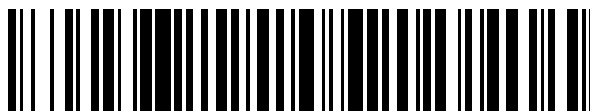


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 872**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2015 PCT/EP2015/067874**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16020345**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2015 E 15744254 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3193943**

54 Título: **Terapias basadas en la transcriptasa inversa de la telomerasa**

30 Prioridad:

08.08.2014 EP 14382312

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

06.11.2019

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN DEL SECTOR PÚBLICO ESTATAL
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
ONCOLÓGICAS CARLOS III (F.S.P. CNIO) (50.0%)
C/ Melchor Fernandez Almagro, 3
28029 Madrid, ES y
UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**BOBADILLA, MARIA;
FORMENTINI, IVAN;
BLASCO MARHUENDA, MARÍA ANTONIA;
BAER, CHRISTIAN y
BOSCH I TUBERT, FÀTIMA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 729 872 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

Terapias basadas en la transcriptasa inversa de la telomerasa

Campo de la invención

5 Esta invención se inscribe dentro del campo de la biología molecular, la biotecnología y la medicina. Más particularmente, se refiere a composiciones y métodos útiles para el tratamiento de afecciones asociadas con una longitud de telómeros corta. Más particularmente, se refiere a composiciones y métodos útiles para el tratamiento de afecciones asociadas con la anemia aplásica.

Antecedentes de la invención

10 Los telómeros son estructuras especializadas de los extremos de los cromosomas, que tienen un papel de protección de los extremos de los cromosomas de las actividades de reparación y degradación del ADN (Blackburn, 2001. Cell 106, 661-673; de Lange, 2005. Genes Dev. 19, 2100- 2110). Los telómeros de mamíferos consisten en repeticiones de TTAGGG unidas por un complejo multiproteico conocido como shelterina (de Lange, 2005. Genes Dev. 19, 2100-2110). Para la protección de los telómeros se necesita una longitud mínima de repeticiones de TTAGGG y la integridad del complejo de la shelterina (Blackburn, 2001. Cell 106, 661-673; de Lange, 2005. Genes Dev. 19, 2100-2110). La telomerasa es una transcriptasa inversa celular (TERT, transcriptasa inversa de la telomerasa; también conocida como TP2; TRT; EST2; TCS1; hEST2) capaz de compensar el desgaste del telómero mediante la adición *de novo* de repeticiones de TTAGGG en los extremos del cromosoma utilizando un componente de ARN asociado como plantilla (Terc, componente de ARN de la telomerasa) (Greider y Blackburn, 1985. Cell 43, 405-413). La telomerasa se expresa en la mayoría de los compartimentos de células madre adultas, 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).

25 Los ratones portadores de delección homocigótica para el gen TERC (el componente de ARN de la telomerasa) carecen de cualquier actividad de telomerasa detectable y mostraron un acortamiento progresivo de los telómeros de una generación a la otra con una tasa comparable a la tasa reportada en las células humanas (Blasco et al., 1997). Los fenotipos típicos graves de ratones TERC - / - de generación tardía (por ejemplo, aplasia de la médula ósea y signos de envejecimiento prematuro) se podrían rescatar reintroduciendo una copia del gen TERC (Samper et al., 2001). La degeneración tisular múltiple que surgió en generaciones posteriores en un modelo de ratón condicional defectuoso para TERT (la subunidad catalítica de la telomerasa) se pudieron revertir con la reactivación de la telomerasa incluso en ratones de edad avanzada (Jaskelioff et al., 2011).

35 En el contexto de los ratones de tipo salvaje, la introducción de una copia adicional del gen de la telomerasa, que se expresa en una amplia gama de tejidos epiteliales, condujo a un aumento de la capacidad de curación de las heridas de la piel (Gonzalez-Suarez et al., 2001). Cuando este alelo se introdujo en un fondo genético resistente a los tumores (Sp53/Sp16/SArf), se observó una notable demora del envejecimiento en concierto con un incremento del 40% en la mediana de la vida útil en comparación con los ratones que no expresaban el transgén de la telomerasa (Tomas-Loba et al., 2008). El documento EP2402038A1 divulga un vector de ácido nucleico, en concreto un vector basado en el AAV9, que comprende una secuencia codificante de TERT para uso en el tratamiento de alteraciones relacionadas con la edad mediante la disminución de la incidencia de la osteoporosis relacionada con la edad y la tolerancia a la insulina y mejorando el buen estado de los órganos y la duración de la salud. Se descubrió que la terapia génica con la telomerasa basada en virus (AAV) es beneficiosa para extender el período de duración de la salud, en el contexto del envejecimiento fisiológico normal en ratones de tipo salvaje. En el estudio en el que se examinó este beneficio, se sometieron a terapia génica con AAV9-mTERT ratones adultos y de edad avanzada, para expresar ampliamente la subunidad catalítica de la telomerasa de ratón (mTERT). El período de duración de la salud de los ratones tratados con TERT aumentó significativamente y el envejecimiento se desaceleró, tal como lo indicaron varios parámetros fisiológicos (tolerancia a la insulina y la glucosa, osteoporosis, coordinación neuromuscular, ensayos en el cilindro rotatorio, etc.). Además, su promedio de duración de la vida, en comparación con los grupos de control, aumentó en un 24% y un 13% en ratones adultos y viejos, respectivamente. Una sola administración intravenosa de AAV9-TERT en ratones adultos produjo un aumento en la longitud de los telómeros en células de sangre periférica (Bernardes de Jesus et al., 2012).

50 Los telómeros acortados se han asociado con numerosas enfermedades, como la disqueratosis congénita, anemia aplásica, síndrome mielodisplásico y anemia de Fanconi. Dada la gravedad de estas enfermedades y el mal pronóstico de los pacientes que las padecen, existe la necesidad de terapias novedosas para tratar enfermedades asociadas con la longitud corta de los telómeros.

55 La anemia aplásica es un trastorno de la sangre poco frecuente, heterogéneo y potencialmente mortal, en el cual la médula ósea no puede producir células sanguíneas nuevas de forma suficiente debido a una marcada reducción de las células madre hematopoyéticas inmaduras (HSC) y de las células progenitoras (Scopes et al., 1994, Maciejewski et al., 1994). En consecuencia, las principales manifestaciones de la enfermedad son pancitopenia e hipoplasia medular que pueden surgir en cualquier etapa de la vida, pero que son más frecuentes en personas jóvenes (10-25

años de edad) y ancianos (> 60 años) (Marsh et al., 2009). La anemia aplásica se puede adquirir o heredar. El tipo adquirido está mediado principalmente por autoinmunidad, pero también puede desencadenarse por factores ambientales como la exposición a la radiación, a toxinas y a virus (Nakao, 1997). La forma congénita es más rara, pero, sin embargo, se han identificado hasta la fecha mutaciones en más de 30 genes con funciones en la reparación del ADN, la biogénesis de los ribosomas y las rutas de mantenimiento de los telómeros (Dokal y Vulliamy, 2010). Se ha informado de la presencia de mutaciones en TERT en los pacientes con anemia aplásica (Yamaguchi et al., 2005). Un rasgo clínico frecuentemente observado de la anemia aplásica es la corta longitud de los telómeros en los leucocitos de sangre periférica, incluso en ausencia de mutaciones en la maquinaria de mantenimiento de los telómeros.

Los telómeros, los extremos de los cromosomas de los vertebrados, son estructuras nucleoproteicas altamente especializadas compuestas de secuencias de repeticiones en tándem de hexanucleótidos (TTAGGG) que están unidas por un complejo de seis proteínas (*TRF1*, *TRF2*, *TIN2*, *RAP1*, *TPP1* y *POT1*) denominado shelterina (Blackburn, 2001, de Lange, 2005). Estas estructuras son esenciales para la integridad de los cromosomas al prevenir las fusiones de telómeros y la fragilidad de los telómeros. La longitud de los telómeros está controlada por la enzima ribonucleoproteica telomerasa que puede, *de novo*, agregar secuencias teloméricas a los telómeros. Debido a que la secuencia telomérica se pierde naturalmente en cada división celular (lo que se conoce como el problema del final de la replicación) y las células somáticas expresan la telomerasa en niveles muy bajos o no la expresan en absoluto, los telómeros se acortan a lo largo de la vida. Cuando los telómeros se vuelven extremadamente cortos, pierden su función protectora y se desencadena una respuesta persistente al daño del ADN en los telómeros, lo que posteriormente conduce a una respuesta de senescencia celular (Harley et al., 1990, Flores et al., 2008). Las HSC, a diferencia de la mayoría de las células somáticas, muestran un bajo nivel de actividad de la telomerasa. Sin embargo, esta actividad no es suficiente para detener el desgaste del telómero y, por consiguiente, el potencial de regeneración de las células HSC puede verse limitado durante el proceso de envejecimiento (Hiyama y Hiyama, 2007). De acuerdo con esto, los receptores de trasplantes de médula ósea tienen longitudes de telómeros más cortas que sus donantes, lo que sugiere que la telomerasa no puede hacer frente al aumento de la demanda de proliferación replicativa durante la fase de injerto (Wynn et al., 1998). Además, se ha demostrado que los telómeros se acortan mucho más rápido en pacientes con anemia aplásica en comparación con el desgaste normal relacionado con el envejecimiento encontrado en individuos sanos potencialmente debido a un número de divisiones celulares más alto que lo normal (Ball et al., 1998).

El acortamiento acelerado de los telómeros debido a defectos en los componentes de los telómeros o la propia telomerasa limita prematuramente el potencial de proliferación de las células, lo que afecta particularmente la capacidad de renovación del tejido en los compartimentos de células madre (Harley et al., 1990, Flores et al., 2005). Por lo tanto, los tejidos con un alto índice de proliferación, como el sistema hematopoyético, se ven particularmente afectados por niveles de telomerasa más bajos de lo normal, que en última instancia pueden conducir a trastornos graves como la anemia aplásica (Vulliamy et al., 2002). Por ejemplo, la telomeropatía disqueratosis congénita se ha relacionado con mutaciones en 7 genes con funciones importantes en el mantenimiento de los telómeros (*TERT*, *TERC*, *DKC1*, *TIN2*, *NOP10*, *NHP2* y *TCAB1*) y se caracteriza por telómeros muy cortos. La disqueratosis congénita es un síndrome multisistémico que comprende diversas características clínicas, como distrofia ungueal, leucoplasia oral, pigmentación anormal de la piel e hipoplasia cerebelosa (Dokal, 2011). Sin embargo, la complicación más grave es el desarrollo de anemia aplásica en el 80% de los casos, lo que subraya que las características clínicas son causadas por un acortamiento excesivo de los telómeros, lo que eventualmente conduce al agotamiento de la reserva de células madre (Dokal y Vulliamy, 2010).

Se puede encontrar una revisión de la patofisiología y el tratamiento de la anemia aplásica por parte de Neal S Young y colaboradores (Young et al., 2006), revisión en la cual no se menciona un posible tratamiento con TERT. La causalidad entre el potencial de proliferación y la longitud de los telómeros sugiere que una intervención terapéutica con telomerasa, dirigida a prevenir la pérdida de telómeros más allá de una longitud críticamente corta, puede ser una estrategia factible para tratar aquellas formas de anemia aplásica asociada con una capacidad limitada de formación de sangre debido a la presencia de telómeros cortos. El documento WO2010/018731 A2 menciona el uso de un polipéptido TERT en el tratamiento de una lista de enfermedades, de las cuales la anemia aplásica es una de tales enfermedades; en dicha solicitud de patente internacional no se proporciona ningún dato experimental que apoye el uso de un polipéptido TERT contra la anemia aplásica. En este sentido, anteriormente desarrollamos una terapia génica con telomerasa (*Tert*) utilizando vectores de virus adenoasociados (AAV9). Curiosamente, la terapia génica con telomerasa usando AAV9 Tert en ratones adultos de tipo salvaje atenuó o revirtió la erosión de los telómeros asociada con el envejecimiento en monocitos de sangre periférica (Bernardes de Jesus et al., 2012), lo que sugiere que esta terapia génica puede ser eficaz en el tratamiento de trastornos hematológicos relacionados con telómeros cortos.

Para probar esta hipótesis, utilizamos nuestro modelo de anemia aplásica en ratón recientemente generado, que reproduce el fenotipo de médula ósea observado en pacientes (Beier et al., 2012). En este modelo de ratón, el agotamiento específico en la médula ósea del gen de la shelterina *Tff1* causa una pérdida grave de la cobertura del telómero y provoca una respuesta de daño al ADN que a su vez conduce a una rápida eliminación de las células HSC y progenitoras deficientes en *Tff1*. Sin embargo, en este modelo inducimos la delección de *Tff1* con una frecuencia que no se dirige al 100% de las células HSC y progenitoras. Por lo tanto, las células que conservan el *Tff1* intacto se someten a rondas adicionales de proliferación compensatoria que conducen a un rápido desgaste del telómero. De este modo, el agotamiento parcial del compartimento de las células madre y progenitoras por la delección de *Tff1*

reproduce la hiperproliferación compensatoria observada después del trasplante de médula ósea o en la anemia aplásica mediada por procesos autoinmunes, así como la presencia de telómeros muy cortos en pacientes debido a mutaciones en los genes de mantenimiento del telómero. Curiosamente, en nuestro modelo de ratón podemos ajustar la tasa de acortamiento de los telómeros a través de la frecuencia de agotamiento de HSCs mediada por la delección de *Trf1*, lo que permite controlar la aparición de aplasia en la médula ósea y de pancitopenia (Beier et al., 2012).

En este estudio, empleamos este modelo de ratón de anemia aplásica para investigar si la activación de la telomerasa utilizando vectores de terapia génica del estado de la técnica puede ser un tratamiento eficaz para atenuar el desgaste de los telómeros y el agotamiento de las HSC, y prevenir así el mal funcionamiento de la médula ósea.

