775					780				
	Ile	Glu	Gln	Ser	Ile	Ser	Met	Asn	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Phe	Asp
	785					790					795					800
45	Phe	Phe	Leu	His	Phe	Leu	Arg	His	Ser	Val	Val	Lys	Ile	Gly	Asp	Arg
				805						810					815	
	Cys	Tyr	Thr	Gln	Cys	Gln	Gly	Ile	Pro	Gln	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Thr
				820					825					830		
50	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu	Cys	Phe	Gly	Asp	Met	Glu	Asn	Lys	Leu	Phe	Ala
			835					840					845			
	Glu	Val	Gln	Arg	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Phe	Val	Asp	Asp	Phe	Leu
55		850					855					860				
	Leu	Val	Thr	Pro	His	Leu	Asp	Gln	Ala	Lys	Thr	Phe	Leu	Ser	Thr	Leu
	865					870					875					880
60	Val	His	Gly	Val	Pro	Glu	Tyr	Gly	Cys	Met	Ile	Asn	Leu	Gln	Lys	Thr
				885						890					895	
	Val	Val	Asn	Phe	Pro	Val	Glu	Pro	Gly	Thr	Leu	Gly	Gly	Ala	Ala	Pro
				900					905					910		
65	Tyr	Gln	Leu	Pro	Ala	His	Cys	Leu	Phe	Pro	Trp	Cys	Gly	Leu	Leu	Leu
			915					920					925			
	Asp	Thr	Gln	Thr	Leu	Glu	Val	Phe	Cys	Asp	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Ala	Gln
70		930					935					940				
	Thr	Ser	Ile	Lys	Thr	Ser	Leu	Thr	Phe	Gln	Ser	Val	Phe	Lys	Ala	Gly

ES 2 590 461 T3

	945	950	955	960	
	Lys Thr Met Arg	Asn Lys Leu Leu Ser Val Leu Arg Leu Lys Cys His			
		965	970	975	
5	Gly Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln Thr Val Cys Ile	980	985	990	
10	Asn Ile Tyr Lys Ile Phe Leu Leu Gln Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys	995	1000	1005	
	Val Ile Gln Leu Pro Phe Asp Gln Arg Val Arg Lys Asn Leu Thr Phe	1010	1015	1020	
15	Phe Leu Gly Ile Ile Ser Ser Gln Ala Ser Cys Cys Tyr Ala Ile Leu	1025	1030	1035	1040
	Lys Val Lys Asn Pro Gly Met Thr Leu Lys Ala Ser Gly Ser Phe Pro	1045	1050	1055	
20	Pro Glu Ala Ala His Trp Leu Cys Tyr Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu	1060	1065	1070	
	Ala Ala His Ser Val Ile Tyr Lys Cys Leu Leu Gly Pro Leu Arg Thr	1075	1080	1085	
25	Ala Gln Lys Leu Leu Cys Arg Lys Leu Pro Glu Ala Thr Met Thr Ile	1090	1095	1100	
30	Leu Lys Ala Ala Ala Asp Pro Ala Leu Ser Thr Asp Phe Gln Thr Ile	1105	1110	1115	1120
	Leu Asp				
35					
	<210>	7			
	<211>	21			
	<212>	DNA			
40	<213>	Secuencia artificial			
	<220>				
	<223>	Cebador			
45	<400>	7			
		ggcaccacac cttctacaat g			21
50	<210>	8			
	<211>	18			
	<212>	DNA			
	<213>	Secuencia artificial			
	<220>				
	<223>	Cebador			
55	<400>	8			
		gtggtggtga agctgtag			18
60	<210>	9			
	<211>	18			
	<212>	DNA			
	<213>	Secuencia artificial			
65	<220>				
	<223>	Cebador			
70	<400>	9			
		ggattgccac tggctccg			18

ES 2 590 461 T3

	<code><210></code>	10	
	<code><211></code>	21	
	<code><212></code>	DNA	
5	<code><213></code>	Secuencia artificial	
	<code><220></code>		
	<code><223></code>	Cebador	
10	<code><400></code>	10	
		tgctgacct cctcttgtga c	21
	<code><210></code>	11	
15	<code><211></code>	20	
	<code><212></code>	DNA	
	<code><213></code>	Secuencia artificial	
	<code><220></code>		
20	<code><223></code>	Cebador	
	<code><400></code>	11	
		cgtaccccga ttcaggtgat	20
25	<code><210></code>	12	
	<code><211></code>	22	
	<code><212></code>	DNA	
30	<code><213></code>	Secuencia artificial	
	<code><220></code>		
	<code><223></code>	Cebador	
35	<code><400></code>	12	
		ttgagcagaa gagctgctac gt	22
	<code><210></code>	13	
40	<code><211></code>	21	
	<code><212></code>	DNA	
	<code><213></code>	Secuencia artificial	
	<code><220></code>		
45	<code><223></code>	Cebador	
	<code><400></code>	13	
		ggcaaagtgg agaggatcga c	21
50	<code><210></code>	14	
	<code><211></code>	18	
	<code><212></code>	DNA	
	<code><213></code>	Secuencia artificial	
55	<code><220></code>		
	<code><223></code>	Cebador	
	<code><400></code>	14	
60		tcgtggctgt tgcgtagg	18
	<code><210></code>	15	
	<code><211></code>	19	
65	<code><212></code>	DNA	
	<code><213></code>	Secuencia artificial	
	<code><220></code>		
	<code><223></code>	Cebador	
70	<code><400></code>	15	
		tggccctcc gtatcttac	19

ES 2 590 461 T3

5 <210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 16
 atcttagagg ccacgaacat gc 22

15 <210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

25 <400> 17
 cagcctactg gagatcagga tga 23

30 <210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador

<400> 18
 ggagtccttg gatgagtctc ga 22

40 <210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

<400> 19
 gcgaactcac acaggcgaga aacc 24

50 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador

60 <400> 20
 tcgcttctc ttctccgac aca 23

65 <210> 21
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

70 <220>
 <223> Cebador

<400> 21

ES 2 590 461 T3

cccattgcc ctgctcctg 19

5 <210> 22
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 22
tgtgtccgcc ggtgtctgg 19

15

REIVINDICACIONES

1. Un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) para uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno relacionado con la edad en un adulto sin el uso concomitante de un supresor de cáncer, en el que
 - 5 el tratamiento no aumenta de manera significativa la incidencia de cáncer en el sujeto,
 - el vector de ácido nucleico es un vector no integrativo y dirigido a tejidos post-mitóticos,
 - el adulto es un humano,
 - y
 - 10 el trastorno relacionado con la edad es seleccionado del grupo de osteoporosis, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, pérdida de memoria y pérdida de la coordinación neuromuscular, o combinaciones de los mismos.
2. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tratamiento o la
 - 15 administración preventiva del vector produce un aumento en la esperanza de vida.
3. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo la reivindicación 1 o 2, en el que el vector se usa en un
 - 20 método de terapia génica.
4. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el
 - 25 que la TERT está codificada por la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, o por un fragmento activo o equivalente funcional del mismo que codifica un polipéptido que tiene actividad de TERT.
5. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el equivalente
 - 30 funcional es un ácido nucleico que tiene al menos 80%, 90%, 95%, 99% o más identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3.
6. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
 - 35 en el que la TERT comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos como la indicada en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, o es un fragmento activo o equivalente funcional del mismo que tiene actividad de TERT.
7. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el equivalente
 - 40 funcional es un polipéptido que tiene al menos 80%, 90%, 95%, 99% o más identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4.
8. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
 - 45 en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la TERT está operativamente unida a una secuencia reguladora que dirige la expresión de la secuencia codificante.
9. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
 - 50 en el que el vector es un vector no integrativo basado en un virus adeno-asociado.
10. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
 - 55 en el que el vector es un vector basado en un virus adeno-asociado derivado de un virus adeno-asociado del serotipo 9 (AAV9).
11. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
 - 60 en el que la cápsida del vector basado en un virus adeno-asociado está hecha de proteínas de la cápsida del virus adeno-asociado del serotipo 9 (AAV9), y la secuencia de ácido nucleico contenida en la cápsida está flanqueada en ambos extremos por las repeticiones terminales internas que corresponden a virus adeno-asociados del serotipo 2.
12. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
 - 65 en el que el ácido nucleico contenido en la cápsida comprende un fragmento que codifica la secuencia de aminoácidos que codifica TERT.
13. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
 - 70 en el que la secuencia reguladora es un promotor constitutivo.
14. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
 - 75 en el que la secuencia reguladora es el promotor de citomegalovirus (CMV).
15. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
 - 80 en el que el adulto es un individuo humano de al menos 20 años de edad o de al menos 25 años de edad.
16. Un vector de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el tratamiento o la
 - 85 prevención del trastorno relacionado con la edad comienza a los 40, 45, 50,60 años de edad o más.