Sumario

- 10 La presente solicitud describe composiciones y métodos útiles para el tratamiento y prevención de afecciones asociadas con una longitud corta de los telómeros. En algunos casos, la afección asociada con la longitud corta de los telómeros se caracteriza por mutaciones en un gen o genes implicados en el mantenimiento del telómero. En una realización, la afección asociada con la longitud corta de los telómeros se selecciona del grupo que consiste en Disqueratosis congénita, Anemia aplásica, Síndrome de mielodisplasia, Anemia de Fanconi.
- 15 La presente invención proporciona un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) para su uso en el tratamiento de la anemia aplásica. En una realización, la TERT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3. En una realización, la TERT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3. En una realización, la TERT está codificado por una secuencia de ácido nucleico que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3. En una realización, la TERT comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4. En una realización, la TERT comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4. En una realización, la TERT consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4. En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica TERT está unida operativamente a una secuencia reguladora que dirige la expresión de la secuencia codificante. En una realización, el vector es un vector no integrativo, tal como un vector no integrativo basado en virus adenoasociados. En una realización, el vector es un vector basado en virus adenoasociados derivado de un virus adenoasociado del serotipo 9 (AAV9). En una realización, la cápsida del vector basado en virus adenoasociados está formada por proteínas de la cápsida del virus adenoasociado del serotipo 9 (AAV9), y la secuencia del ácido nucleico contenido en la cápsida está flanqueada en ambos extremos por repeticiones internas terminales que corresponden a virus adenoasociados del serotipo 2. En una realización, el ácido nucleico contenido en la cápsida comprende un fragmento que codifica la secuencia de aminoácidos que codifica la TERT. En una realización, el vector comprende una secuencia reguladora que es un promotor constitutivo. En una realización, la secuencia reguladora es el promotor del citomegalovirus (CMV).
- 20
- 25
- 30
- 35 La presente solicitud describe el siguiente conjunto de temas:
1. Un método para tratar a un paciente con una afección asociada con longitud de telómeros corta que comprende administrar al paciente un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT).
 2. El método de 1, en el que la TERT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3.
 3. El método de 1 o 2, en el que la TERT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3.
 4. El método de cualquiera de 1-3, en el que la TERT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3.
 - 45 5. El método de cualquiera de 1-4, en el que la TERT comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.
 6. El método de cualquiera de 1-5, en el que la TERT comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.
 7. El método de cualquiera de 1-6, en el que la TERT consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.
 8. El método de cualquiera de 1-7, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la TERT está unida de forma operativa a una secuencia reguladora que dirige la expresión de la secuencia codificante.
 9. El método de cualquiera de 1-8, en el que el vector es un vector no integrativo.
 - 50 10. El método de cualquiera de 1-9, en el que el vector es un vector no integrativo basado en virus adenoasociados.

11. El método de cualquiera de 1-10, en el que el vector es un vector basado en virus adenoasociados derivado de virus adenoasociados del serotipo 9 (AAV9).
- 5 12. El método de 11, en el que la cápsida del vector basado en virus adenoasociados está formada por proteínas de la cápsida del virus adenoasociado del serotipo 9 (AAV9), y la secuencia de ácido nucleico contenida en la cápsida está flanqueada en ambos extremos por repeticiones internas terminales que corresponden a virus adenoasociados del serotipo 2.
13. El método de 12, en el que el ácido nucleico contenido en la cápsida comprende un fragmento que codifica la secuencia de aminoácidos que codifica la TERT.
- 10 14. El método de cualquiera de 1-13, en el que el vector comprende una secuencia reguladora que es un promotor constitutivo.
15. El método de 14, en el que la secuencia reguladora es el promotor del citomegalovirus (CMV).
16. El método de cualquiera de 1-15, en el que la afección asociada con la longitud corta de los telómeros se caracteriza por mutaciones en un gen o genes involucrados en el mantenimiento del telómero.
- 15 17. El método de cualquiera de 1-16, en el que la afección asociada con la longitud corta de los telómeros se selecciona del grupo que consiste en Disqueratosis congénita, Anemia aplásica, Síndrome mielodisplásico, Anemia de Fanconi, y fibrosis pulmonar.
18. Un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) para su uso en el tratamiento de una afección asociada con la longitud corta de los telómeros.
- 20 19. El vector de ácido nucleico de 18, en el que la TERT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3.
20. El vector de ácido nucleico de 18 o 19, en el que la TERT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3.
21. El vector de ácido nucleico de cualquiera de 18-20, en el que la TERT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3.
- 25 22. El vector de ácido nucleico de cualquiera de 18-21, en el que la TERT comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.
23. El vector de ácido nucleico de cualquiera de 18-22, en el que la TERT comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.
- 30 24. El vector de ácido nucleico de cualquiera de 18-23, en el que la TERT consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.
25. El vector de ácido nucleico de cualquiera de 18-24, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la TERT está unida de forma operativa a una secuencia reguladora que dirige la expresión de la secuencia codificante.
26. El vector de ácido nucleico de cualquiera de 18-25, en el que el vector es un vector no integrativo.
- 35 27. El vector de ácido nucleico de cualquiera de 18-26, en el que el vector es un vector no integrativo basado en virus adenoasociados.
28. El vector de ácido nucleico de cualquiera de 18-27, en el que el vector es un vector basado en virus adenoasociados derivado de un virus adenoasociado del serotipo 9 (AAV9).
- 40 29. El vector de ácido nucleico de 28, en el que la cápsida del vector basado en virus adenoasociados está formada por proteínas de la cápsida del virus adenoasociado del serotipo 9 (AAV9), y la secuencia de ácido nucleico contenida en la cápsida está flanqueada en ambos extremos por repeticiones internas terminales correspondientes a virus adenoasociados del serotipo 2.
30. El vector de ácido nucleico de 29, en el que el ácido nucleico contenido en la cápsida comprende un fragmento que codifica la secuencia de aminoácidos que codifica la TERT.
- 45 31. El vector de ácido nucleico de cualquiera de 18-30, en el que el vector comprende una secuencia reguladora que es un promotor constitutivo.
32. El vector de ácido nucleico de 31, en el que la secuencia reguladora es el promotor del citomegalovirus (CMV).
33. El vector de ácido nucleico de cualquiera de 18-32, en el que la afección asociada con la longitud corta de los telómeros se caracteriza por mutaciones en un gen o genes implicados en el mantenimiento del telómero.

34. El vector de ácido nucleico de cualquiera de 18 a 33, en el que la afección asociada con la longitud corta de los telómeros se selecciona del grupo que consiste en Disqueratosis congénita, Anemia aplásica, Síndrome mielodisplásico, Anemia de Fanconi y fibrosis pulmonar.

5 35. El vector de ácido nucleico de cualquiera de 18-34, en el que la afección asociada con la longitud corta de los telómeros es la disqueratosis congénita.

Breve descripción de las figuras.

Figura 1: Efectos de AAV9- *Tert* sobre la supervivencia (A-C) y los recuentos sanguíneos (D-E)

Figura 2: Efectos de AAV9- *Tert* sobre la longitud de los telómeros en sangre periférica (A-C) y médula ósea (D-E)

Descripción detallada de realizaciones de la invención

10 La presente solicitud describe composiciones y métodos útiles para el tratamiento y la prevención de afecciones asociadas con una longitud corta de los telómeros que comprende administrar al paciente un agente que incrementa la longitud de los telómeros del paciente. En ciertos casos, el agente previene la degradación de los extremos de los cromosomas. En ciertos casos, el agente incrementa la actividad de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT).
 15 En ciertos casos, el método de tratamiento es un método de terapia génica que comprende administrar al paciente un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT).

Una "afección asociada con la longitud corta de los telómeros" es aquella que se caracteriza por una acumulación de telómeros críticamente cortos. En ciertos casos, los sujetos que padecen tal afección muestran un inicio prematuro de patologías que son resultado de una capacidad regenerativa defectuosa de los tejidos.

20 En ciertos casos, la afección asociada con la longitud corta de los telómeros se caracteriza por mutaciones en un gen o genes implicados en el mantenimiento del telómero. Los ejemplos específicos de dichas afecciones con base genética incluyen, pero no se limitan a, disqueratosis congénita, anemia aplásica, síndrome mielodisplásico, anemia de Fanconi, y fibrosis pulmonar.

25 La disqueratosis congénita (DKC) es una enfermedad humana genéticamente heterogénea, que es paradigmática de los síndromes de envejecimiento prematuro (Dokal, 2011). La DKC se caracteriza por la presencia de telómeros cortos / disfuncionales debido a mutaciones en genes relacionados con el mantenimiento del telómero, siendo los más frecuentemente mutados aquellos que codifican proteínas del complejo de la telomerasa (es decir, TERT, TERC, NOP10, DKC1, NHP2) (Dokal, 2011; Dokal y Vulliamy, 2010; Mason y Bessler, 2011; Savage y Alter, 2008). Además, un subconjunto de pacientes porta mutaciones en el gen que codifica TIN2 (la proteína que interactúa con TRF1), un componente del complejo de la shelterina, que se une a y protege los telómeros de los mamíferos (Dokal, 2011; Martínez y Blasco, 2011; Walne et al., 2008). Tanto el complejo funcional de la telomerasa como la estructura adecuada de recubrimiento de los telómeros por parte de las proteínas de la shelterina son necesarios para el mantenimiento y el recubrimiento de los extremos de los cromosomas, respectivamente.

35 Las características clínicas de los pacientes que sufren de DKC incluyen anomalías de la piel (es decir, hiperpigmentación de la piel), signos de envejecimiento prematuro (es decir, encanecimiento del cabello, distrofia ungueal, leucoplasia oral, etc.), predisposición al cáncer y otras varias afecciones que ponen en peligro la vida, incluida la anemia aplásica y la fibrosis pulmonar (Armanios y Blackburn, 2012). En particular, los tejidos con un alto índice de proliferación son los más afectados debido a la pérdida de ADN telomérico que se produce en cada división celular. Esto explica por qué los pacientes con DKC son particularmente vulnerables a la disfunción de la médula ósea que conduce a pancitopenia y, finalmente, a insuficiencia de la médula ósea (BMF) (Armanios y Blackburn, 2012; Blasco, 2007)

45 La anemia aplásica, es un trastorno de la médula ósea que amenaza la vida y se caracteriza por una médula ósea hipocelular y un recuento bajo de células sanguíneas. Los pacientes con anemia aplásica adquirida presentan leucocitos que tienen telómeros considerablemente más cortos que los individuos sanos de la misma edad (Carroll y Ly, 2009). La anemia aplásica es causada frecuentemente por un ataque mediado por procesos autoinmunes contra las células madre hematopoyéticas. Sin embargo, estudios recientes demostraron que las mutaciones en los componentes centrales de telomerasa TERT y TERC son la causa subyacente en una subpoblación clínicamente relevante (Yamaguchi et al., 2003; Yamaguchi et al., 2005). Las mutaciones en los componentes centrales de telomerasa TERT y TERC, así como en el componente TIN2 de la shelterina, se han relacionado con esta enfermedad (Savage et al., 2006).

55 El síndrome mielodisplásico (MDS) abarca varias enfermedades de la médula ósea caracterizadas por la producción ineficaz de células sanguíneas de la clase mieloide. Causada por insuficiencia progresiva de la médula ósea, de forma similar a la DKC, los pacientes con MDS a menudo presentan anemia grave y citopenias. En aproximadamente un tercio de los casos, la enfermedad progresa rápidamente y se transforma en leucemia mielógena aguda (AML), que es particularmente resistente al tratamiento. Aunque los telómeros acortados en pacientes con MDS sugieren que el mantenimiento telomérico insuficiente o dificultado es causante del síndrome, solo 3 de cada 210 casos mostraron

mutaciones heterocigóticas en TERC en un estudio previo (Yamaguchi et al., 2003). Sin embargo, un estudio publicado recientemente puso claramente de manifiesto la conexión entre mutaciones de la telomerasa humana y el MDS, la anemia aplásica y AML. (Holme et al., 2012) informaron sobre diversas familias con mutaciones en los componentes de la telomerasa TERC y TERT en las que, por ejemplo, el abuelo padecía AML, la hija MDS y el nieto anemia aplásica (Holme et al., 2012) enfatizando la estrecha relación de diferentes manifestaciones clínicas con el mantenimiento deficiente de los telómeros.

La anemia de Fanconi (FA) es una enfermedad genética heterogénea causada por mutaciones en genes implicados en la reparación del ADN. Los individuos afectados presentan múltiples defectos congénitos y deficiencias hematológicas a una edad temprana de inicio (Kee y D Andrea, 2012). Sin embargo, las manifestaciones relacionadas con estas últimas son los síntomas predominantes de este síndrome y, a medida que avanza la enfermedad, pueden desarrollarse los síndromes mencionados anteriormente incluidos anemia aplásica, MDS y AML. Es importante destacar que también se ha demostrado que los pacientes que padecen FA presentan telómeros más cortos de lo normal (Gadalla et al., 2010). Los hechos de que las mutaciones que causan FA muestran una respuesta deficiente al daño del ADN (DDR) y de que los telómeros son particularmente vulnerables al estrés replicativo pueden proporcionar una explicación para la erosión observada de los telómeros. En apoyo de esto Callen et al. (2002) sugirieron que, en pacientes con FA, el aumento de la rotura de los telómeros, en concierto con un acortamiento replicativo, dan cuenta del acortamiento observado en los telómeros.

La fibrosis pulmonar se refiere a una afección caracterizada por la cicatrización del tejido pulmonar. La fibrosis pulmonar puede estar causada por muchos factores, incluidos procesos inflamatorios crónicos, infecciones, compuestos ambientales, radiación ionizante (por ejemplo, radioterapia para tratar tumores del tórax), afecciones médicas crónicas (lupus, artritis reumatoide). La fibrosis pulmonar idiopática (IPF) se refiere a la fibrosis pulmonar sin una causa identificable.

Consecuentemente, la invención proporciona un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) para su uso en el tratamiento de la anemia aplásica.

En ciertas realizaciones, la secuencia de TERT usada en el vector de terapia génica se deriva de la misma especie que el sujeto. Por ejemplo, la terapia génica en humanos se llevaría a cabo utilizando 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 realización, la TERT está codificada por la secuencia de ácido nucleico indicada en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 (variantes 1 y 2 de la TERT humana), o es un fragmento activo o equivalente funcional de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3. La secuencia de polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 1 se expone en la SEQ ID NO: 2. El polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 3 se expone en la SEQ ID NO: 4. Tal 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 a un polipéptido que tiene actividad de TERT. El equivalente funcional puede mostrar una actividad del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100% o más en comparación con la TERT codificada por la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3. Los equivalentes funcionales pueden ser artificiales o naturales. Por ejemplo, las variantes naturales de la secuencia de TERT en una población caen dentro del alcance del 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. En una realización particular, el equivalente funcional es un ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% de identidad con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3. En una realización adicional, el equivalente funcional es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4. En el caso de equivalentes funcionales, la identidad de la secuencia debería calcularse a lo largo de la longitud completa del ácido nucleico. Los equivalentes funcionales pueden contener una o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30 o más, inserciones, deleciones y/o sustituciones de nucleótidos cuando se les compara 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 la TERT con al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia indicada 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 la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 debido a la degeneración del código genético.