Fig. 1A:

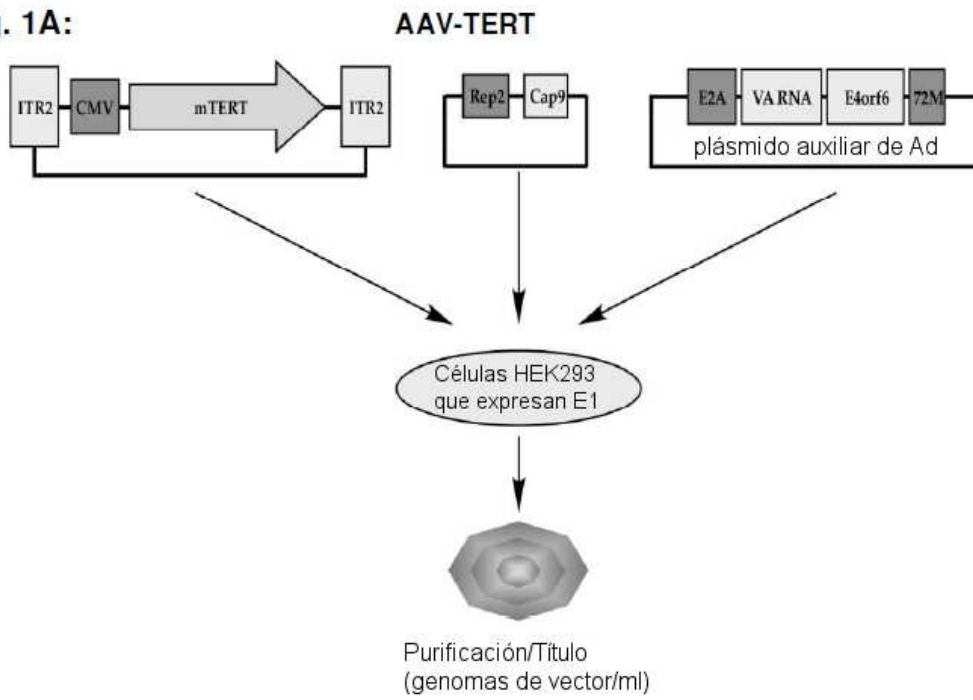
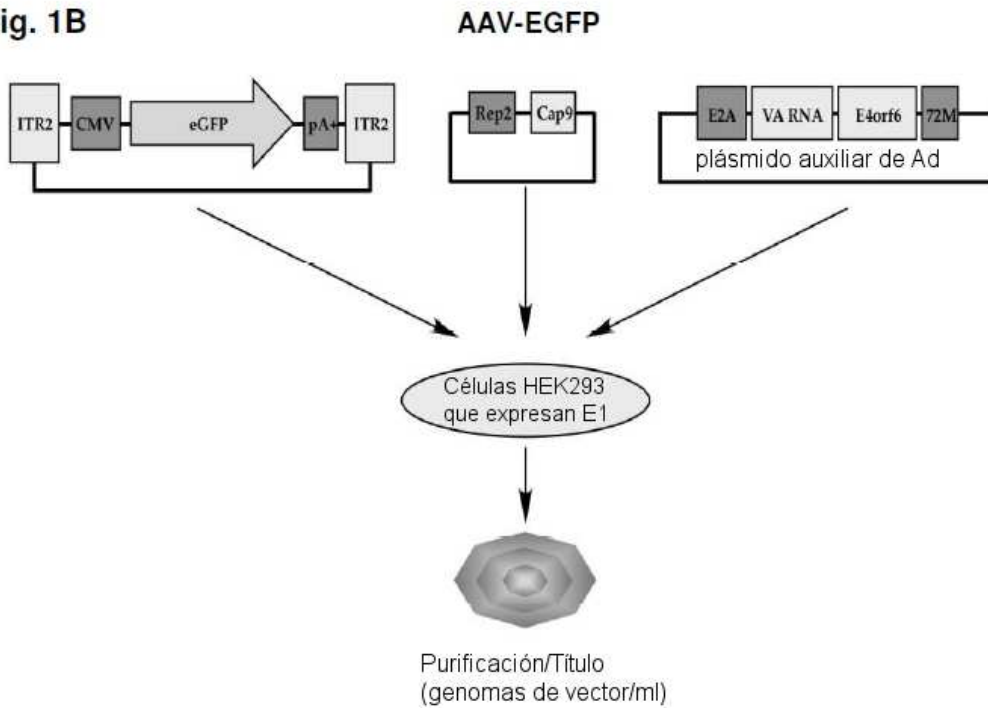


Fig. 1B



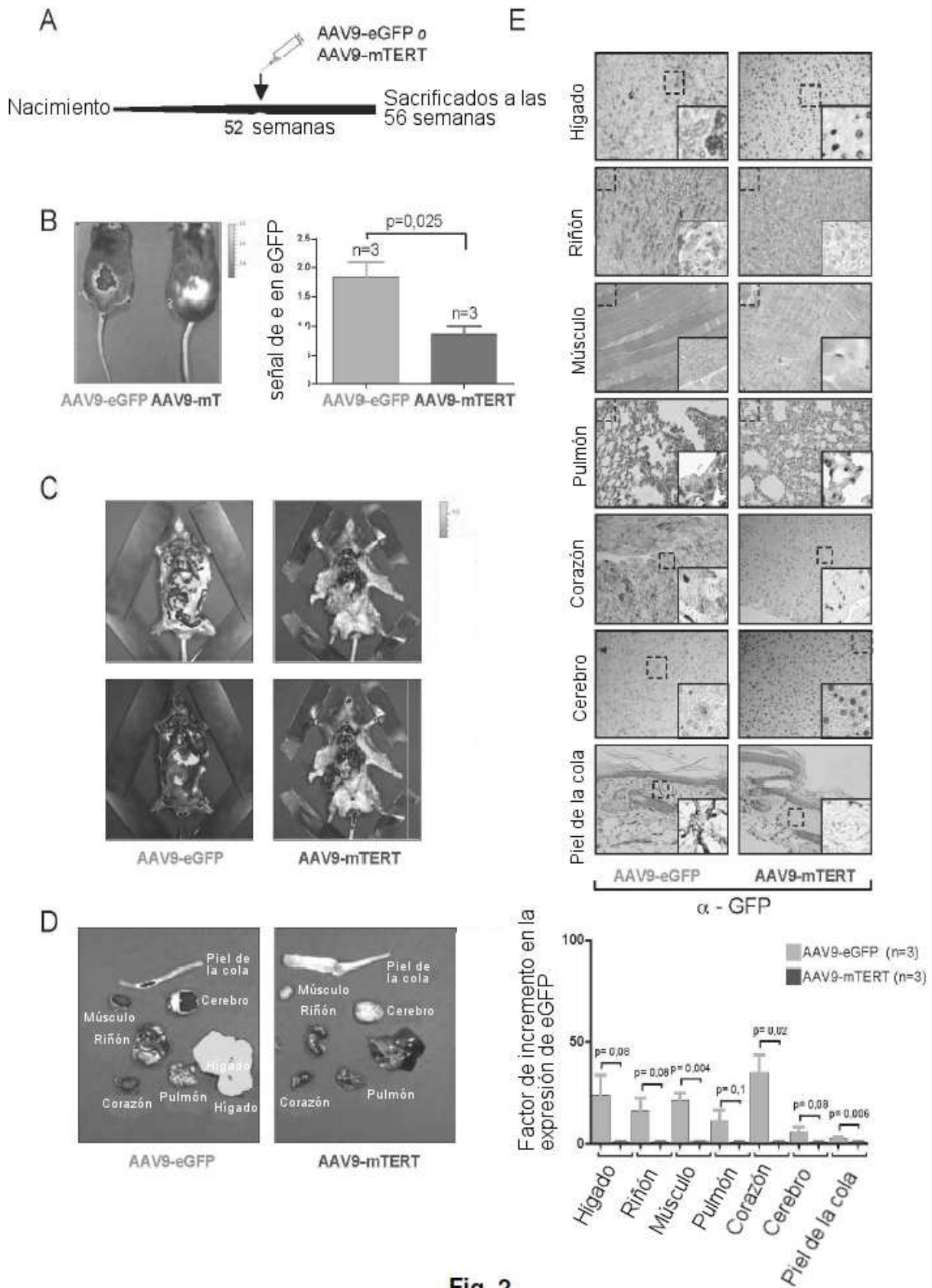


Fig. 2

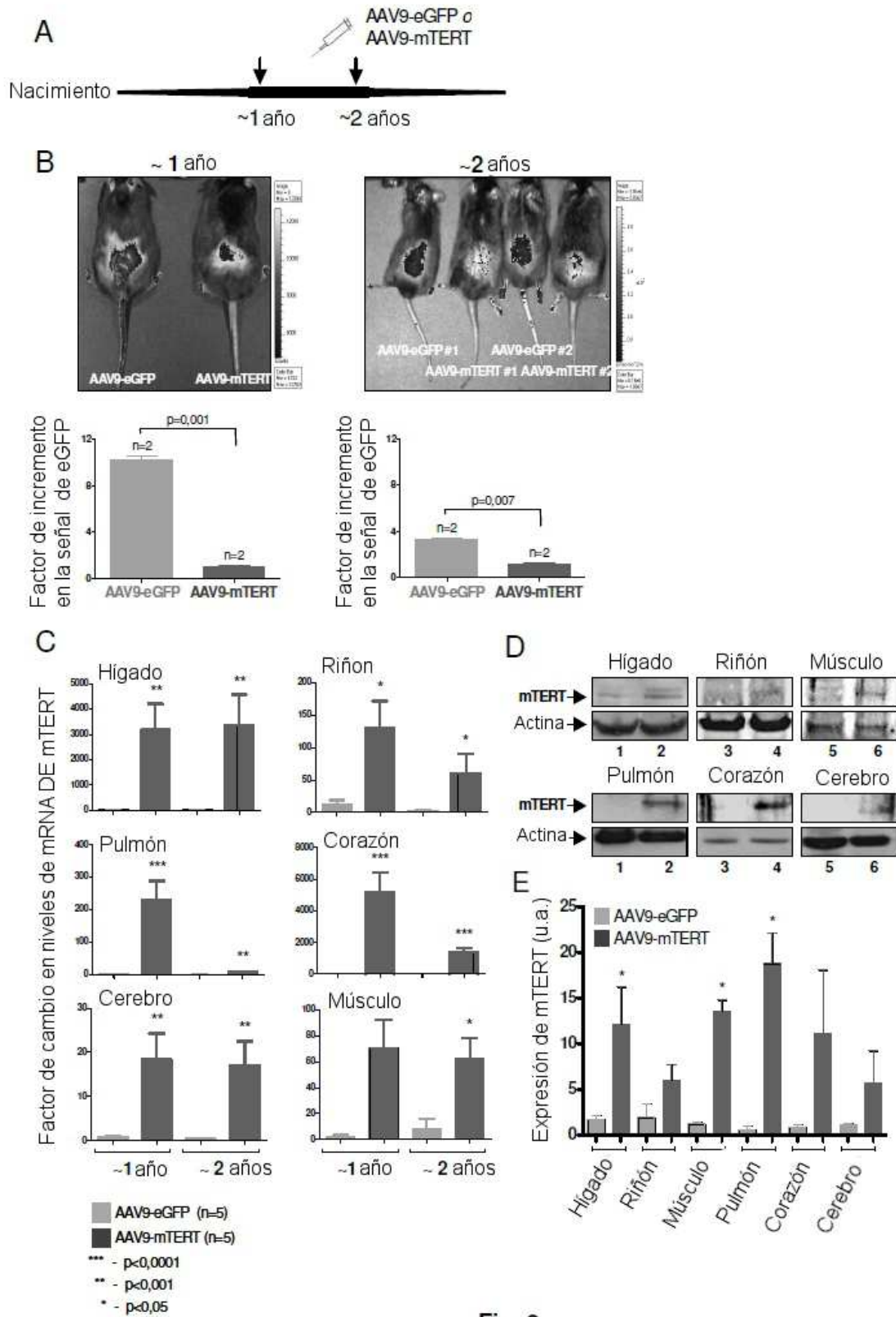
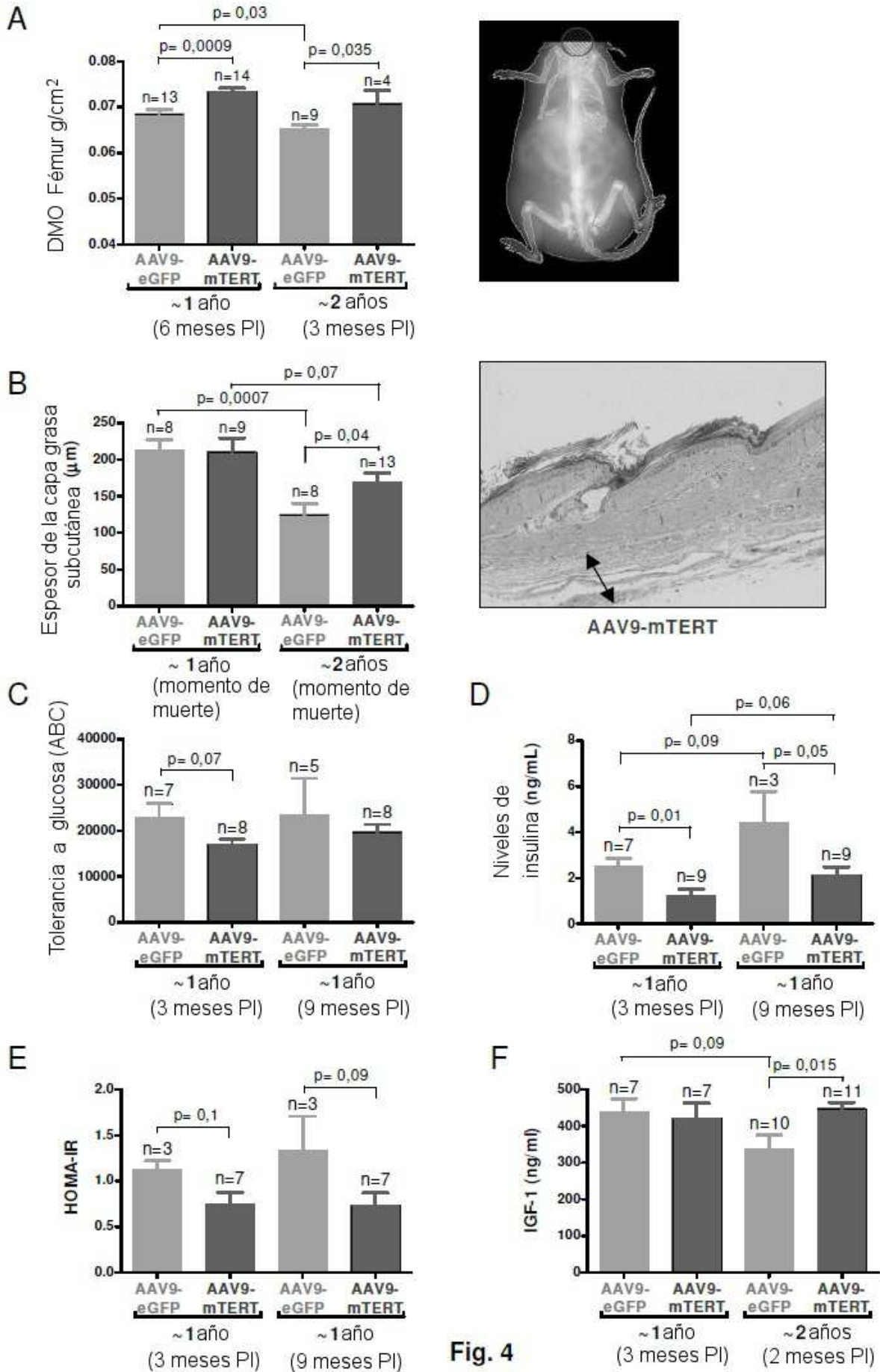


Fig. 3



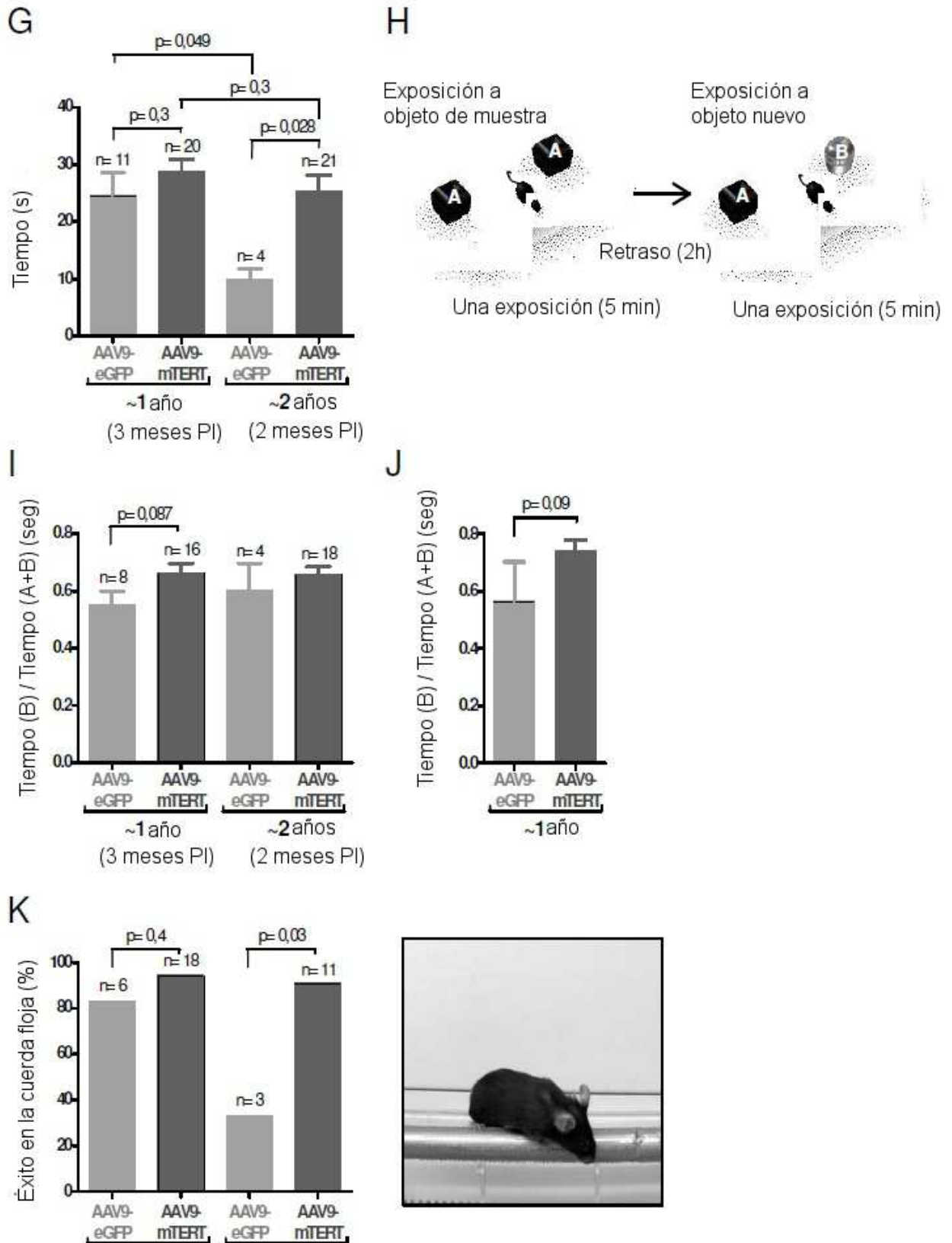
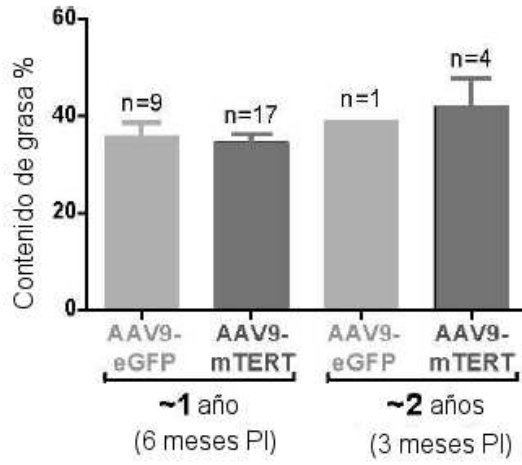


Fig. 4 (cont.)