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

Las proteínas de fusión que incluyen estos fragmentos pueden estar comprendidas en los vectores de ácido nucleico necesarios para llevar a cabo la invención. Por ejemplo, se pueden incluir 5, 10, 20, 30, 40, 50 o incluso 100 residuos de aminoácidos adicionales de la secuencia del polipéptido, o de una secuencia homóloga, en cualquiera de los dos extremos C terminal y/o N sin perjudicar la capacidad del fragmento polipeptídico para plegarse correctamente y exhibir actividad biológica.

La identidad de secuencias se puede calcular por cualquiera de los diversos métodos de 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 en estos programas de alineamiento.

En una realización, el vector de ácido nucleico utilizado es un vector de terapia génica. Los métodos y vectores de terapia génica son bien conocidos en la técnica y generalmente comprenden administrar a un sujeto un ácido nucleico que codifica una proteína terapéuticamente activa. El ácido nucleico puede administrarse de varias maneras, incluida la administración de ADN desnudo, como plásmidos o mini-círculos, el uso de liposomas o polímeros catiónicos u otras nanopartículas modificadas por ingeniería genética que contienen el ácido nucleico, o vectores virales que encapsidan el ácido nucleico.

En una realización adicional, la terapia génica se logra utilizando la transformación estable de organismos con un sistema de expresión inducible. Los sistemas de expresión inducibles adecuados son conocidos en la técnica e incluyen el sistema basado en recombinasas CRE-LOX que es adecuado para uso en ratones y el regulado por tetraciclina que se puede usar en el tratamiento de sujetos humanos.

En una realización, el vector de terapia génica es un vector viral. Los vectores de terapia génica viral son bien conocidos en la técnica. Los vectores incluyen vectores integrativos y no integrativos, tales como los basados en retrovirus, adenovirus (AdV), virus adenoasociados (AAV), lentivirus, virus de la viruela, alfavirus y virus del herpes.

El uso de vectores virales no integrativos, como los AAV, parece ser particularmente ventajoso. En un aspecto, esto se debe a que los vectores no integrativos no causan ninguna modificación genética permanente. En segundo lugar, los vectores se dirigen a tejidos adultos, evitando que los sujetos estén bajo el efecto de la expresión constitutiva de la telomerasa desde las primeras etapas de desarrollo. Además, los vectores no integrativos incorporan de forma eficaz un mecanismo de seguridad para evitar la proliferación excesiva de células que expresan TERT. Las células perderán el vector (y, como consecuencia, la expresión de la telomerasa) si comienzan a proliferar rápidamente.

Los ejemplos concretos de vectores no integrativos adecuados incluyen aquellos basados en adenovirus (AdV), en particular adenovirus *gutless* (carentes de secuencias codificantes propias), virus adenoasociados (AAV), lentivirus deficientes en integrasa, virus de la viruela, alfavirus y virus del herpes. Preferiblemente, el vector no integrativo usado en la invención es un vector no integrativo basado en virus adenoasociados, similar a las partículas virales adenoasociadas naturales. Un AAV se dirige preferentemente a los tejidos postmitóticos, que se consideran más resistentes al cáncer que los altamente proliferativos. Los ejemplos de vectores no integrativos basados en virus adenoasociados 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 del tejido está determinada por el serotipo de la cápsida. El pseudotipado de vectores de AAV y la modificación de la cápsida mediante ingeniería genética para alterar su rango de tropismo probablemente serán importantes para su uso en terapia.

Los vectores derivados de virus adenoasociados (AAVs) se han convertido en uno de los vectores de elección para muchas aplicaciones de transferencia de genes debido a sus muchas propiedades deseables, incluida la capacidad de transducir una amplia gama de tejidos con alta eficacia, poca inmunogenicidad y un excelente perfil de seguridad (Merten, Geny-Fiamma et al. 2005; Buning, Perabo et al. 2008), estando ausente la toxicidad en muchos modelos preclínicos (Niemeyer, Herzog et al Blood 2009; Mas, Montane et al Diabetes 2006; Jiang, Lillcrap et al Blood 2006; Ghosh, Yue et al. Molecular therapy 2007; Tafuro, Ayuso et al Cardiovascular research 2009). Los vectores de AAV transducen células postmitóticas y pueden sostener la expresión génica a largo plazo (hasta varios años) en modelos animales tanto grandes como pequeños (Niemeyer, Herzog et al Blood 2009; Mas, Montane et al Diabetes 2006; Jiang, Lillcrap 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 de genes mediante AAVs se han estudiado ampliamente en humanos con resultados alentadores en hígado, músculo, el SNC y la 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).

El AAV2 es el serotipo mejor caracterizado para estudios de transferencia de genes tanto en humanos como en modelos experimentales. El AAV2 presenta un tropismo natural hacia los músculos esqueléticos, neuronas, células del músculo liso vascular y hepatocitos. Por lo tanto, el AAV2 es una buena elección como vector para apuntar con ellos como diana a estos tejidos, en particular cuando se usan los métodos o vectores de la invención para tratar una afección asociada con uno de estos tejidos. Por ejemplo, el tratamiento de la degeneración neuromuscular puede ser dirigido a los músculos esqueléticos y/o a las neuronas de esta manera.

Los serotipos recién aislados, como AAV7, AAV8 y AAV9, se han adoptado con éxito en estudios preclínicos (Gao, Alvira et al. PNAS 2002). Aunque se han detectado respuestas inmunológicas limitadas en sujetos humanos tratados con el AAV2 o el AAV1 contra la cápsida del AAV (Manno et al Nat Med 2006; Mingozzi et al Nat Med 2007; Brantly et al PNAS 2009; Mingozzi et al Blood 2009), es posible la expresión a largo plazo del gen terapéutico dependiendo del tejido diana y 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 comenzar (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00979238). Tomados en conjunto, estos

datos alentadores sugieren que los vectores de AAV son herramientas útiles para tratar enfermedades humanas con un alto nivel de seguridad y eficiencia.

La elección de virus adenoasociados de amplio tropismo, como los derivados del virus adenoasociado del serotipo 9 (AAV9) es particularmente ventajosa cuando se tratan afecciones asociadas con la longitud corta de los telómeros. Los virus AAV9 han mostrado una transducción eficiente en una amplia gama de tejidos, con un alto tropismo por el hígado, el corazón y el 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 del AAV9 tienen la capacidad única de cruzar la barrera hematoencefálica y dirigirse al cerebro mediante inyección intravenosa en ratones y gatos adultos (Foust et al Nature biotechnology 2009; Duque et al Molecular therapy et al 2009).

Un aspecto de la invención proporciona un sistema en el que la cápsida (que es la parte del virus que determina el tropismo del virus) del vector basado en virus adenoasociados está formada por proteínas de la cápsida del virus adenoasociado del serotipo 9 (AAV9). En una realización de los vectores virales para su uso en la invención, la secuencia polinucleotídica empaquetada en la cápsida está flanqueada por repeticiones internas terminales (ITR) de un virus adenoasociado, preferiblemente del serotipo 2 que se ha caracterizado ampliamente en la técnica, y presenta una secuencia codificante ubicada entre las ITRs. Como se expuso anteriormente, el ácido nucleico codifica preferiblemente un polipéptido de TERT funcional. En una realización, la secuencia reguladora unida de forma operativa a la secuencia codificante de la TERT es el promotor del citomegalovirus (CMV), aunque los expertos en la técnica conocerán otras secuencias reguladoras adecuadas.

Cuando se tratan afecciones asociadas con una longitud corta de los telómeros, es ventajoso dirigir el tratamiento a los tejidos afectados. La elección del serotipo del AAV para la proteína de la cápsida del vector de terapia génica se puede basar así en el sitio deseado de terapia génica. Si el tejido diana es el músculo esquelético, por ejemplo, para el tratamiento de la pérdida de coordinación neuromuscular, se pueden usar vectores virales basados en AAV1 y AAV6. Ambos serotipos son más eficientes en la transfección del músculo que otros serotipos de AAV. AAV3 es útil para transfectar células hematopoyéticas. Una revisión exhaustiva de los vectores basados en AAVs para la terapia génica se puede encontrar en Shi et al, (2008) " AAV-based targeting gene therapy" Am. J. Immunol. 4:51- 65.

Alternativamente, pueden usarse otros vectores virales en la presente invención. En la presente invención puede usarse cualquier vector compatible con el uso en terapia génica. Heilbronn y Weger (2010) Handb Exp Pharmacol. 197: 143-70 proporciona una revisión de los vectores virales que son útiles en la terapia génica. De acuerdo con toda la discusión anterior, los vectores que comprenden una secuencia codificante de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) adecuados para su uso en terapia génica son un punto importante para poner en práctica la invención. Los vectores de terapia génica adecuados incluyen cualquier tipo de partícula que comprende un fragmento de polinucleótido que codifica la proteína transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT), unido de forma operativa a un elemento regulador tal como un promotor, que permita la expresión de una proteína TERT funcional que muestra actividad de transcriptasa inversa de la telomerasa en las células diana. Preferiblemente, la TERT está codificada por la secuencia de ácido nucleico indicada en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3, o es un fragmento activo o equivalente funcional de TERT.

El término vector de terapia génica incluye dentro de su alcance moléculas de ADN desnudo tales como plásmidos o minicírculos, es decir, moléculas de ADN circulares que no contienen secuencias de ADN bacteriano, siempre y cuando la secuencia codificante de TERT y su elemento regulador asociado estén insertados en el plásmido, así como sistemas más complicados, como partículas con estructura de viriones (partículas virales), que comprenden al menos una cápsida y al menos una secuencia polinucleotídica, con un tamaño que permite que la secuencia polinucleotídica quede empaquetada dentro de la cápsida de manera similar a la del genoma nativo del virus de origen de la cápsida. La secuencia polinucleotídica debe incluir una región donde la secuencia codificante de TERT y su elemento regulador asociado estén insertados de tal manera que la proteína transcriptasa inversa de la telomerasa se pueda expresar a partir de esa secuencia de polinucleótidos una vez que la partícula viral haya infectado una célula.

En una realización, el vector de terapia génica adecuado para ser usado en la invención es un vector no integrativo, tal como un vector no integrativo basado en virus adenoasociados. Para los propósitos de la invención, la elección de vectores no integrativos parece ser particularmente ventajosa, porque no causan ninguna modificación genética permanente. Además, como se indicó anteriormente, dichos vectores incorporan un mecanismo de seguridad para evitar la proliferación excesiva de células que expresan TERT que perderán el vector si las células comienzan a proliferar rápidamente.

Se prefieren los vectores basados en virus adenoasociados derivados de un virus adenoasociado del serotipo 9 (AAV9) porque los efectos beneficiosos pueden lograrse en más tejidos (ver arriba). En una realización particularmente preferida, la secuencia reguladora unida de forma operativa a la secuencia codificante de la TERT es el promotor del citomegalovirus (CMV). La secuencia de ácido nucleico que codifica la TERT está unida de forma operativa a una secuencia reguladora que dirige la expresión de la secuencia codificante. Tal como se usa 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 de forma operativa al promotor. Tales "elementos reguladores" o "promotores" pueden controlar la expresión de secuencias de ácido nucleico unidas a ellos de forma constitutiva o inducible.

La secuencia reguladora puede ser un promotor constitutivo. Un ejemplo de una secuencia reguladora que es un promotor constitutivo es el promotor del citomegalovirus (CMV).

La expresión de la TERT después de la terapia génica según la invención persiste durante un período de varios meses a varios años. En ratones, la expresión de TERT fue detectable después de 5 meses. En el mono, la expresión génica después de la terapia génica con un vector basado en AAVs se ha detectado hasta 6 años después del tratamiento y hasta 8 años en perros (Rivera et al Blood 2005, y Niemeyer et al Blood 2009). Por lo tanto, no es necesaria la repetición frecuente del tratamiento utilizando los métodos y vectores de la invención. En una realización de la invención, el sujeto se trata una vez. En una realización alternativa, el sujeto se trata inicialmente y luego se trata nuevamente una vez que los niveles de expresión de TERT disminuyen en aproximadamente el 50% de los alcanzados inmediatamente después del tratamiento. El tratamiento puede repetirse con el mismo vector o un vector 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 dosis o una dosis posterior, puede ser necesario usar un vector de terapia génica diferente, por ejemplo, cuando se usa un vector basado en AAVs, la segunda administración y las administraciones posteriores pueden ser con un vector con una cápsida derivada de un serotipo diferente al utilizado para la primera administración. Es posible que un sujeto desarrolle anticuerpos neutralizantes para el primer vector de terapia génica, lo que lo haría ineficaz si se administrara una segunda vez o una vez posterior (Amado et al (2010) Science Translational Medicine 2 (21): 21ral6).

Los métodos de tratamiento de la invención tienen el efecto de tratar y/o prevenir afecciones asociadas con una longitud corta de los telómeros. En un aspecto adicional, por lo tanto, la invención se refiere a un método de terapia génica o al uso de un vector de ácido nucleico como se describió anteriormente, para su uso en el tratamiento o prevención en un sujeto de una afección asociada con una longitud corta de los telómeros, que incluye pero no se limita a afecciones basadas en alteraciones genéticas, como la disqueratosis congénita, la anemia aplásica, el síndrome mielodisplásico, la anemia de Fanconi y la fibrosis pulmonar.

La efectividad del tratamiento de las afecciones asociadas con una longitud corta de los telómeros se puede medir mediante diversos métodos conocidos en la técnica. En una realización, la efectividad del tratamiento se mide por un aumento de la duración de la vida de un paciente tratado que padece una afección asociada con una longitud corta de los telómeros en comparación con la duración de la vida esperada para un paciente no tratado que padece la misma afección. En ciertas realizaciones, la duración de la vida se extiende en un 5%, 10%, 15%, 20% o más, con referencia a la duración de la vida esperada para un paciente que padece la misma afección.

En una realización, la efectividad del tratamiento se mide por el retraso o la prevención de la insuficiencia de la médula ósea en un paciente tratado que padece una afección asociada con una longitud corta de los telómeros en comparación con el momento esperado de aparición de la insuficiencia de la médula ósea en un paciente no tratado que padece la misma afección. En ciertas realizaciones, el retraso en la aparición de la insuficiencia de la médula ósea de un paciente tratado que padece una afección asociada con una longitud corta de los telómeros se extiende en un 5%, 10%, 15%, 20% o más, con referencia al momento esperado de aparición de la insuficiencia de la médula ósea en un paciente no tratado que padece la misma afección.

En una realización, la efectividad del tratamiento se mide por un aumento en un buen estado físico general en un paciente tratado que padece una afección asociada con una longitud corta de los telómeros en comparación con el buen estado físico general de un paciente no tratado que padece la misma afección. El buen estado físico general se puede determinar midiendo los atributos físicos asociados con la afección particular. Los ejemplos de dichos atributos físicos incluyen anomalías de la piel (como hiperpigmentación de la piel), envejecimiento prematuro (como el encanecimiento del cabello, distrofia ungueal, leucoplasia oral) y palidez anémica. Dokal, I. 2011. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 480-486. Por lo tanto, un aumento en el buen estado físico general puede determinarse por una disminución en los atributos físicos asociados con la afección particular mostrada por el paciente tratado. El buen estado físico general también se puede medir determinando el recuento sanguíneo del paciente. En una realización, el aumento del buen estado físico general se mide determinando la cantidad de leucocitos, linfocitos, trombocitos en una muestra de sangre periférica. Un mayor recuento sanguíneo indica un aumento del buen estado físico general. En ciertas realizaciones, el recuento sanguíneo en un paciente tratado aumenta en un 5%, 10%, 15%, 20% o más, con referencia al recuento sanguíneo de un paciente no tratado que padece la misma afección.

La eficacia del tratamiento también puede medirse determinando directamente la longitud de los telómeros en una muestra tomada del paciente. La longitud de los telómeros se puede medir, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de hibridación estándar, como la hibridación in situ fluorescente (FISH), la hibridación in situ fluorescente cuantitativa (Q-FISH), o la hibridación in situ fluorescente cuantitativa fluorescente de alto rendimiento (HT Q-FISH). (Gonzalez-Suarez, Samper et al. 2001) en una muestra tomada del paciente. Las muestras adecuadas para el análisis de telómeros incluyen tejido de médula ósea y muestras de sangre. La longitud de los telómeros también se puede medir como se describe en Slagboom et al. o Canela et al. (2007, PNAS 104:5300-5305).

En una realización particular, se toman muestras del paciente que está en tratamiento a lo largo del transcurso del tratamiento para que se pueda determinar tanto la longitud absoluta de los telómeros como la velocidad de acortamiento de los telómeros en el transcurso del tratamiento. Se pueden tomar muestras todos los días durante el transcurso del tratamiento o a intervalos más largos. En una realización, las muestras se toman una vez a la semana,

- una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada 4 semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas o más. La comparación de la longitud de los telómeros se puede medir comparando la proporción de telómeros cortos en una muestra tomada de un paciente. En una realización, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros que presentan una intensidad por debajo de la intensidad media de la muestra medida mediante una técnica de hibridación in situ, como FISH o Q-FISH. En la realización, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros que presentan una intensidad del 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40% o más por debajo de la intensidad media de la muestra. En una realización particular, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros que presentan una intensidad del 50% o más por debajo de la intensidad media de la muestra.
- 5
- 10 En otras realizaciones, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros por debajo de una cierta longitud, por ejemplo. 8 kb, 7 kb, 6 kb, 5 kb o más cortos. En una realización, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros de 8 kb o más cortos. En otra realización, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros de 7 kb o más cortos. En otra realización, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros de 6 kb o más cortos. En otra realización, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros de 5 kb o más cortos. En otra realización, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros de 4 kb o más cortos. En otra realización, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros de 3 kb o más cortos.
- 15
- 20 En una realización, la efectividad del tratamiento se mide por una disminución en la proporción de telómeros cortos en una muestra tomada de un paciente tratado que padece una afección asociada con la longitud corta de los telómeros en comparación con una muestra de control. En una realización, la proporción de telómeros cortos en una muestra tomada de un paciente tratado disminuye en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o más en comparación con una muestra de control. En una realización, la muestra de control es una muestra tomada del mismo paciente antes del tratamiento, o tomada en una etapa anterior del tratamiento. En otra realización, la muestra de control es una muestra tomada de un paciente que padece la misma afección y al que no se le proporcionó el tratamiento.
- 25 En una realización adicional, la invención se aplica al sujeto administrando una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de uno cualquiera de los vectores de terapia génica para ser usados según la invención descrita anteriormente.
- Una "composición farmacéutica" pretende incluir la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, haciendo que la composición sea adecuada para uso diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.
- 30 "Composición" pretende querer decir una combinación de agente activo y otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o etiqueta detectable) o activo. Una "cantidad efectiva" es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad efectiva en una o más administraciones, aplicaciones o dosis.
- Por lo general, incluirán componentes adicionales al componente activo (como el vector de terapia génica), p. ej. típicamente incluyen uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticos. Una discusión completa de dichos componentes está disponible en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- 35 Las composiciones generalmente se administrarán a un sujeto en forma acuosa. Antes de la administración, sin embargo, la composición puede haber estado en una forma no acuosa. Por ejemplo, aunque algunos vectores virales se fabrican en forma acuosa, luego se hace con ellos un llenado y se distribuyen y se administran también en forma acuosa, otros vectores virales se liofilizan durante la fabricación y se reconstituyen en una forma acuosa en el momento de su uso. Por lo tanto, una composición que comprende un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de la TERT para su uso según la invención se puede secar, tal como en una formulación liofilizada. La composición puede incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, se prefiere que la composición esté sustancialmente libre de (es decir, menos de 5 µg/ml) material mercurial, p. ej. libre de tiomersal.
- 40 Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente entre 1 y 20 mg/ml, p. ej. aproximadamente 10 + 2 mg/ml de NaCl. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato de disodio deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.
- 45 Las composiciones generalmente tendrán una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferiblemente entre 240-360 mOsm/kg, y más preferiblemente estarán dentro del rango de 290-310 mOsm/kg.
- 50 Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato; un tampón de Tris; un tampón de borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón de citrato. Los tampones se incluirán normalmente en el rango de 5-20 mM.
- 55 La composición puede incluir material para una administración única, o puede incluir material para administraciones múltiples (es decir, un kit "multidosis"). En las disposiciones multidosis se prefiere la inclusión de un conservante. Como una alternativa a (o además de) incluir un conservante en composiciones multidosis, las composiciones pueden

estar contenidas en un recipiente que tiene un adaptador aséptico para la eliminación de material.

Las composiciones de la invención para uso en seres humanos se administran típicamente en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque a los niños puede administrarse media dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml).

- 5 Además de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, la presente solicitud también describe una secuencia de ácido nucleico que codifica una TERT para su uso en terapia. En particular, la terapia puede ser tratar o prevenir una afección asociada con la longitud corta de los telómeros. La invención proporciona un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT), para su uso en un método de terapia: para su uso en tratar la anemia aplásica. Como se describió para los métodos de tratamiento, la secuencia del ácido nucleico de la TERT puede ser la secuencia que se menciona en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 o un fragmento o equivalente funcional de la misma. La proteína TERT puede tener una secuencia como se la mencionada en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, o un fragmento o equivalente funcional de la misma.

- 15 El término "paciente" se refiere a un mamífero. En ciertas realizaciones, el paciente es un roedor, primate, ungulado, gato, perro u otra mascota doméstica o mamífero domesticado. En ciertas realizaciones, el mamífero es un ratón, rata, conejo, cerdo, caballo, oveja, vaca, gato o perro doméstico, o un humano. En una realización preferida, el paciente es un humano.

- 20 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y de ejemplo con fines de claridad de comprensión, las descripciones y los ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Las descripciones de todas las patentes y publicaciones científicas citadas en este documento se incorporan expresamente en su totalidad a modo de referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1 Modelo de ratón de disqueratosis congénita

- 25 Se utilizarán para probar la eficacia de la terapia génica telomerasa para tratar disqueratosis congénita (DKC) ratones con un fondo genético C57B6 que son portadores homocigóticos de un transgén TRF1 condicional (TRF1^{flax/flax}) y además son transgénicos para la Cre-recombinasa bajo el control del promotor endógeno Mx1 inducible por interferón. Para estudiar exclusivamente los efectos de la ablación de TRF1 en el compartimento hematopoyético, se trasplantará médula ósea de estos ratones a ratones de tipo salvaje irradiados como se describió anteriormente (Beier et al., 2012). Un mes después del trasplante, se inyectarán a los ratones a través de su vena de la cola 4×10^{12} genomas de AAV9 que portan el ADNc de mTERT bajo el control del potente promotor del citomegalovirus (para la producción de virus, ver a continuación el punto 3.3). Por analogía, el AAV9 vacío que carece del gen de la telomerasa se inyectará en un grupo de control. Además, para seguir el tropismo viral y la expresión del transgén a lo largo del tiempo, se inyectará AAV9-eGFP a un grupo separado de animales. Una semana después de la infección con el virus, se inducirá la delección de TRF1 en la médula ósea mediante un tratamiento a largo plazo con ácido poliinosínico-policitidílico (pl:pC) con inyecciones intraperitoneales cada tres días. El pl:pC actúa como inmunoestimulante y activa la expresión de Cre, que a su vez conduce a la delección de TRF1 en aproximadamente el 50% de las células hematopoyéticas (tras cada inyección) con las consecuencias mencionadas anteriormente (ver el punto 2). En contraste con el tratamiento con pl:pC, los grupos de animales previamente infectados con AAV9-mTERT y AAV9-vacío no se someterán a un tratamiento con pl:pC para servir como cohortes de control adicionales.

- 40 Con este diseño experimental, se reducirá el acortamiento dramático de los telómeros, debido a la proliferación compensatoria en las células hematopoyéticas restantes que no han perdido TRF1, por la expresión ectópica de la telomerasa. La medida más importante para evaluar la efectividad de la terapia génica es la prolongación de la duración de la vida en virtud del retraso o la prevención de la insuficiencia de la médula ósea (punto final del experimento = muerte de los animales). Además, el tratamiento exitoso con la telomerasa debería mostrar mejoras con respecto al buen estado físico general de los animales, es decir, sin anomalías en la piel y sin palidez anémica. Esto último va de la mano con mayores recuentos sanguíneos (leucocitos, linfocitos, trombocitos), que se determinarán a partir de muestras de sangre periférica. La eficacia de la expresión de la telomerasa a nivel molecular incluirá mediciones de la longitud de los telómeros. Para ello, se realizará un análisis Q-FISH de secciones de tejido de la médula ósea y un análisis de Q-FISH de alto rendimiento de muestras de sangre periférica. Para el segundo, se tomará sangre cada tres o cuatro semanas a lo largo del experimento. De este modo, no sólo se puede determinar la longitud absoluta de los telómeros, sino también la velocidad de acortamiento de los telómeros a lo largo del tiempo. Además, se seguirá la atenuación o la abolición de la senescencia replicativa y el agotamiento de las células madre y progenitoras en el compartimento hematopoyético mediante la evaluación de marcadores de senescencia comunes como la actividad beta-galactosidasa y los niveles de proteína p21. Estos marcadores, así como γ H2AX y fosfo-CHK1, marcadores moleculares del estrés replicativo, pueden correlacionarse con la longitud de los telómeros y la supervivencia de los animales.

Ejemplo 2 Producción de virus.

Los vectores virales basados en AAVs para la transducción se generarán por triple transfección de células HEK293T como se describe en (Matsushita et al., 1998). Brevemente, células cultivadas hasta un 80% de confluencia se

cotransfectan con plásmidos (1) que portan el casete de expresión flanqueado por las ITR virales del AAV9, (2) un plásmido auxiliar que lleva los genes rep2 y cap9 del AAV, y (3) un plásmido que porta las funciones de adenovirus auxiliar. Los casetes de expresión albergan TERT murino bajo el control del promotor CMV más 3'-UTR (AAV9-mTERT), el promotor CMV (AAV9-vacío) solo y eGFP bajo el control del promotor CMV y la señal de poliA del SV40 (AAV9-eGFP). Los vectores se purifican siguiendo un método optimizado basado en dos gradientes de cloruro de cesio consecutivos (Ayuso et al., 2010). Los títulos de partículas con genomas virales se determinan mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los virus se pueden mantener estables a -80°C hasta la infección de los animales.

Ejemplo 3 Análisis de telómeros

Análisis de telómeros mediante Q-FISH en secciones de parafina

10 Para la determinación por Q-FISH en cortes de tejido embebidos en parafina los ratones se hibridan con una sonda telomérica de PNA, y la intensidad de la fluorescencia de los telómeros se determina como se ha descrito (Gonzalez-Suarez, Samper et al. 2001). El análisis cuantitativo de imágenes se realiza utilizando el software Definiens Developer Cell (versión XD 1.2; Definiens AG). Para el análisis estadístico se usa una prueba la t de Student de dos colas para evaluar la significancia (software GraphPad Prism).

15 RT-PCR cuantitativa en tiempo real

El ARN total de los tejidos se extrae con Trizol (Life Technologies). Las muestras de ARN se tratan con ADNasa I y se utilizan como plantilla para una reacción de transcripción inversa utilizando cebadores aleatorios y la Transcriptasa Inversa de Superscript (Life Technologies), de acuerdo con las directrices del fabricante. La PCR cuantitativa en tiempo real se realiza utilizando un ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems), utilizando la mezcla DNA Master SYBR Green I (Applied Biosystems).