A



B

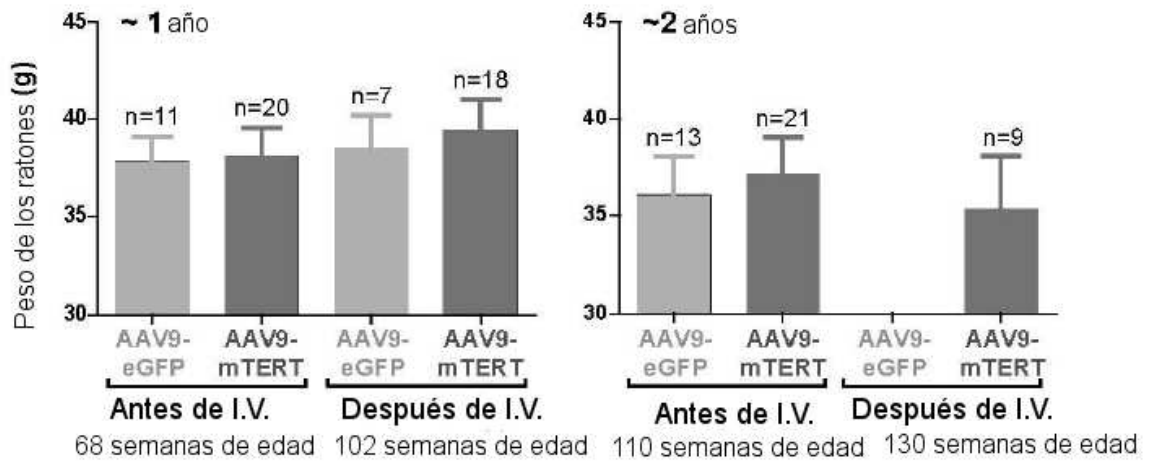


Fig. 5

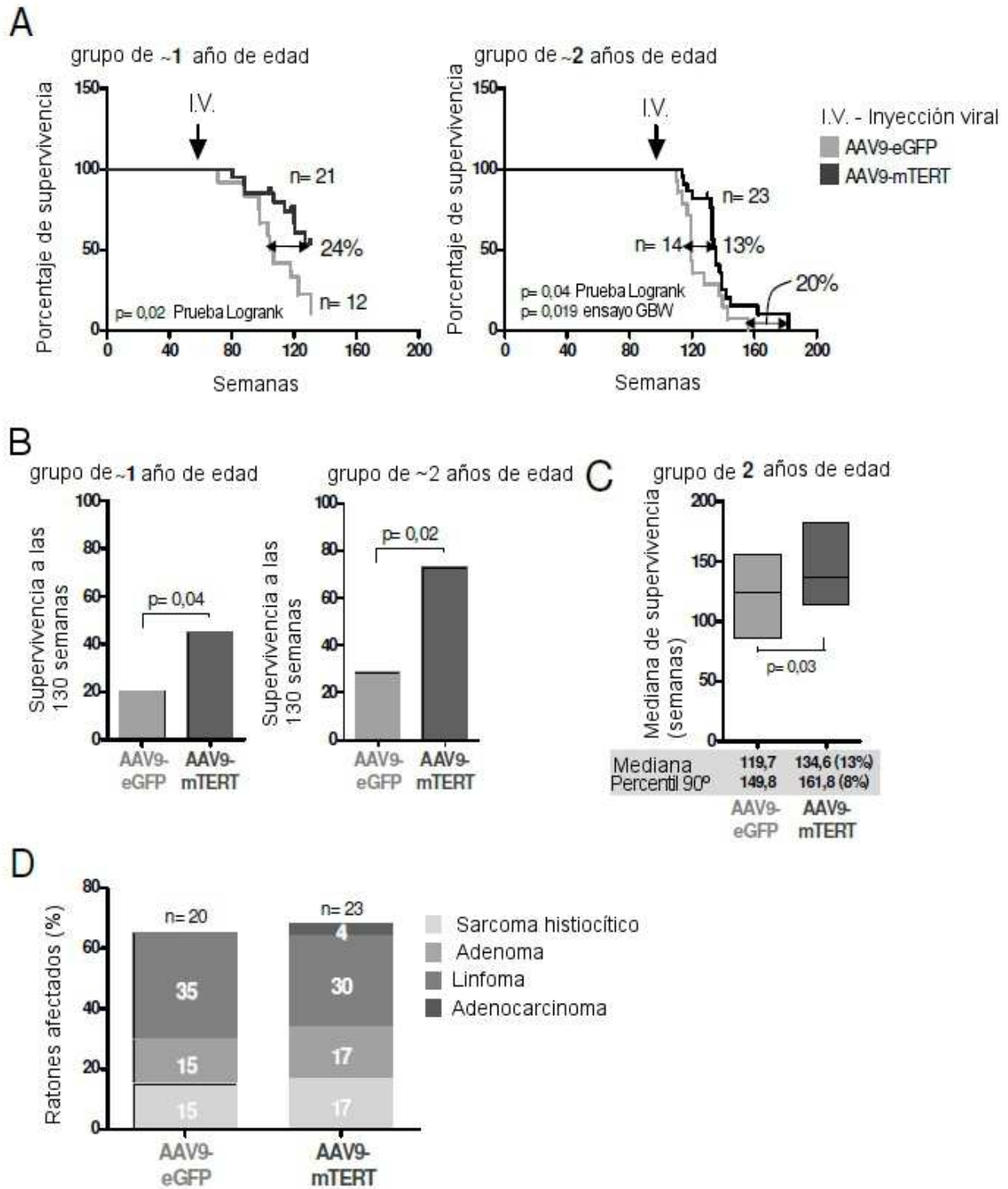
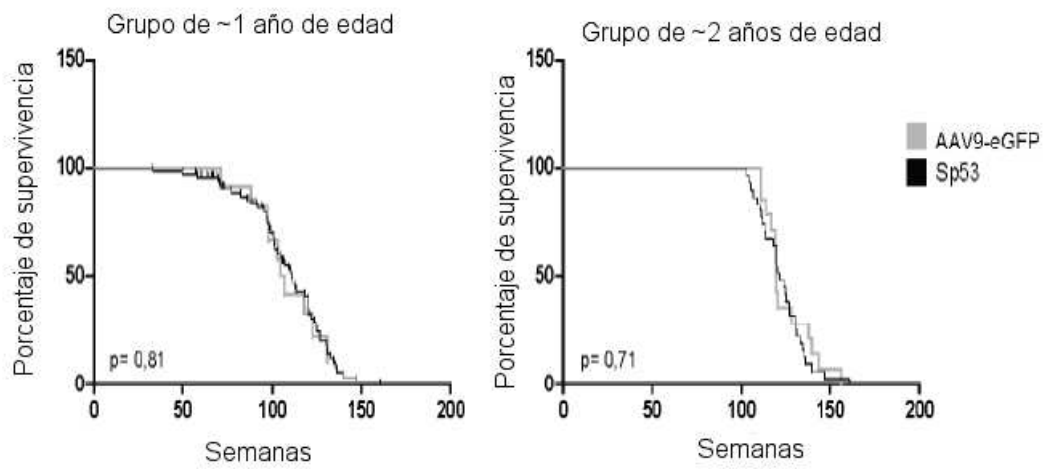
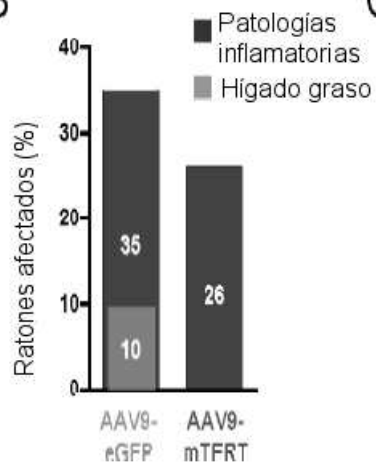