20 Los cebadores:

Actin-For: GGCACCACACCTCTTACAATG (SEQ ID NO: 7);

Actin-Rev: GTGGTGGTGAAGCTGTAG (SEQ ID NO: 8);

TERT-For: GGATTGCCACTGGCTCCG (SEQ ID NO: 9);

25 TERT-Rev: TGCCTGACCTCCTCTTGTGAC (SEQ ID NO: 10).

p16-For: CGTACCCCGATTGAGGTGAT (SEQ ID NO: 11)

p16-Rev: TTGAGCAGAAGAGCTGCTACGT (SEQ ID NO: 12)

Axin2-For: GGCAAAGTGGAGAGGATCGAC (SEQ ID NO: 13)

Axin2-Rev: TCGTGGCTGTTGCGTAGG (SEQ ID NO: 14)

30 Cyclin D1 - For: TGCGCCCTCCGTATCTTAC (SEQ ID NO: 15)

Cyclin D1 - Rev: ATCTTAGAGGCCACGAACATGC (SEQ ID NO: 16)

CD44 - For: CAGCCTACTGGAGATCAGGATGA (SEQ ID N°: 17)

CD44 - Rev: GGAGTCCTTGATGAGTCTCGA (SEQ ID NO: 18)

Klf4 - For: GCGAACTCACACAGGCGAGAAACC (SEQ ID N°: 19)

35 Klf4 - Rev: TCGCTCCTCTCCTCCGACACA (SEQ ID N°: 20)

Tieg1 - For: CCCATTGCCCTGCTCCTG (SEQ ID NO: 21)

Tieg 1 - Rev: TGTGTCCGCCGGTGTCTGG (SEQ ID NO: 22)

Los análisis estadísticos (prueba de la t de Student) se realizan con los valores de Ct como se ha descrito anteriormente (Muñoz, Blanco et al. 2005).

40 Ejemplo 4 Terapia génica con telomerasa en la anemia aplásica

Ratones y procedimientos animales.

Los ratones eran de fondo puro C57/BL6 y se produjeron y se alojaron en el alojamiento específico de animales libres de patógenos (SPF) del CNIO en Madrid, España. Se generaron ratones *Trf1^{lox/lox} Mx1-Cre* y *Trf1^{lox/lox} Mx1-wt* descritos previamente (Martinez et al., 2009). Para el trasplante de médula ósea, se utilizaron ratones *Trf1^{lox/lox} Mx1-Cre* de 10 semanas de edad como donantes de médula ósea para el trasplante en ratones de tipo salvaje letalmente irradiados

45

(12 Gy) de 8 semanas de edad como se describió anteriormente (Beier et al., 2012, Samper et al., 2002). Se trasplantaron un total de 2 millones de células mediante una inyección en la vena de la cola en una relación donante:receptor de 1:8 y los ratones se dejaron durante un período de latencia de 30 días para permitir la reconstitución de la médula ósea. Para inducir la expresión de Cre, a los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal ácido poliinosínico-policitidílico (pl:pC; Sigma-Aldrich) (15 ug/g de peso corporal) 3 veces por semana durante un total de 5 semanas. Los ratones se dejaron durante una semana adicional antes de que se asignaran aleatoriamente a dos grupos para el tratamiento con los vectores de terapia génica AAV9-vacío o AAV9-*Tert*. Los vectores se administraron mediante inyección en la vena de la cola a una concentración de 4x10¹² genomas virales por ratón.

Producción de vectores de terapia génica

Los vectores virales se generaron como se describió anteriormente (Matsushita et al., 1998) y se purificaron como se describe en (Ayuso et al., 2010). Brevemente, los vectores se produjeron mediante triple transfección de HEK293T. Las células se cultivaron en botellas cilíndricas rotatorias (Corning, NY, EE.UU.) en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con FBS (10% v/v) hasta el 80% de confluencia y luego se cotransfectaron con: plásmido-1 que lleva el casete de expresión del gen de interés flanqueado por las ITRs del virus AAV2; plásmido-2 que lleva los genes de AAV *rep2* y *cap9*; plásmido-3 que lleva las funciones del adenovirus auxiliar (los plásmidos fueron proporcionados amablemente por K.A. High, Hospital Infantil de Filadelfia). Los casetes de expresión estaban bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV) y contenían una señal de poliA de SV40 para el *EGFP* y el promotor CMV y la UTR de 3' del gen *Tert* como señal de poliA para *Tert*. Las partículas de AAV9 se purificaron siguiendo un método optimizado utilizando dos gradientes de cloruro de cesio, se dializaron contra PBS, se filtraron y se almacenaron a -80 ° C hasta su uso (Ayuso et al., 2010). Los títulos de los genomas virales se determinaron mediante un método estandarizado de PCR cuantitativa en tiempo real (Ayuso et al, 2014) y los cebadores específicos para la secuencia de CMV:

CMV-Directo: 5'-CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGC (SEQ ID NO: 23);

CMV-Inverso: 5'-AGATGTACTGCCAAGTAGGAATACGT (SEQ ID NO: 24).

Histología

Las muestras de médula ósea (esternón o hueso de la tibia) fueron fijadas en formaldehído al 4% tamponado con fosfato y los huesos se embebieron en parafina después de la descalcificación. Se tiñeron secciones de tejido de 5 µm con hematoxilina-eosina para la evaluación histológica de la médula ósea. La inmunohistoquímica se realizó en secciones de tejidos desparafinados. Después de la recuperación de los antígenos las muestras se procesaron con los anticuerpos anti-EGFP (anti-EGFP de conejo, 1:200; Abcam, ab290). Las células positivas para EGFP se contaron de forma semiautomática utilizando el software ImageJ.

Clasificación por FACS

Para la clasificación de las HSCs se extrajeron de los huesos largos (fémur y tibia) células de médula ósea entera tal como se ha descrito previamente (Samper et al., 2002). Los eritrocitos se lisaron incubando las células durante 10 minutos en 10 ml de tampón de lisis de eritrocitos (Roche), se lavaron una vez con 10 ml de PBS y se resuspendieron en tampón FACS (PBS, EDTA 2 mM, BSA al 0,3%) que contenía Fc-block (1:400) a una concentración de 5-10x10⁶ células / 100 µl. Las células se incubaron durante 10 minutos y se lavaron una vez en tampón FACS. Las células se resuspendieron luego en tampón FACS a 20-25 x10⁶ células / ml y el cóctel de anticuerpos se agregó como sigue: Anti-sca-1-PerCP-Cy5.5 (1:200), cóctel lin-eFluor450 (1:50) (todo de eBioscience), y anti-c-kit-APC-H7 (1:100) (BD Pharmingen). Las células se incubaron durante 30 min. Después de lavar las células dos veces con PBS, se agregaron 2 L de DAPI (200 g/ml) y las células se clasificaron posteriormente en un FACS ARIA IIu (Becton Dickinson, San Jose, CA) en HSCs (negativas para lin, positivas para sca1 y c-kit) y fracciones de linaje positivo (positivas para lin).

Ensayo de formación de colonias

El ensayo de formación de colonias a corto plazo (CFA) se realizó colocando en placas 1x10⁴ y 2x10⁴ células de médula ósea mononucleadas recién aisladas (los eritrocitos se lisaron como se describió anteriormente) en placas de 35 mm (StemCell Technologies) que contenían medio Methocult (basado en metilcelulosa) (StemCell Technologies) como se describe en el protocolo del fabricante. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y los números de colonias formadas se contaron después de 12 días de incubación a 37 °C.

Recuentos sanguíneos

Se extrajo sangre periférica de la vena facial (-50 µl) y se recogió en tubos anticoagulantes (EDTA). Los recuentos sanguíneos se determinaron utilizando un analizador de hematología veterinaria Abacus Junior Vet.

PCR cuantitativa en tiempo real y transferencias Western

Se aisló el ARN total de extractos de médula ósea completa o de células de médula ósea clasificadas por FACS utilizando el mini kit RNeasy de Qiagen de acuerdo con el protocolo del fabricante. Siempre se realizó la digestión

opcional con DNasal. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando un ABI PRISM 7700 o QuantStudio 6 Flex (ambos de Applied Biosystems). Las secuencias de los cebadores para Tert y los genes de referencia Act1 y TBP son las siguientes:

Tert-Directo 5'GGATTGCC ACTGGCTCCG (SEQ ID NO: 9);

5 Tert-Inverso 5'TGCTGACCTCCTCTTGTGAC (SEQ ID NO: 10);

Actina-Directo 5'GGCACCACACCTCTTACAATG (SEQ ID NO: 7);

Actina-Inverso 5'GTGGTGGTGAAGCTGTAG (SEQ ID NO: 8);

TBP-Directo 5'CTTCCTGCCACAATGTCACAG (SEQ ID NO: 25);

TBP-Inverso 5'CCTTTCTC ATGCTTGCTTCTCTTG (SEQ ID NO: 26).

10 Análisis de los telómeros por Q-FISH

El análisis por Q-FISH en secciones de tejidos de la médula ósea se realizó como se describió anteriormente (Samper et al., 2000). Brevemente, las secciones de tejidos se fijaron posteriormente en formaldehído al 4% durante 5 minutos, se lavaron 3 x 5 minutos en PBS y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos en solución de pepsina (0,1% de pepsina porcina, Sigma; HCl 0,01M, Merck). Se repitieron los lavados y la fijación y se deshidrataron los portaobjetos en una serie de etanol al 70% -90% -100% (5 min cada uno). Los portaobjetos se secaron al aire durante 10 min y se agregaron 30 µl de la mezcla con sonda de telómeros a cada portaobjetos (TrisCl 10 mM, pH 7, MgCl₂ 25 mM, ácido cítrico 9 mM, Na₂HPO₄ 82 mM, formamida desionizada al 70% (Sigma), reactivo bloqueante al 0,25% y 0,5 mg/ml de sonda telomérica de PNA (Panagene), se agregó un cubreobjetos y se incubaron los portaobjetos durante 3 minutos a 85 °C y 2 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda en la oscuridad. Los portaobjetos se lavaron 2 x 15 min en TrisCl 10 mM, pH 7, BSA al 0,1% en formamida al 70% con agitación vigorosa, luego 3 x 5 min en TBS de Tween 20 0,08%, y luego se incubaron en un baño de 40,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (4 mg/ml 1 DAPI (Sigma) en PBS). Las muestras se montaron en Vectashield (VectorTM). La imagen confocal se adquirió como pilas de secciones cada 0,5 µm hasta un total de 1,5 µm utilizando un microscopio confocal Leica SP5-MP y se realizaron proyecciones máximas con el software LAS-AF. La intensidad de la señal de los telómeros se cuantificó utilizando el software Definiens.

25 La Q-FISH de alto rendimiento (HT) en leucocitos de sangre periférica se realizó como se ha descrito (Canela et al., 2007a). Brevemente, se extrajeron 120-150 µl de sangre de la vena facial. Los eritrocitos se lisaron (tampón de lisis de eritrocitos, Qiagen) y se sembraron en placas 30-90 k leucocitos por duplicado en placas de 96 pocillos de paredes negras de fondo transparente recubiertas previamente durante 30 minutos con 0,001% de poli-L-lisina. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 h y se fijaron con metanol/ácido acético (3:1, v/v) 2 x 10 min y durante la noche a -20 °C. Se retiró el fijador, las placas se secaron durante al menos 1 hora a 37 °C y las muestras se rehidrataron en PBS. Las placas se sometieron luego a un protocolo estándar de Q-FISH (ver más arriba) usando una sonda de PNA-CY3 específica de telómeros; se utilizó DAPI para teñir los núcleos. Se capturaron sesenta imágenes por pozo utilizando el sistema de cribado de alto contenido OPERA (Perkin Elmer). Los valores de TL se analizaron utilizando puntos de telómeros individuales (>10.000 puntos de telómeros por muestra). Las intensidades de fluorescencia promedio de cada muestra se convirtieron en kilobases utilizando células L5178-R y L5178-S como estándares de calibración, que tienen TLs estables de 79,7 y 10,2 kb, respectivamente. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

AAV9-Tert se dirige a la médula ósea y células madre hematopoyéticas

Primero, nos propusimos abordar la capacidad de los vectores AAV9 para transducir la médula ósea tras la inyección intravenosa utilizando tanto el virus reportero AAV9-EGFP, que permite la determinación de la ubicación y el porcentaje de células transducidas con AAV9, como la determinación de la expresión del ARNm de *Tert in vivo* en diferentes poblaciones de células de médula ósea después del tratamiento con AAV9-Tert. Con este fin, primero inyectamos a ratones de tipo salvaje partículas de AAV9-EGFP a una concentración de 3,5E12 genomas virales por ratón a través de inyecciones en la vena de la cola. El análisis inmunohistoquímico de la sección de la médula ósea con anticuerpos anti-EGFP específicos reveló un 2% de células positivas con expresión de EGFP en las secciones del medio del hueso y esto se incrementó hasta un 10% en las regiones adyacentes a las articulaciones, que fueron las que mostraron la mayor transducción de AAV9. Luego, inyectamos a ratones de tipo salvaje la misma cantidad de partículas de AAV9-Tert y determinamos la expresión del ARNm de *Tert* mediante RT-PCR en aislados de médula ósea completa a las dos semanas y 8 meses después de la inyección del virus. Apenas dos semanas después del tratamiento con los vectores AAV9, encontramos un aumento de la expresión del ARNm de *Tert* en los ratones tratados con AAV9-Tert en comparación con los tratados con el vector AAV9 vacío y esta diferencia se mantuvo todavía 8 meses después del tratamiento inicial. Luego estudiamos la expresión del ARNm de *Tert* específicamente en las células formadoras de sangre de la médula ósea. Con este fin, realizamos la clasificación por FACS de células HSC positivas para Sca-1 y c-kit y células encaminadas hacia su linaje lin-positivas. Encontramos un aumento significativo tanto en las HSCs (10 veces) como en las células de la médula ósea encaminadas hacia su linaje (3,5 veces) en el ARNm de *Tert* en ratones tratados con AAV9-Tert en comparación con los ratones tratados con el vector vacío, lo que demuestra que las células de la médula ósea, incluidas las células HSC, son alcanzadas por la terapia génica con *Tert*. Dado que logramos incrementar la expresión de *Tert* en las HSC, a continuación abordamos si esto afectó su potencial de células madre.

Con este fin, realizamos un ensayo de células formadoras de colonias (MethoCult). Curiosamente, observamos un número significativamente mayor de colonias en los ratones AAV9-Tert en comparación con los controles de vector vacío.

5 En resumen, estos datos sugieren que el AAV9 administrado en una dosis alta puede alcanzar las células hematopoyéticas y que esto aumenta la capacidad de proliferación de esas células.