Fig. 6

A



B



C

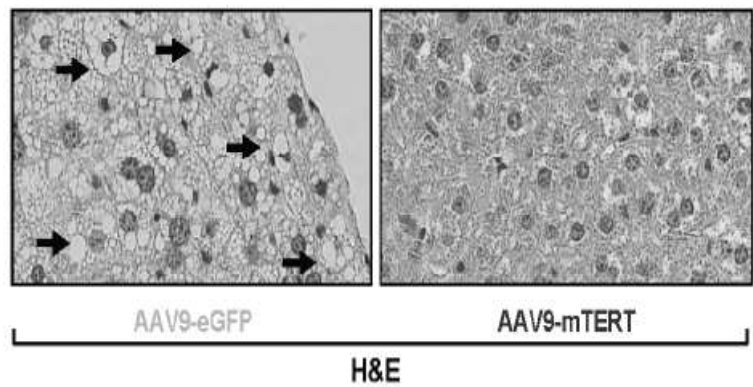


Fig. 7

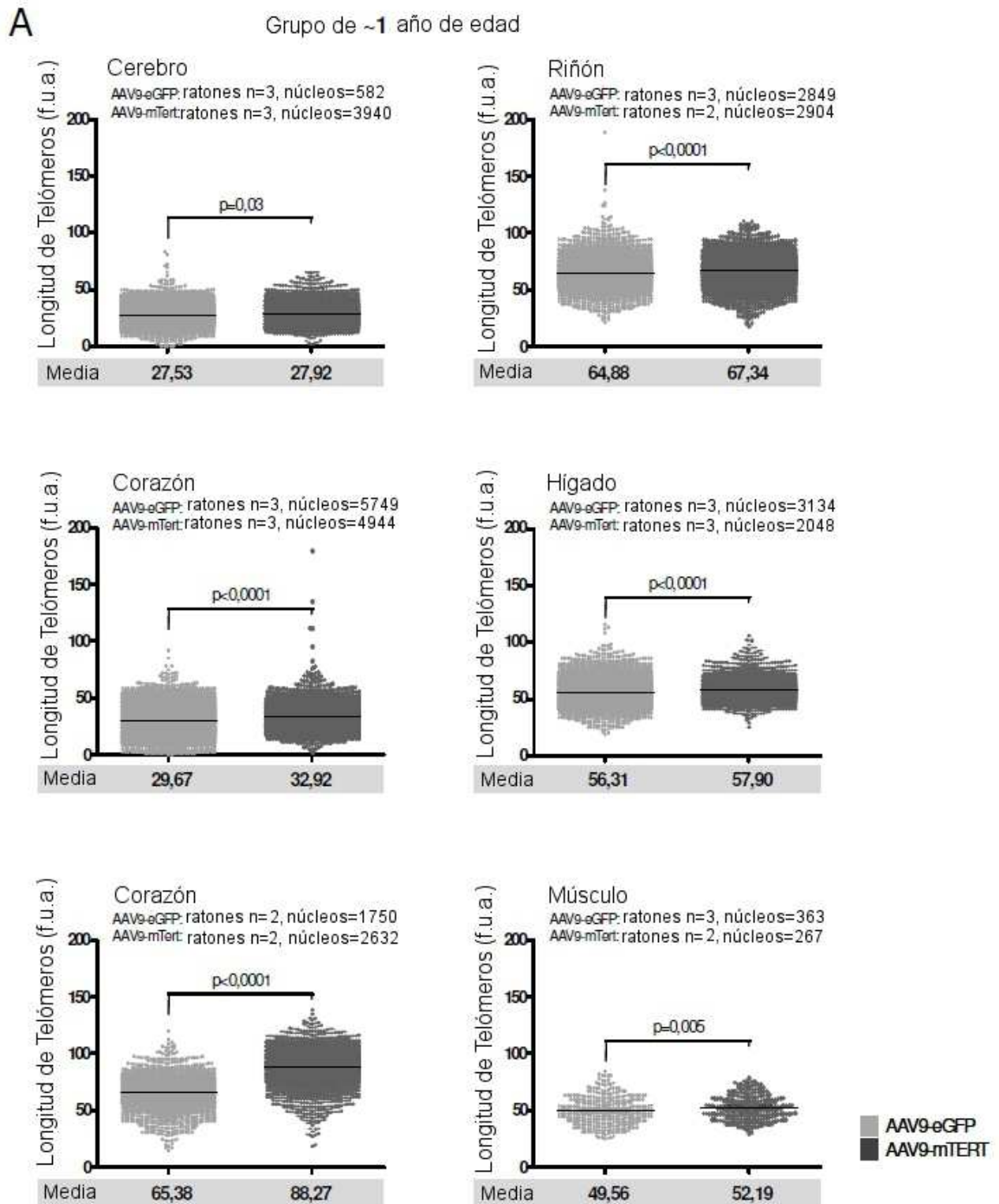


Fig. 8

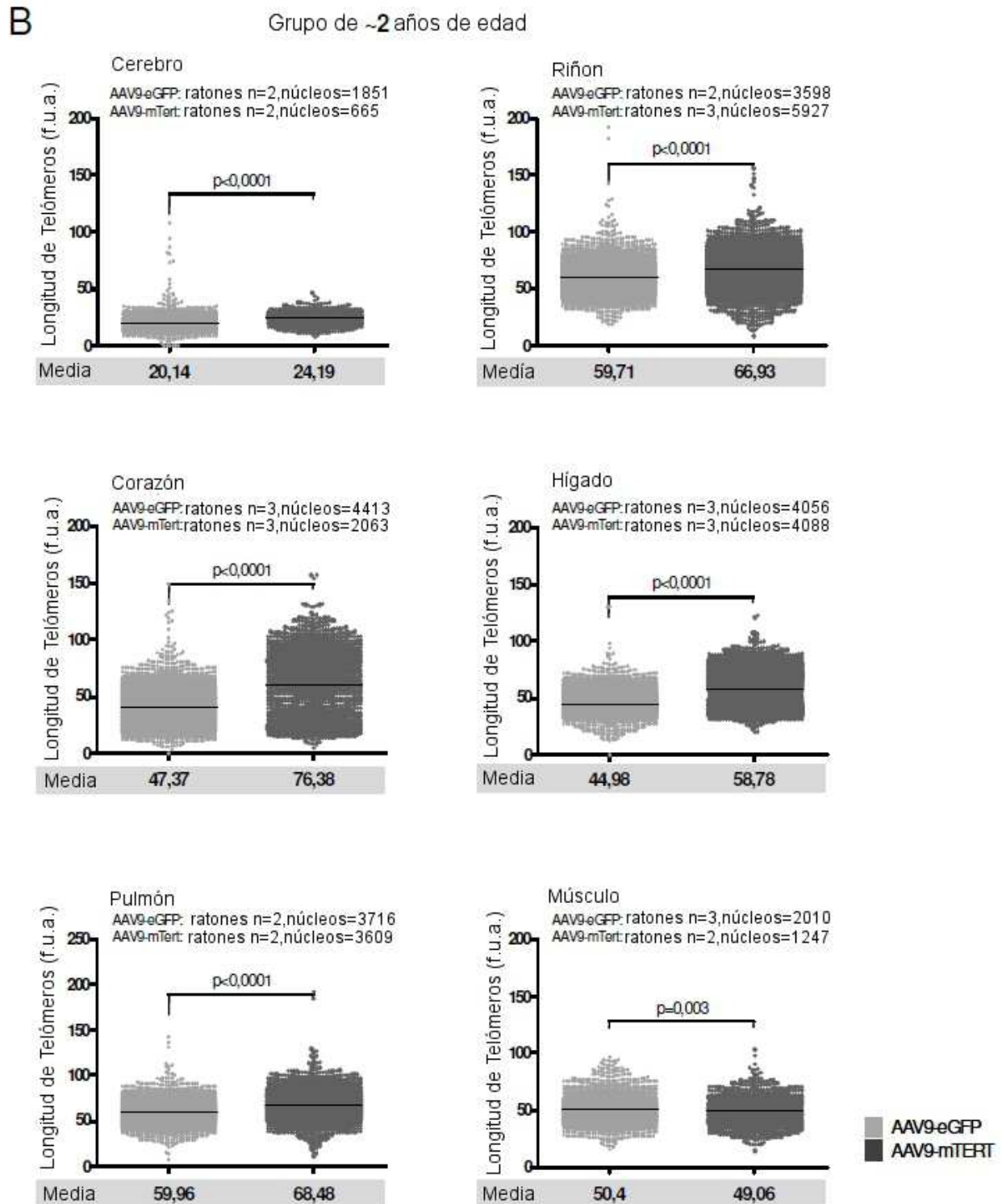


Fig. 8 (cont.)

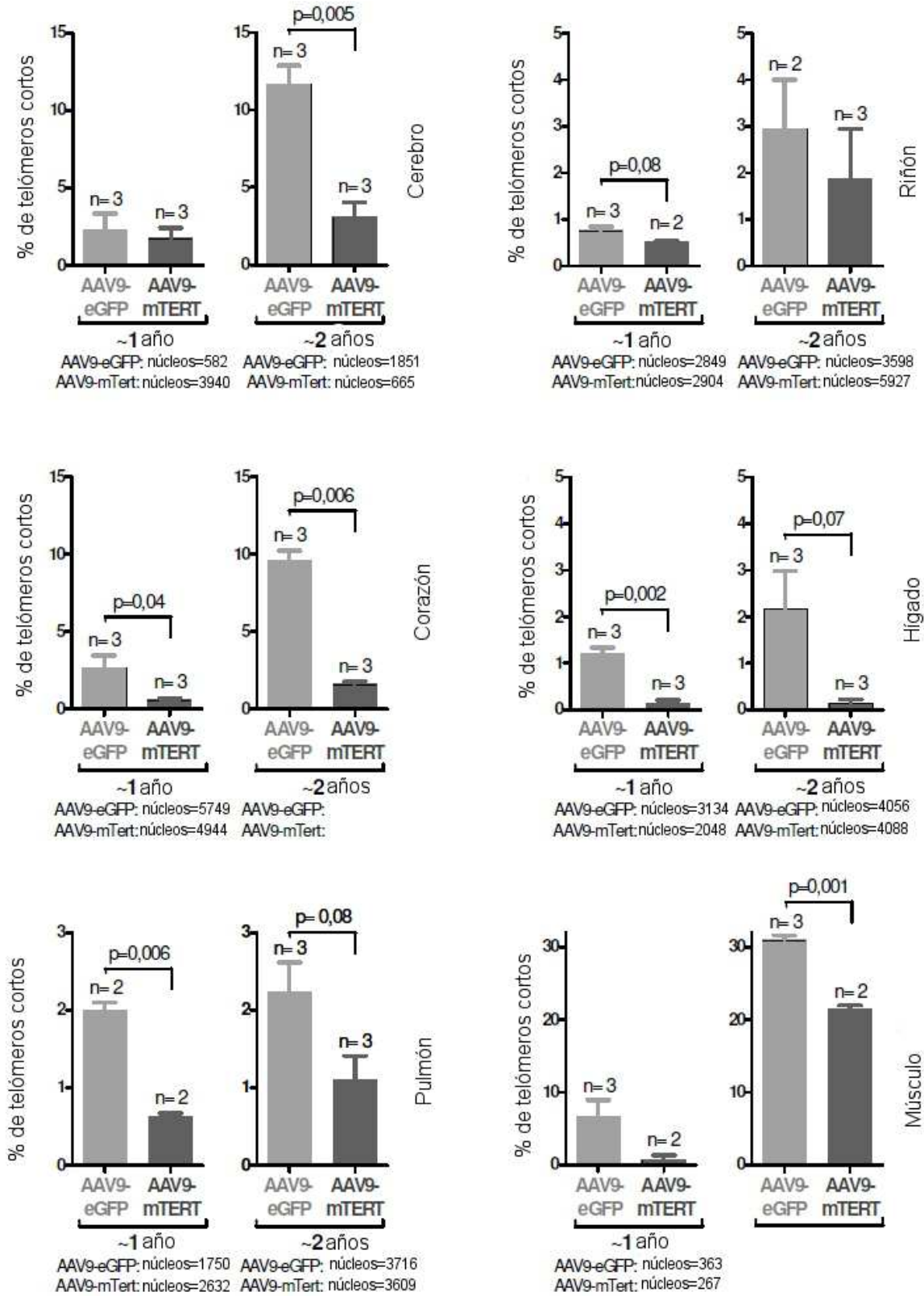


Fig. 8 (cont.)

D

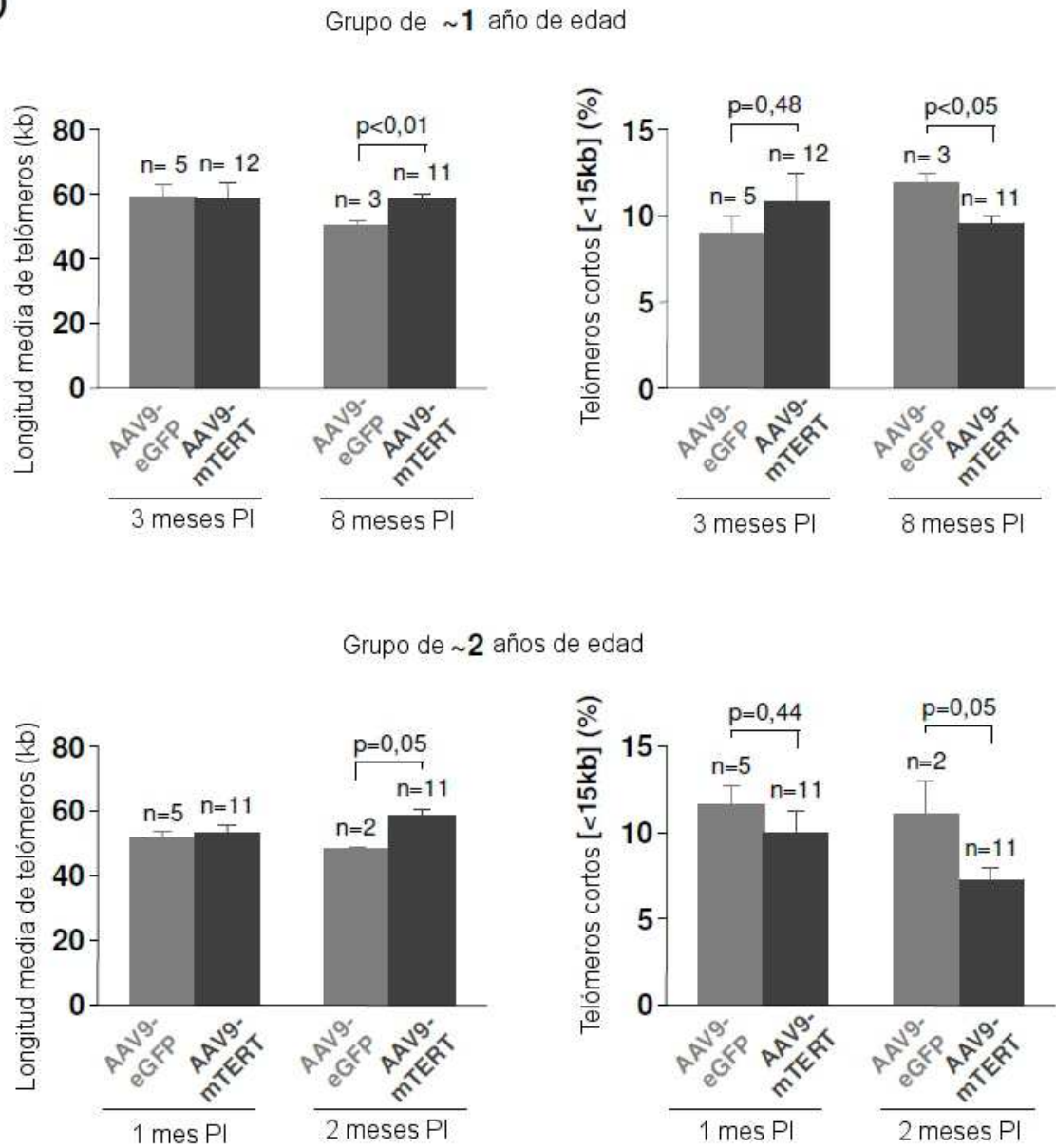
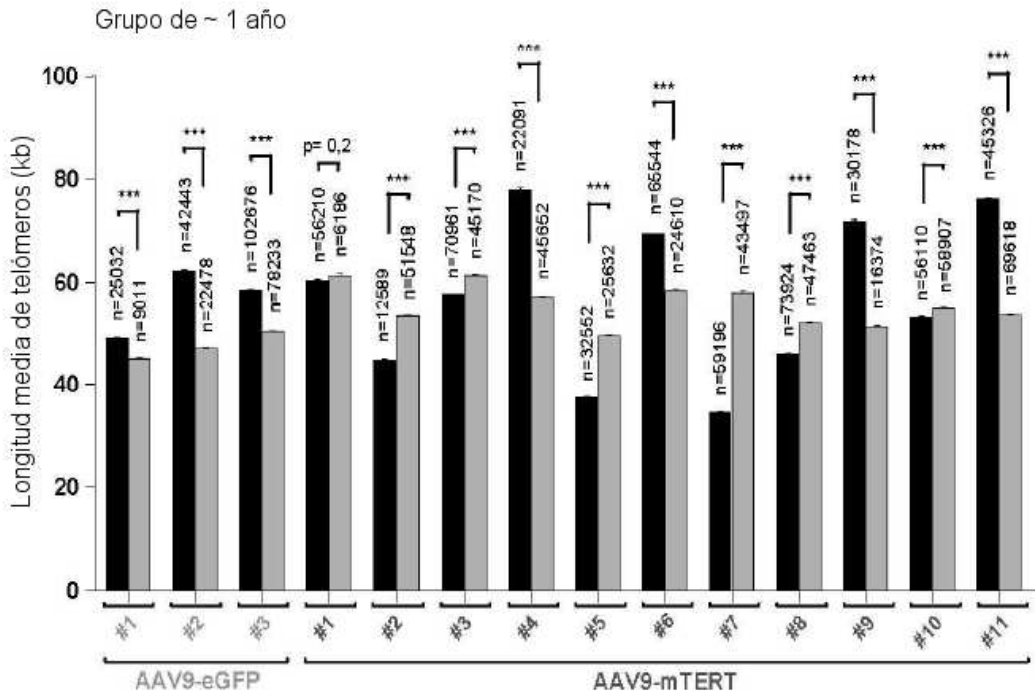
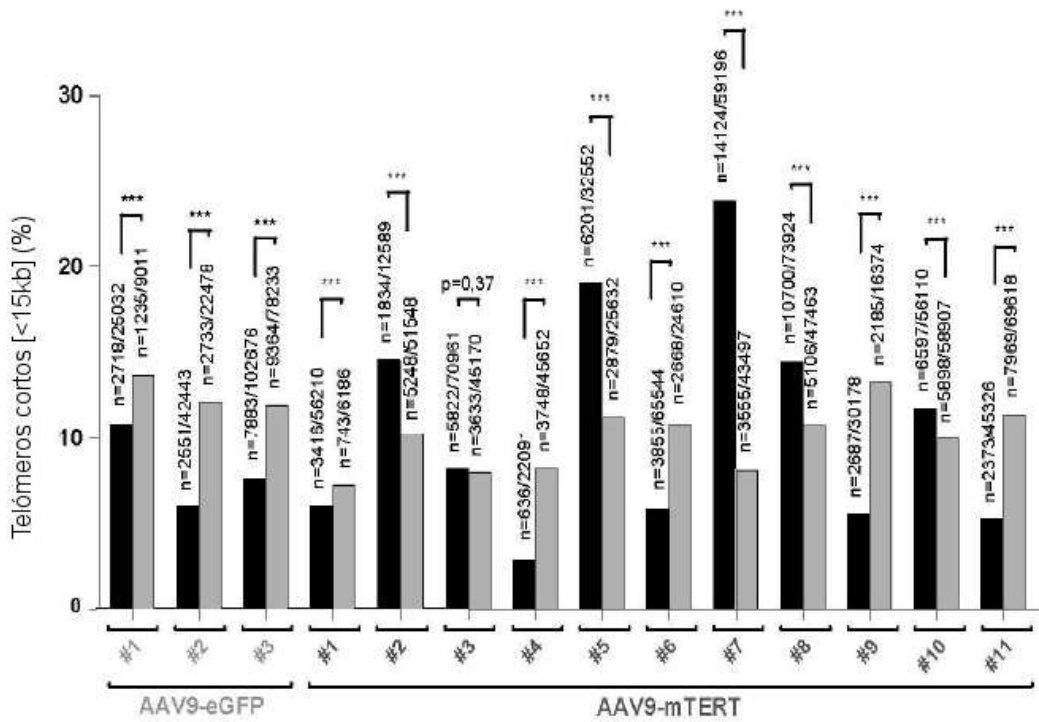