El tratamiento con AAV9-Tert en un modelo de ratón de anemia aplásica rescata la supervivencia

10 A continuación, probamos si el tratamiento con AAV9-Tert es eficaz para aumentar la supervivencia tras la inducción de anemia aplásica letal debido a telómeros extremadamente cortos (Beier et al., 2012). En particular, utilizamos un modelo condicional de ratón *Trf1* recientemente desarrollado por nosotros en el que irradiamos letalmente ratones de tipo salvaje y se les trasplanta médula ósea aislada de ratones *Trf1^{lox/lox} Mx1-Cre* para estudiar exclusivamente los efectos sobre la médula ósea. La delección de *Trf1* se puede inducir mediante la administración de pl:pC y la expresión subsiguiente de la recombinasa Cre (Beier et al., 2012). Las células en las que se ha producido el agotamiento de *Trf1* mueren y se eliminan rápidamente de la médula ósea, mientras que las células que permanecen con *Trf1* intacto se someten a rondas compensatorias de división celular que conducen a un rápido acortamiento de los telómeros, seguido de senescencia replicativa y finalmente da como resultado insuficiencia de la médula ósea. En los ajustes experimentales específicos para este caso, indujimos la delección de *Trf1* inyectando a ratones 3 veces por semana pl:pC durante un período total de 5 semanas, momento en el que estos ratones comienzan a mostrar signos de anemia aplásica (Beier et al., 2012). Una semana después de que detuviéramos la inducción de la delección de *Trf1*, los ratones se sometieron a tratamiento de terapia génica con vectores AAV9-Tert o de control AAV9-vacío. Supervisamos la supervivencia de estos ratones durante 100 días después del tratamiento con los vectores AAV9. Sorprendentemente, el tratamiento con AAV9-Tert mejoró drásticamente la supervivencia (87%) en comparación con los ratones tratados con el vector vacío (55%) (Figura 1A). En particular, mientras que solo 4 ratones inyectados con AAV9-Tert desarrollaron anemia aplásica durante este tiempo (13%), 16 ratones del grupo de control (44%) murieron con signos claros de anemia aplásica (Fig. 1B,C). De acuerdo con la apariencia anémica, el análisis del recuento sanguíneo de estos ratones (sangre extraída de ratones tratados con AAV9-vacío y AAV9-Tert al sacrificarlos) mostró una caída drástica en el recuento de plaquetas y el nivel de hemoglobina en comparación con los ratones sin signos de anemia aplásica (Fig. 1D, E). El análisis histopatológico post-mortem de las secciones de médula ósea de ratones que murieron durante los primeros 100 días confirmó aún más el fenotipo de anemia aplásica. En particular, los ratones presentaron hipoaplasia y aplasia severa de la médula ósea en 2 o en los 3 linajes sanguíneos. Si bien el diagnóstico en el momento de la muerte en ambos grupos fue insuficiencia de la médula ósea y aplasia, el fenotipo pareció más leve en el grupo de AAV9-Tert en comparación con el grupo de AAV9-vacío, como se observó por la mayor celularidad de la médula ósea.

Nuestros resultados sugieren que la terapia génica con AAV9-Tert reduce significativamente la mortalidad por anemia aplásica al prevenir la pérdida de células hematopoyéticas que forman la sangre.

35 El tratamiento con telomerasa conduce al alargamiento de los telómeros en la sangre periférica y la médula ósea

Debido a que el fenotipo de anemia aplásica en nuestro modelo de ratón está causado por la pérdida de telómeros, a continuación comparamos la longitud de los telómeros en ratones tratados con telomerasa con ratones que recibían el vector de control. Primero utilizamos la tecnología de HT-Q-FISH (Canela et al., 2007b) para seguir la longitud de los telómeros en monocitos de sangre periférica en forma longitudinal. Para ello, extrajimos sangre en 4 momentos diferentes; después del injerto de médula ósea (1), después del tratamiento pl:pC (2), 2 meses después de la inyección de AAV9 (3) y 4 meses después de la inyección de AAV9 (4). Como se esperaba, encontramos que la longitud de los telómeros entre los momentos 1 y 2 en ambos grupos se reduce aproximadamente en 10 kb, lo que se debe al tratamiento con pl:pC. Si bien la longitud de los telómeros en el grupo de AAV9-vacío entre el momento 2 y el momento 4 continúa acortándose ligeramente, el tratamiento con AAV9-Tert llevó a un aumento neto en el promedio de los telómeros de 10 kb (Figura 2A, B). En el transcurso de este experimento, los ratones tratados con AAV9-vacío mostraron una pérdida media de longitud de los telómeros de 12 kb, mientras que en los ratones tratados con AAV9-Tert, los telómeros se volvieron a alargar hasta niveles similares a los previos al tratamiento con pl:pC (Figura 2C). A continuación, realizamos un análisis de Q-FISH en secciones transversales de médula ósea. En consonancia con la mayor longitud de los telómeros en la sangre periférica, encontramos que los ratones tratados con AAV9-Tert tenían telómeros significativamente más largos en comparación con los ratones tratados con el vector vacío (Figura 2D, E).

Referencias

- Armanios, M. (2012). An emerging role for the conserved telomere component 1 (CTC1) in human genetic disease. *Pediatr Blood Cancer* 59, 209-210.
- Armanios, M., and Blackburn, E.H. (2012). The telomere syndromes. *Nature reviews. Genetics* 13, 693-704.
- 55 Ayuso, E., Mingozzi, F., Montane, J., Leon, X., Anguela, X.M., Haurigot, V., Edmonson, S.A., Africa, L., Zhou, S., High, K.A., et al. (2010). High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene therapy* 17, 503-510.

- Beier, F., Foronda, M., Martinez, P., and Blasco, M.A. (2012). Conditional TRF1 knockout in the hematopoietic compartment leads to bone marrow failure and recapitulates clinical features of Dyskeratosis congenita. *Blood*.
- Bernardes de Jesus, B., Vera, E., Schneeberger, K., Tejera, A.M., Ayuso, E., Bosch, F., and Blasco, M.A. (2012). Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO molecular medicine* 4, 691-704.
- Bernardes de Jesus de Jesus, B. and Blasco, M.A. (2013). Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet.* 29, 513–520.
- Blasco, M.A. (2007). Telomere length, stem cells and aging. *Nature chemical biology* 3, 640-649.
- Blasco, M.A., Lee, H.W., Hande, M.P., Samper, E., Lansdorp, P.M., DePinho, R.A., and Greider, C.W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91, 25-34.
- Buning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadt-Humme, S., and Hallek, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *The journal of gene medicine* 10, 717-733.
- Calado, R.T., Yewdell, W.T., Wilkerson, K.L., Regal, J.A., Kajigaya, S., Stratakis, C.A., and Young, N.S. (2009). Sex hormones, acting on the TERT gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells. *Blood* 114, 2236-2243.
- Callen, E., Samper, E., Ramirez, M.J., Creus, A., Marcos, R., Ortega, J.J., Olive, T., Badell, I., Blasco, M.A., and Surrallés, J. (2002). Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia. *Hum Mol Genet* 11, 439-444.
- Carroll, K.A., and Ly, H. (2009). Telomere dysfunction in human diseases: the long and short of it! *International journal of clinical and experimental pathology* 2, 528-543.
- Dokal, I. (2011). Dyskeratosis congenita. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2011, 480-486.
- Dokal, I., and Vulliamy, T. (2010). Inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica* 95, 1236-1240.
- Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., Dubreil, L., Douar, A.M., Fyfe, J., Moullier, P., Colle, M.A., and Barkats, M. (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 1187-1196.
- Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M., and Kaspar, B.K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol* 27, 59-65.
- Gadalla, S.M., Cawthon, R., Giri, N., Alter, B.P., and Savage, S.A. (2010). Telomere length in blood, buccal cells, and fibroblasts from patients with inherited bone marrow failure syndromes. *Aging (Albany NY)* 2, 867-874.
- Gao, G.P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11854-11859.
- Gonzalez-Suarez, E., Samper, E., Ramirez, A., Flores, J.M., Martin-Caballero, J., Jorcano, J.L., and Blasco, M.A. (2001). Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *EMBO J* 20, 2619-2630.
- Herrera, E., Samper, E., Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Lee, H.W., and Blasco, M.A. (1999). Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *EMBO J* 18, 2950-2960.
- Holme, H., Hossain, U., Kirwan, M., Walne, A., Vulliamy, T., and Dokal, I. (2012). Marked genetic heterogeneity in familial myelodysplasia/acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology* 158, 242-248.
- Inagaki, K., Fuess, S., Storm, T.A., Gibson, G.A., McTiernan, C.F., Kay, M.A., and Nakai, H. (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14, 45-53.
- Jaime-Perez, J.C., Colunga-Pedraza, P.R., Gomez-Ramirez, C.D., Gutierrez-Aguirre, C.H., Cantu-Rodriguez, O.G., Tarin-Arzaga, L.C., and Gomez-Almaguer, D. (2011). Danazol as first-line therapy for aplastic anemia. *Annals of hematology* 90, 523-527.
- Jaskelioff, M., Muller, F.L., Paik, J.H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A.C., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Cadinanos, J., *et al.* (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* 469, 102-106.
- Jiang, H., Lillcrap, D., Patarroyo-White, S., Liu, T., Qian, X., Scallan, C.D., Powell, S., Keller, T., McMurray, M., Labelle,

- A., *et al.* (2006). Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2, 6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs. *Blood* *108*, 107-115.
- Kaplitt, M.G. (2009). Gene therapy clinical trials in the human brain. Protocol development and review of current applications. *Frontiers of neurology and neuroscience* *25*, 180-188.
- 5 Kee, Y., and D'Andrea, A.D. (2012). Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. *J Clin Invest* *122*, 3799-3806.
- Lee, H.W., Blasco, M.A., Gottlieb, G.J., Horner, J.W., 2nd, Greider, C.W., and DePinho, R.A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* *392*, 569-574.
- 10 Maguire, A.M., Simonelli, F., Pierce, E.A., Pugh, E.N., Jr., Mingozzi, F., Bannicelli, J., Banfi, S., Marshall, K.A., Testa, F., Surace, E.M., *et al.* (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine* *358*, 2240-2248.
- Manno, C.S., Pierce, G.F., Arruda, V.R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J.J., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., *et al.* (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nature medicine* *12*, 342-347.
- 15 Martinez, P., and Blasco, M.A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature reviews. Cancer* *11*, 161-176.
- Mas, A., Montane, J., Anguela, X.M., Munoz, S., Douar, A.M., Riu, E., Otaegui, P., and Bosch, F. (2006). Reversal of type 1 diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle. *Diabetes* *55*, 1546-1553.
- Mason, P.J., and Bessler, M. (2011). The genetics of dyskeratosis congenita. *Cancer genetics* *204*, 635-645.
- 20 Matsushita, T., Elliger, S., Elliger, C., Podsakoff, G., Villarreal, L., Kurtzman, G.J., Iwaki, Y., and Colosi, P. (1998). Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene therapy* *5*, 938-945.
- Mavilio, F. (2012). Gene therapies need new development models. *Nature* *490*, 7.
- Niemeyer, G.P., Herzog, R.W., Mount, J., Arruda, V.R., Tillson, D.M., Hathcock, J., van Ginkel, F.W., High, K.A., and Lothrop, C.D., Jr. (2009). Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* *113*, 797-806.
- 25 O'Reilly, M., Shipp, A., Rosenthal, E., Jambou, R., Shih, T., Montgomery, M., Gargiulo, L., Patterson, A., and Corrigan-Curay, J. (2012). NIH oversight of human gene transfer research involving retroviral, lentiviral, and adeno-associated virus vectors and the role of the NIH recombinant DNA advisory committee. *Methods in enzymology* *507*, 313-335.
- 30 Samper, E., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2001). Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in *Terc*^{-/-} mice with short telomeres. *EMBO Rep* *2*, 800-807.
- Savage, S.A., and Alter, B.P. (2008). The role of telomere biology in bone marrow failure and other disorders. *Mechanisms of ageing and development* *129*, 35-47.
- Savage, S.A., Calado, R.T., Xin, Z.T., Ly, H., Young, N.S., and Chanock, S.J. (2006). Genetic variation in telomeric repeat binding factors 1 and 2 in aplastic anemia. *Experimental hematology* *34*, 664-671.
- 35 Stroes, E.S., Nierman, M.C., Meulenberg, J.J., Franssen, R., Twisk, J., Henny, C.P., Maas, M.M., Zwinderman, A.H., Ross, C., Aronica, E., *et al.* (2008). Intramuscular administration of AAV1-lipoprotein lipase S447X lowers triglycerides in lipoprotein lipase-deficient patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *28*, 2303-2304.
- 40 Tafuro, S., Ayuso, E., Zacchigna, S., Zentilin, L., Moimas, S., Dore, F., and Giacca, M. (2009). Inducible adeno-associated virus vectors promote functional angiogenesis in adult organisms via regulated vascular endothelial growth factor expression. *Cardiovascular research* *83*, 663-671.
- Tomas-Loba, A., Flores, I., Fernandez-Marcos, P.J., Cayuela, M.L., Maraver, A., Tejera, A., Borrás, C., Matheu, A., Klatt, P., Flores, J.M., *et al.* (2008). Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell* *135*, 609-622.
- 45 Walne, A.J., Vulliamy, T., Beswick, R., Kirwan, M., and Dokal, I. (2008). TINF2 mutations result in very short telomeres: analysis of a large cohort of patients with dyskeratosis congenita and related bone marrow failure syndromes. *Blood* *112*, 3594-3600.
- Yamaguchi, H., Baerlocher, G.M., Lansdorp, P.M., Chanock, S.J., Nunez, O., Sloand, E., and Young, N.S. (2003). Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* *102*, 916-918.

- Yamaguchi, H., Calado, R.T., Ly, H., Kajigaya, S., Baerlocher, G.M., Chanock, S.J., Lansdorp, P.M., and Young, N.S. (2005). Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *The New England journal of medicine* 352, 1413-1424.
- 5 Ziegler, P., Schrezenmeier, H., Akkad, J., Brassat, U., Vankann, L., Panse, J., Wilop, S., Balabanov, S., Schwarz, K., Martens, U.M., and Brummendorf, T.H. (2012). Telomere elongation and clinical response to androgen treatment in a patient with aplastic anemia and a heterozygous hTERT gene mutation. *Annals of hematology* 91, 1115-1120.
- 10 Ayuso, E., V. Blouin, M. Lock, S. McGorray, X. Leon, M. R. Alvira, A. Auricchio, S. Bucher, A. Chtarto, K. R. Clark, C. Darmon, M. Doria, W. Fountain, G. Gao, K. Gao, M. Giacca, J. Kleinschmidt, B. Leuchs, C. Melas, H. Mizukami, M. Muller, Y. Noordman, O. Bockstael, K. Ozawa, C. Pythoud, M. Sumaroka, R. Surosky, L. Tenenbaum, I. Van der Linden, B. Weins, J. F. Wright, X. Zhang, L. Zentilin, F. Bosch, R. O. Snyder & P. Moullier, (2014) Manufacturing and Characterization of a Recombinant Adeno-Associated Virus Type 8 Reference Standard Material. *Hum Gene Ther.*
- Ayuso, E., F. Mingozzi, J. Montane, X. Leon, X. M. Anguela, V. Haurigot, S. A. Edmonson, L. Africa, S. Zhou, K. A. High, F. Bosch & J. F. Wright, (2010) High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Ther* 17: 503-510.
- 15 Ball, S. E., F. M. Gibson, S. Rizzo, J. A. Tooze, J. C. Marsh & E. C. Gordon-Smith, (1998) Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood* 91: 3582-3592.
- Beier, F., M. Foronda, P. Martinez & M. A. Blasco, (2012) Conditional TRF1 knockout in the hematopoietic compartment leads to bone marrow failure and recapitulates clinical features of Dyskeratosis congenita. *Blood*.
- 20 Bernardes de Jesus, B., E. Vera, K. Schneeberger, A. M. Tejera, E. Ayuso, F. Bosch & M. A. Blasco, (2012) Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med* 4: 1-14.
- Blackburn, E. H., (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106: 661-673.
- Canela, A., P. Klatt & M. A. Blasco, (2007a) Telomere length analysis. *Methods Mol Biol* 371: 45-72.
- 25 Canela, A., E. Vera, P. Klatt & M. A. Blasco, (2007b) High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5300-5305.
- de Lange, T., (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19: 2100-2110.
- Dokal, I., (2011) Dyskeratosis congenita. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011: 480-486.
- Dokal, I. & T. Vulliamy, (2010) Inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica* 95: 1236-1240.
- 30 Flores, I., A. Canela, E. Vera, A. Tejera, G. Cotsarelis & M. A. Blasco, (2008) The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev* 22: 654-667.
- Flores, I., M. L. Cayuela & M. A. Blasco, (2005) Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science* 309: 1253-1256.
- 35 Harley, C. B., A. B. Futcher & C. W. Greider, (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460.
- Hiyama, E. & K. Hiyama, (2007) Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer* 96: 1020-1024.
- Maciejewski, J. P., S. Anderson, P. Katevas & N. S. Young, (1994) Phenotypic and functional analysis of bone marrow progenitor cell compartment in bone marrow failure. *Br J Haematol* 87: 227-234.
- 40 Marsh, J. C., S. E. Ball, J. Cavenagh, P. Darbyshire, I. Dokal, E. C. Gordon-Smith, J. Keidan, A. Laurie, A. Martin, J. Mercieca, S. B. Killick, R. Stewart & J. A. Yin, (2009) Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. *Br J Haematol* 147: 43-70.
- Martinez, P., M. Thanasoula, P. Munoz, C. Liao, A. Tejera, C. McNees, J. M. Flores, O. Fernandez-Capetillo, M. Tarsounas & M. A. Blasco, (2009) Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes Dev* 23: 2060-2075.
- 45 Matsushita, T., S. Elliger, C. Elliger, G. Podsakoff, L. Villarreal, G. J. Kurtzman, Y. Iwaki & P. Colosi, (1998) Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 5: 938-945.
- Nakao, S., (1997) Immune mechanism of aplastic anemia. *Int J Hematol* 66: 127-134.
- Samper, E., P. Fernandez, R. Eguia, L. Martin-Rivera, A. Bernad, M. A. Blasco & M. Aracil, (2002) Long-term

repopulating ability of telomerase-deficient murine hematopoietic stem cells. *Blood* 99: 2767-2775.

Samper, E., F. A. Goytisolo, P. Slijepcevic, P. P. van Buul & M. A. Blasco, (2000) Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep* 1: 244-252.

5 Scopes, J., M. Bagnara, E. C. Gordon-Smith, S. E. Ball & F. M. Gibson, (1994) Haemopoietic progenitor cells are reduced in aplastic anaemia. *Br J Haematol* 86: 427-430.

Vulliamy, T., A. Marrone, I. Dokal & P. J. Mason, (2002) Association between aplastic anaemia and mutations in telomerase RNA. *Lancet* 359: 2168-2170.

Wynn, R. F., M. A. Cross, C. Hatton, A. M. Will, L. S. Lashford, T. M. Dexter & N. G. Testa, (1998) Accelerated telomere shortening in young recipients of allogeneic bone-marrow transplants. *Lancet* 351: 178-181.

10 Young, N. S., R. T. Calado & P. Scheinberg (2006). Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood* 108: 2509-2519.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. HOFFMAN-LA ROCHE AG; FUNDACIÓN CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS CARLOS; UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

5 <120> Terapias basadas en la transcriptasa inversa de la telomerasa

<130> 32339

10 <150> EP14382312.8
<151> 2014-08-08

<160> 26

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 4018

20 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 1

	caggcagcgc tgcgtcctgc tgcgcacgtg ggaagccctg gccccggcca cccccgcgat	60
25	gccgcgcgct ccccgctgcc gagccgtgcg ctccctgctg cgcagccact accgcgaggt	120
	gctgccgctg gccacgttcg tgcggcgcct ggggccccag ggctggcggc tgggtgcagcg	180
	cggggacccg gcggctttcc gcgcgctggt ggcccagtgc ctggtgtgcg tgccctggga	240
	cgcacggccc cccccgcc ccccctcctt ccgccaggtg tcctgcctga aggagctggt	300
	ggcccagagt ctgcagaggc tgtgcgagcg cggcgcgaag aacgtgctgg ccttcggctt	360
30	cgcgctgctg gacggggccc gcgggggccc ccccgaggcc ttcaccacca gcgtgcgcag	420
	ctacctgccc aacacggtga ccgacgcaact gcgggggagc ggggcgtggg ggctgctgct	480
	gcgcgcgctg ggcgacgacg tgcctggttca cctgctggca cgctgcgcgc tctttgtgct	540
	ggtggctccc agctgcgcct accaggtgtg cgggcccgcg ctgtaccagc tcggcgctgc	600
	cactcaggcc cggccccgcg cacacgctag tggacccccga aggcgtctgg gatgcgaacg	660
35	ggcctggaac catagcgtca gggaggcccg ggtccccctg ggccctgccag ccccgggtgc	720
	gaggagggcg gggggcagtg ccagccgaag tctgccgttg cccaagaggc ccaggcgtgg	780
	cgctgccccct gagccggagc ggacgcccct tgggcagggg tcctgggccc acccgggagc	840
	gacgcgtgga ccgagtgacc gtggtttctg tgtggtgtca cctgccagac ccgccgaaga	900
	agccacctct ttggagggtg cgctctcttg cacgcgccac tcccaccat ccgtgggccc	960
40	ccagcaccac gcgggcccc catccacatc gcggccacca cgtccctggg acacgccttg	1020
	tccccgggtg tacgccgaga ccaagcaact cctctactcc tcaggcgaca aggagcagct	1080
	gcggccctcc ttccctactca gctctctgag gcccgacctg actggcgctc ggaggctcgt	1140
	ggagaccatc tttctgggtt ccaggccctg gatgccaggg actccccgca ggttgccccg	1200
	cctgccccag cgctactggc aaatgcggcc cctgtttctg gagctgcttg ggaaccacgc	1260
45	gcagtgcccc tacggggtgc tcctcaagac gcactgccc ctgcgagctg cggtcacccc	1320
	agcagccggt gtctgtgccc gggagaagcc ccagggctct gtggcggccc ccgaggagga	1380
	ggacacagac ccccgctgcc tgggtgcagct gctccgccag cacagcagcc cctggcaggt	1440
	gtacggcttc gtgcgggccc gctgcgccc gctggtgccc ccaggcctct ggggctccag	1500
	gcacaacgaa gcgcgcttcc tcaggaacac caagaagttc atctccctgg ggaagcatgc	1560
50	caagctctcg ctgcaggagc tgacgtggaa gatgagcgtg cgggactgcg cttggctgcg	1620
	caggagccca ggggttggtt gtgttccggc cgcagagcac cgtctgctg aggagatcct	1680
	ggccaagttc ctgcaactggc tgatgagtgt gtacgtcgtc gagctgctca ggtctttctt	1740
	ttatgtcacg gagaccagct ttcaaaagaa caggctcttt ttctaccgga agagtgtctg	1800
	gagcaagttg caaagcattg gaatcagaca gcacttgaag aggggtgcagc tgcgggagct	1860
55	gtcgggaagca gaggtcaggc agcatcggga agccaggccc gcctgctga cgtccagact	1920
	ccgcttcacg cccaagcctg acgggctgcg gccgattgtg aacatggact acgtcgtggg	1980

ES 2 729 872 T3

agccagaacg ttccgcagag aaaagagggc cgagcgtctc acctcgaggg tgaaggcact 2040
gttcagcgtg ctcaactacg agcggggcgc gcgccccggc ctccctgggc cctctgtgct 2100
gggcctggac gatatccaca gggcctggcg caccttcgtg ctgcggtgtgc gggcccagga 2160
cccgcgcct gagctgtact ttgtcaaggt ggatgtgacg ggcgcgtaac acaccatccc 2220
5 ccaggacagg ctcacggagg tcatcgccag catcatcaaa cccagaaca cgtactgctg 2280
gcgtcgggtat gccgtggtcc agaaggccgc ccatgggcac gtccgcaagg ccttcaagag 2340
ccacgtctct accttgacag acctccagcc gtacatgcga cagttcgtgg ctcacctgca 2400
ggagaccagc ccgctgaggg atgccgtcgt catcgagcag agctcctccc tgaatgaggc 2460
cagcagtggc ctcttcgacg tcttcctacg ctccatgtgc caccacgcgc tgcgcatcag 2520
10 gggcaagtcc tacgtccagt gccaggggat cccgcagggc tccatcctct ccacgctgct 2580
ctgcagcctg tgctacggcg acatggagaa caagctgttt gcggggattc ggcgggacgg 2640
gctgctcctg cgtttggtgg atgatttctt gttggtgaca cctcacctca cccacgcgaa 2700
aaccttcctc aggaccctgg tccgaggtgt ccctgagtat ggctgcgtgg tgaacttgcg 2760
gaagacagtg gtgaacttcc ctgtagaaga cgaggccctg ggtggcacgg cttttgttca 2820
15 gatgccggcc cacggcctat tcccctgggtg cggcctgctg ctggataccc ggaccctgga 2880
ggtgcagagc gactactcca gctatgccc gacctccatc agagccagtc tcaccttcaa 2940
ccgcggtctc aaggctggga ggaacatgcg tcgcaaactc tttggggtct tgcggctgaa 3000
gtgtcacagc ctgtttctg atttgcaggt gaacagcctc cagacggtgt gcaccaacat 3060
ctacaagatc ctctgctgc aggcgtacag gtttcacgca tgtgtgctgc agctcccatt 3120
20 tcatcagcaa gtttggaaga accccacatt tttcctgcgc gtcactctctg acacggcctc 3180
cctctgctac tccatcctga aagccaagaa cgcagggatg tcgctggggg ccaagggcgc 3240
cgcggccct ctgccctcc aggcctgca gtggctgtgc caccaagcat tctgtctca 3300
gctgactcga caccgtgtca cctacgtgcc actcctgggg tcaactcagga cagcccagac 3360
gcagctgagt cggaaagctcc cggggacgac gctgactgcc ctggaggccg cagccaacc 3420
25 ggcactgccc tcagacttca agaccatcct ggactgatgg ccacccgccc acagccaggc 3480
cgagagcaga caccagcagc cctgtcacgc cgggctctac gtcccagga gggagggcg 3540
gcccacacc aggcccgac cgctgggagt ctgaggcctg agtgagtgtt tggccgaggc 3600
ctgcatgtcc ggctgaaggc tgagtgtccg gctgaggcct gagcgagtgt ccagccaagg 3660
gctgagtgtc cagcacacct gccgtcttca ctccccaca ggctggcgct cggctccacc 3720
30 ccagggccag cttttcctca ccaggagccc ggcttccact cccacatag gaatagtcca 3780
tcccagatt cgccattgtt caccctcgc cctgccctcc tttgccttcc acccccacca 3840
tccaggtgga gaccctgaga aggaccctgg gagctctggg aatttgaggt gaccaaagg 3900
gtgccctgta cacaggcgag gaccctgcac ctggatgggg gtcctgtgg gtcaaattgg 3960
35 ggggaggtgc tgtgggagta aaatactgaa tatatgagtt tttcagtttt gaaaaaaa 4018

<210> 2
<211> 1132
<212> PRT
40 <213> Homo sapiens

<400> 2
Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
1 5 10 15
45 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
50 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

ES 2 729 872 T3

	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		
5	Glu	Ala	Phe	Thr	Thr	Ser	Val	Arg	Ser	Tyr	Leu	Pro	Asn	Thr	Val	Thr
			115					120					125			
	Asp	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Arg	Val
		130					135					140				
10	Gly	Asp	Asp	Val	Leu	Val	His	Leu	Leu	Ala	Arg	Cys	Ala	Leu	Phe	Val
	145					150					155					160
	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
				180					185					190		
15	Pro	Arg	Arg	Arg	Leu	Gly	Cys	Glu	Arg	Ala	Trp	Asn	His	Ser	Val	Arg
			195					200					205			
	Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Arg	Arg	Arg
		210					215					220				
20	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	Pro	Leu	Pro	Lys	Arg	Pro	Arg	Arg
	225					230					235					240
	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
				260					265					270		
25	Val	Ser	Pro	Ala	Arg	Pro	Ala	Glu	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Gly	Ala
			275					280					285			
	Leu	Ser	Gly	Thr	Arg	His	Ser	His	Pro	Ser	Val	Gly	Arg	Gln	His	His
		290					295					300				
30	Ala	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Trp	Asp	Thr	Pro
	305					310					315					320
	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		
35	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				
40	Arg	Tyr	Trp	Gln	Met	Arg	Pro	Leu	Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Asn	His
	385					390					395					400
	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		
45	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				
50	Val	Arg	Ala	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	Leu	Trp	Gly	Ser
	465						470					475				480
	Arg	His	Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Leu	Arg	Asn	Thr	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser
					485					490					495	