Fig. 8 (cont.)

A



B



3 meses post-inyección
 8 meses post-inyección
 *** - p<0,0001

Fig. 9

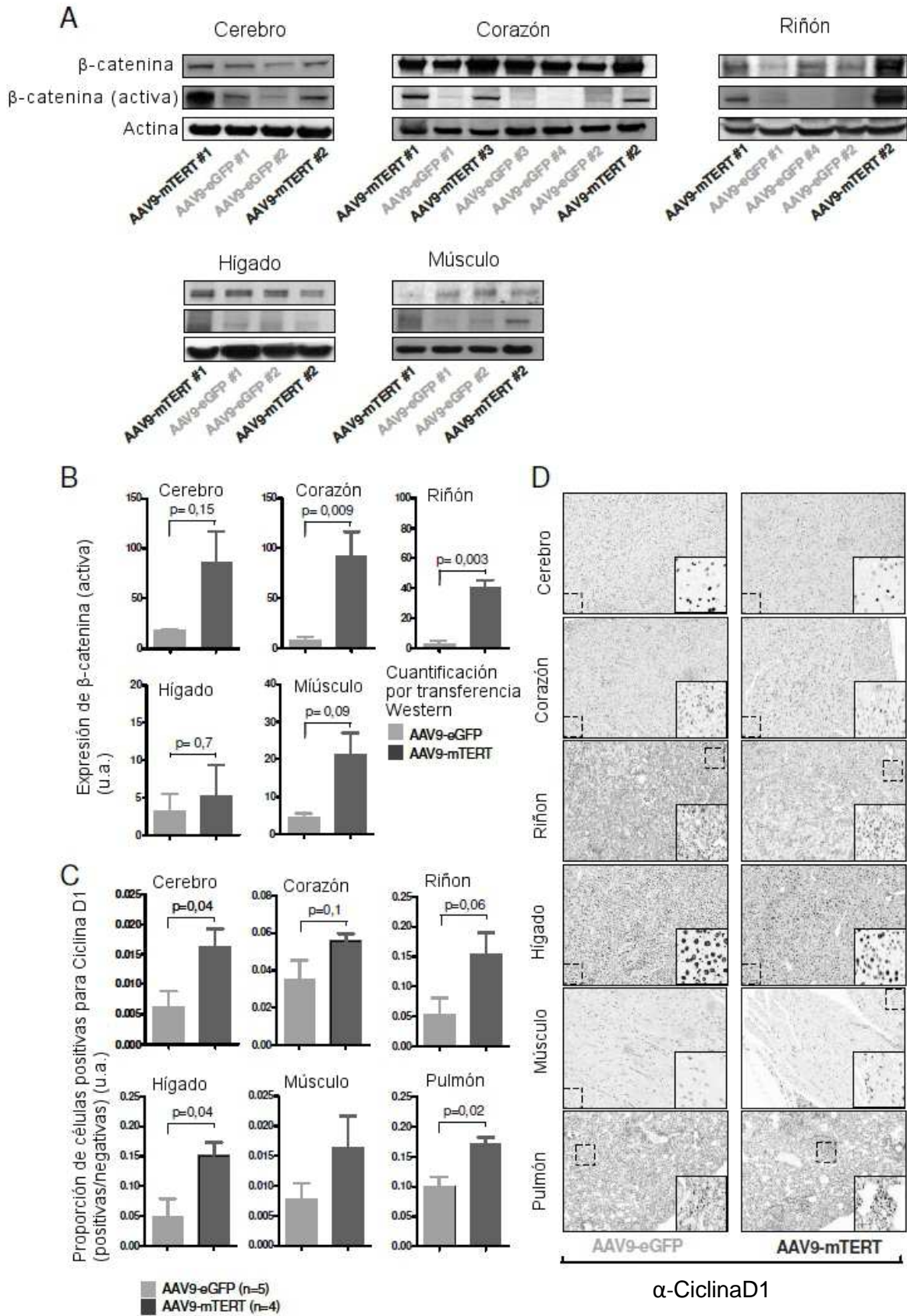


Fig. 10

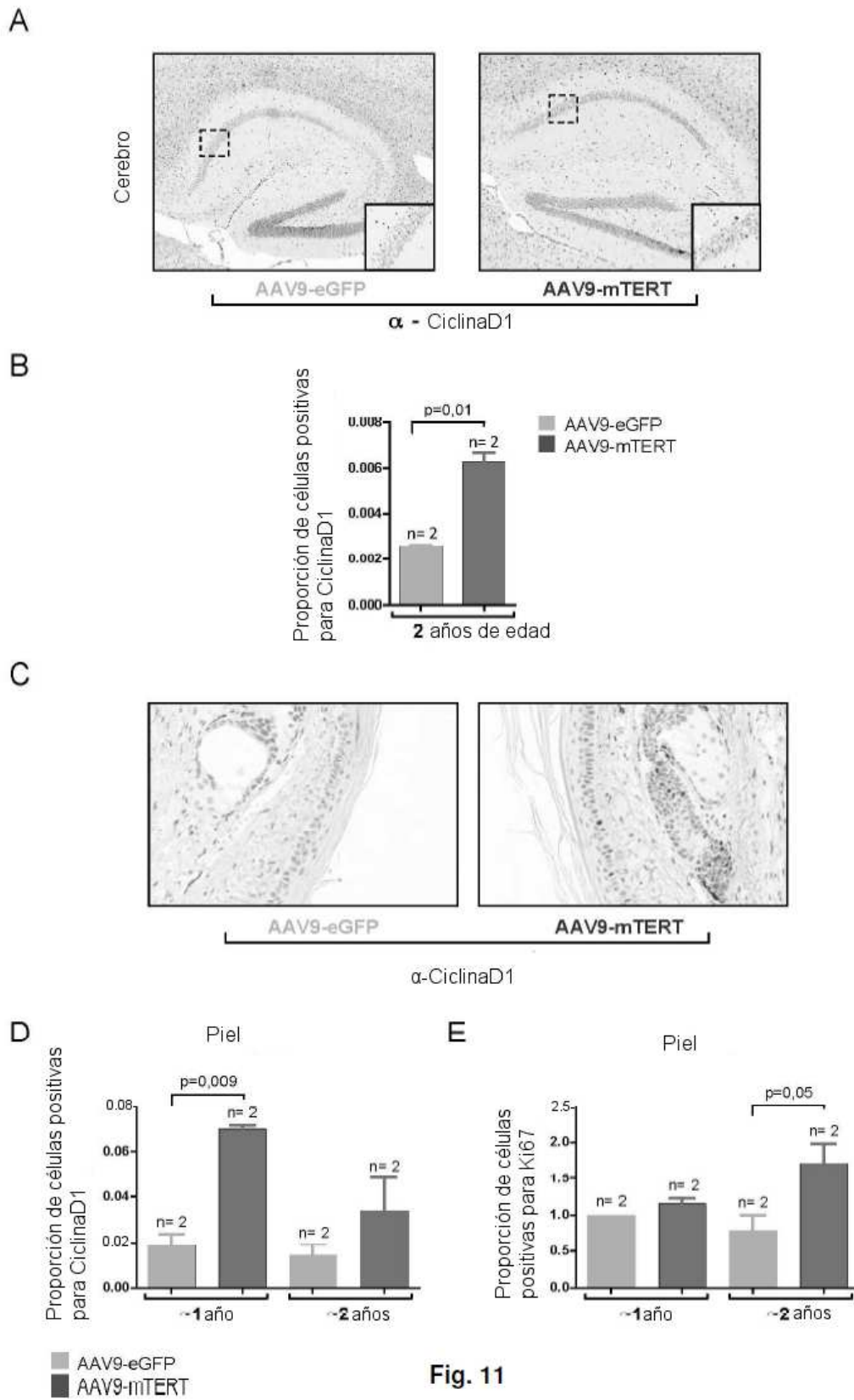
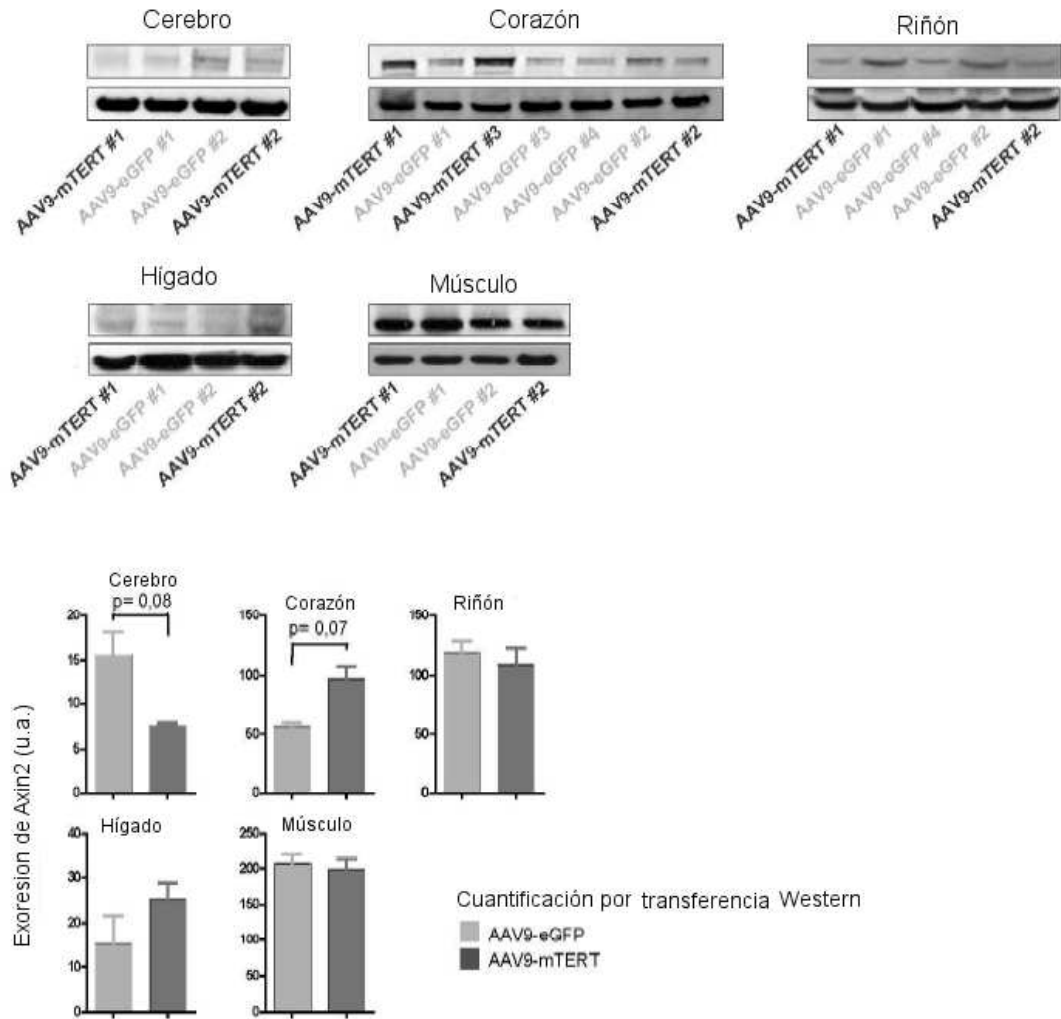


Fig. 11

A



B

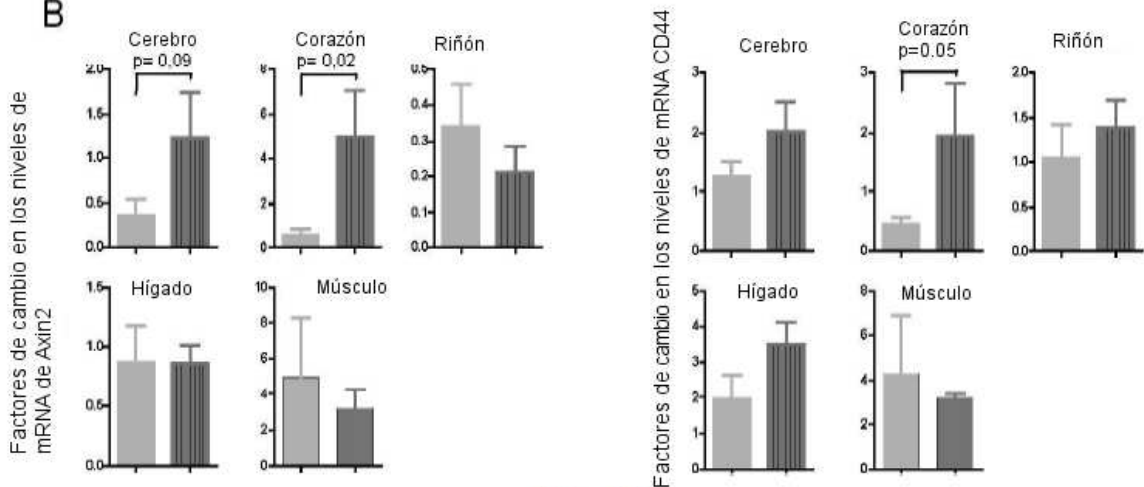
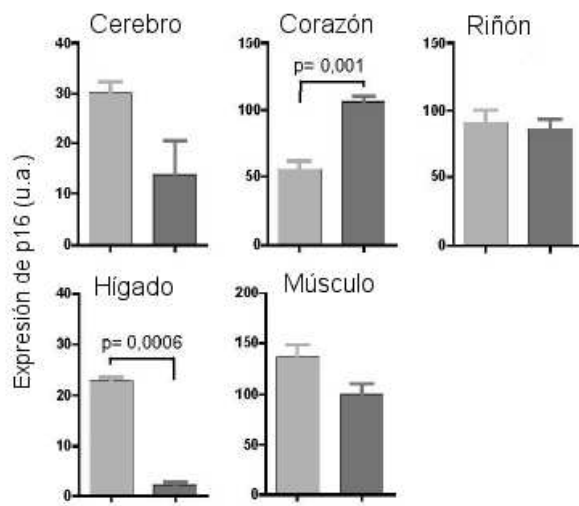
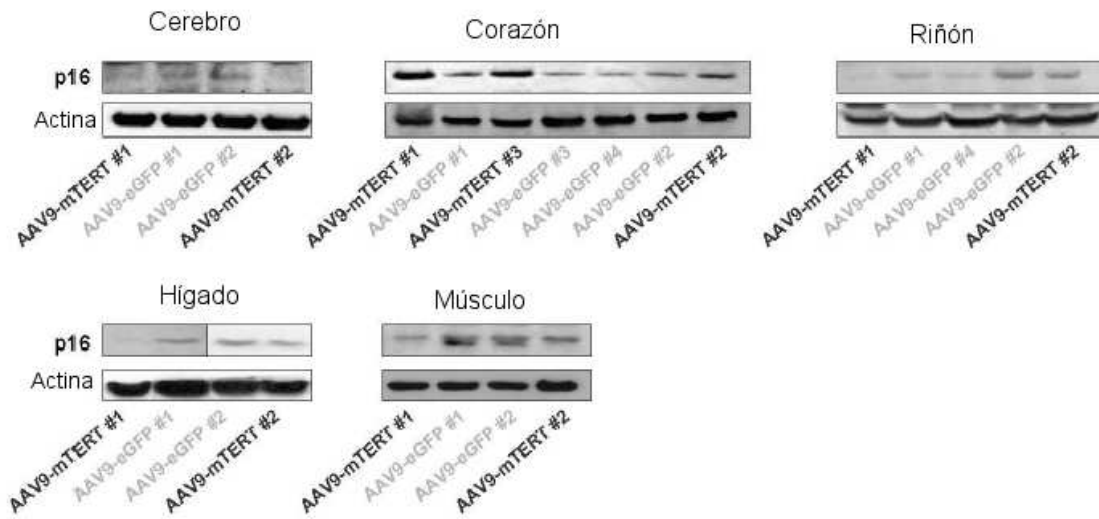


Fig. 12

C



D

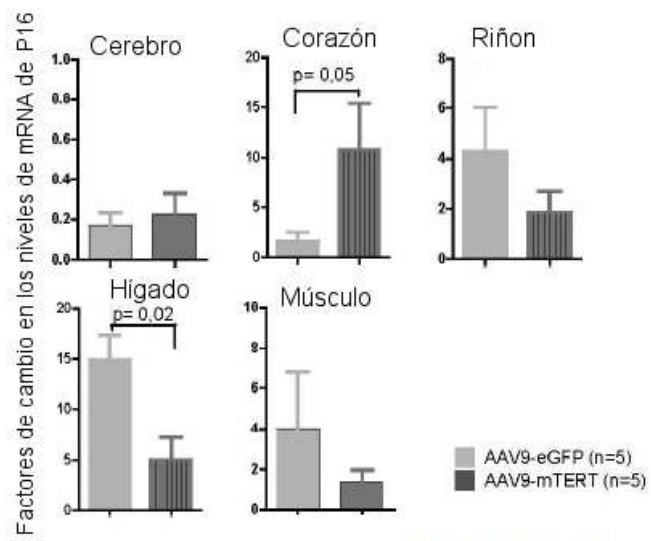


Fig. 12 (cont.)