ES 2 729 872 T3

	Leu	Gly	Lys	His	Ala	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Thr	Trp	Lys	Met
				500					505					510		
	Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ala	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Val	Gly	Cys
			515					520					525			
5	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
10	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		
	Leu	Lys	Arg	Val	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Gln
			595					600					605			
15	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile
		610					615					620				
	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Asn	Met	Asp	Tyr	Val	Val
	625					630					635					640
20	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		
	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Leu	Asp	Asp	Ile	His	Arg
			675					680					685			
25	Ala	Trp	Arg	Thr	Phe	Val	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Gln	Asp	Pro	Pro	Pro
		690					695					700				
	Glu	Leu	Tyr	Phe	Val	Lys	Val	Asp	Val	Thr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Thr	Ile
	705					710					715					720
30	Pro	Gln	Asp	Arg	Leu	Thr	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Ile	Ile	Lys	Pro	Gln
					725					730					735	
	Asn	Thr	Tyr	Cys	Val	Arg	Arg	Tyr	Ala	Val	Val	Gln	Lys	Ala	Ala	His
				740					745					750		
	Gly	His	Val	Arg	Lys	Ala	Phe	Lys	Ser	His	Val	Ser	Thr	Leu	Thr	Asp
			755					760					765			
35	Leu	Gln	Pro	Tyr	Met	Arg	Gln	Phe	Val	Ala	His	Leu	Gln	Glu	Thr	Ser
		770					775					780				
	Pro	Leu	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Ile	Glu	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Asn	Glu
	785					790					795					800
40	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	Phe	Leu	Arg	Phe	Met	Cys	His	His
					805					810					815	
	Ala	Val	Arg	Ile	Arg	Gly	Lys	Ser	Tyr	Val	Gln	Cys	Gln	Gly	Ile	Pro
					820					825				830		
	Gln	Gly	Ser	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu	Cys	Tyr	Gly	Asp
			835					840					845			
45	Met	Glu	Asn	Lys	Leu	Phe	Ala	Gly	Ile	Arg	Arg	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu
		850					855					860				
	Arg	Leu	Val	Asp	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Thr	Pro	His	Leu	Thr	His	Ala
	865					870					875					880
50	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Gly	Val	Pro	Glu	Tyr	Gly	Cys
					885					890					895	
	Val	Val	Asn	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Asn	Phe	Pro	Val	Glu	Asp	Glu
				900						905					910	

ES 2 729 872 T3

	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					
5	Asp	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ala	Arg	Thr	Ser	Ile	Arg	Ala	Ser	Leu	Thr	Phe	
	945				950					955						960	
	Asn	Arg	Gly	Phe	Lys	Ala	Gly	Arg	Asn	Met	Arg	Arg	Lys	Leu	Phe	Gly	
				965					970						975		
10	Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Cys	His	Ser	Leu	Phe	Leu	Asp	Leu	Gln	Val	Asn	
				980				985						990			
	Ser	Leu	Gln	Thr	Val	Cys	Thr	Asn	Ile	Tyr	Lys	Ile	Leu	Leu	Leu	Gln	
			995					1000					1005				
	Ala	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Cys	Val	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	His	Gln	Gln	
		1010				1015						1020					
15	Val	Trp	Lys	Asn	Pro	Thr	Phe	Phe	Leu	Arg	Val	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	
	1025				1030						1035					1040	
	Ser	Leu	Cys	Tyr	Ser	Ile	Leu	Lys	Ala	Lys	Asn	Ala	Gly	Met	Ser	Leu	
				1045						1050					1055		
20	Gly	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Ala	Val	Gln	Trp	
				1060					1065						1070		
	Leu	Cys	His	Gln	Ala	Phe	Leu	Leu	Lys	Leu	Thr	Arg	His	Arg	Val	Thr	
			1075					1080					1085				
	Tyr	Val	Pro	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Arg	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Leu	Ser	
		1090				1095						1100					
25	Arg	Lys	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Asn	
	1105					1110					1115					1120	
	Pro	Ala	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Asp					
				1125						1130							
30	<210>	3															
	<211>	3982															
	<212>	ADN															
	<213>	Homo sapiens															
35	<400>	3															
	caggcagcgc	tgcgtcctgc	tgcgcacgtg	ggaagccctg	gccccggcca	ccccgcgat										60	
	gccgcgcgct	ccccgctgcc	gagccgtgcg	ctccctgctg	cgcagccact	accgcgaggt										120	
	gctgccgctg	gccacgttcg	tgcggcgcct	ggggccccag	ggctggcggc	tgggtgcagcg										180	
40	cggggaccgg	gcggctttcc	gcgcgctggt	ggcccagtcg	ctgggtgtgcg	tgccctggga										240	
	cgcacggccg	ccccccgccc	ccccctcctt	ccgccaggtg	tccctgcctga	aggagctggt										300	
	ggccccgagt	ctgcagaggc	tgtgcgagcg	cggcgcgaag	aacgtgctgg	ccttcggctt										360	
	cgcgctgctg	gacggggccc	gcgggggccc	ccccgaggcc	ttcaccacca	gcgtgcgcag										420	
	ctacctgccc	aacacggtga	ccgacgcact	gcgggggagc	ggggcgtggg	ggctgctgct										480	
45	gcgcgcgctg	ggcgacgacg	tgtctggttca	cctgctggca	cgtctgcgcg	tctttgtgct										540	
	ggtggctccc	agctgcgcct	accaggtgtg	cgggcccggc	ctgtaccagc	tcggcgctgc										600	
	cactcaggcc	cggccccgcg	cacacgctag	tggaccccga	aggcgtctgg	gatgcgaacg										660	
	ggcctggaac	catagcgtca	gggaggccgg	ggtccccctg	ggcctgccag	ccccgggtgc										720	
	gaggaggcgc	gggggcagtg	ccagccgaag	tctgccgttg	cccaagaggc	ccaggcgtgg										780	
50	cgtctcccct	gagccggagc	ggacgcccgt	tgggcagggg	tccctgggccc	accggggcag										840	
	gacgcgtgga	ccgagtgacc	gtggtttctg	tgtggtgtca	cctgccagac	ccgccgaaga										900	
	agccacctct	ttggagggtg	cgctctctgg	cacgcgccac	tcccacccat	ccgtgggccc										960	
	ccagcaccac	gcgggcccc	catccacatc	gcggccacca	cgtccctggg	acacgccttg										1020	

ES 2 729 872 T3

	tccccgggtg	tacgccgaga	ccaagcactt	cctctactcc	tcaggcgaca	aggagcagct	1080
	gcggccctcc	ttcctactca	gctctctgag	gcccagcctg	actggcgctc	ggaggctcgt	1140
	ggagaccatc	tttctgggtt	ccaggccctg	gatgccaggg	actccccgca	ggttgccccg	1200
	cctgccccag	cgctactggc	aaatgcggcc	cctgtttctg	gagctgcttg	ggaaccacgc	1260
5	gcagtgcccc	tacgggggtg	tctcaagac	gcactgcccg	ctgcgagctg	cggtcacccc	1320
	agcagccggt	gtctgtgccc	gggagaagcc	ccagggctct	gtggcgggcc	ccgaggagga	1380
	ggacacagac	ccccgtcgcc	tggtgcagct	gctccgccag	cacagcagcc	cctggcaggt	1440
	gtacggcttc	gtgcgggcct	gcctgcgccc	gctggtgccc	ccaggcctct	ggggctccag	1500
	gcacaacgaa	cgccgcttcc	tcaggaacac	caagaagttc	atctccctgg	ggaagcatgc	1560
10	caagctctcg	ctgcaggagc	tgacgtggaa	gatgagcgtg	cgggactgcg	cttggctgcy	1620
	caggagccca	ggggttggct	gtgttccggc	cgagagcac	cgtctgctg	aggagatcct	1680
	ggccaagttc	ctgcaactgg	tgatgagtgt	gtacgtcgtc	gagctgctca	ggtctttctt	1740
	ttatgtcacg	gagaccacgt	ttcaaaagaa	caggctcttt	ttctaccgga	agagtgtctg	1800
	gagcaagtgt	caaagcattg	gaatcagaca	gcacttgaag	agggtgcagc	tgcgggagct	1860
15	gtcgggaagca	gaggtcaggc	agcatcggga	agccaggccc	gccctgctga	cgtccagact	1920
	ccgcttcatc	ccaagcctg	acgggctgcy	gccgattgtg	aacatggact	acgtcgtggg	1980
	agccagaacg	ttccgcagag	aaaagagggc	cgagcgtctc	acctcgaggg	tgaaggcact	2040
	gttcagcgtg	ctcaactacg	agcgggcgcy	gcgccccgcy	ctcctgggcy	cctctgtgct	2100
	gggcctggac	gatatccaca	gggcctggcy	caccttcgty	ctgcgtgtgc	gggccagga	2160
20	cccgcgcct	gagctgtact	ttgtcaagga	caggctcacg	gaggtcatcg	ccagcatcat	2220
	caaaccccag	aacacgtact	gcgtgcgctg	gtatgccctg	gtccagaagg	ccgcccatgg	2280
	gcacgtccgc	aaggccttca	agagccacgt	ctctaccttg	acagacctcc	agccgtacat	2340
	gcgacagttc	gtggetcacc	tgcaggagac	cagcccgtg	agggatgccg	tcgtcatcga	2400
	gcagagctcc	tcctgaatg	aggccagcag	tggcctcttc	gacgtcttcc	tacgcttcat	2460
25	gtgccaccac	gccgtgcyca	tcaaggggca	gtcctacgty	cagtgccagg	ggatcccgca	2520
	gggctccatc	ctctccacgc	tgetctgcag	cctgtgctac	ggcgacatgg	agaacaagct	2580
	gtttgcgggg	attcggcggy	acgggctgct	cctgcgtttg	gtggatgatt	tcttgttgg	2640
	gacacctcac	ctcaccacg	cgaaaacctt	cctcaggacc	ctgggtccgag	gtgtccctga	2700
	gtatggctgc	gtggtgaact	tgcggaagac	agtgggtgaac	ttccctgtag	aagacgaggc	2760
30	cctgggtggc	acggcttttg	ttcagatgcc	ggcccacggc	ctattcccct	ggtgcggcct	2820
	gctgctggat	accgggacct	tggaggtgca	gagcgactac	tccagctatg	cccggacctc	2880
	catcagagcc	agtctcacct	tcaaccgcyg	cttcaaggct	gggaggaaca	tgcgtcgcaa	2940
	actctttggg	gtcttgcygc	tgaagtgtca	cagcctgttt	ctggatttgc	aggtgaacag	3000
	cctccagacg	gtgtgcacca	acatctacaa	gatcctcctg	ctgcaggcgt	acaggtttca	3060
35	cgcatgtgtg	ctgcagctcc	catttcatca	gcaagtttgg	aagaacccca	catttttctc	3120
	gcgogtcatc	tctgacacgg	cctccctctg	ctactccatc	ctgaaagcca	agaacgcagg	3180
	gatgtcgctg	ggggccaagg	gcgcccgcgg	ccctctgccc	tccgaggccg	tgcagtggct	3240
	gtgccaccaa	gcattcctgc	tcaagctgac	togacaccgt	gtcacctacg	tgccactcct	3300
	ggggtcactc	aggacagccc	agacgcagct	gagtcggaag	ctccccggga	cgacgctgac	3360
40	tgccctggag	gccgcagcca	accggcact	gccctcagac	ttcaagacca	tcctggactg	3420
	atggccaccc	gcccacagcc	aggccgagag	cagacaccag	cagccctgtc	acgccgggct	3480
	ctacgtccca	gggagggagg	ggcgccccac	accagggccc	gcaccgctgg	gagtctgagg	3540
	cctgagtgag	tgtttggcgg	aggcctgcat	gtccggctga	aggctgagtg	tccggctgag	3600
	gcctgagcga	gtgtccagcc	aagggctgag	tgtccagcac	acctgccgtc	ttcacttccc	3660
45	cacaggctgg	cgctcggctc	caccccaggg	ccagcttttc	ctcaccagga	gcccgcttc	3720
	cactccccac	ataggaatag	tccatcccca	gattcgccat	tgttcacccc	tgcacctgcc	3780
	ctcctttgce	ttccaccccc	accatccagg	tggagaccct	gagaaggacc	ctgggagctc	3840
	tgggaatttg	gagtgaccaa	aggtgtgccc	tgtacacagg	cgaggaccct	gcacctggat	3900

ES 2 729 872 T3

gggggtccct gtgggtcaaa ttgggggggag gtgctgtggg agtaaaatac tgaatatatg 3960
 agtttttcag ttttgaaaaa aa 3982

5 <210> 4
 <211> 1120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 4
 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
 20 25 30

15 Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
 35 40 45
 Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
 50 55 60

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

25 Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr
 115 120 125
 Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val
 130 135 140

30 Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val
 145 150 155 160
 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
 180 185 190

35 Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg
 195 200 205
 Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg
 210 215 220

40 Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg
 225 230 235 240
 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
 260 265 270

45 Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala
 275 280 285
 Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His
 290 295 300

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

55 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

ES 2 729 872 T3

Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His
 385 390 395 400
 Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg
 405 410 415
5 Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln
 420 425 430
 Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu
 435 440 445
10 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
 Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser
 485 490 495
15 Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met
 500 505 510
 Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys
 515 520 525
20 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
 Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr
 565 570 575
25 Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His
 580 585 590
 Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln
 595 600 605
30 His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 610 615 620
 Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val
 625 630 635 640
 Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser
 645 650 655
35 Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg
 660 665 670
 Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg
 675 680 685
40 Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro
 690 695 700
 Glu Leu Tyr Phe Val Lys Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile
 705 710 715 720
 Ile Lys Pro Gln Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln
 725 730 735
45 Lys Ala Ala His Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser
 740 745 750
 Thr Leu Thr Asp Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu
 755 760 765
50 Gln Glu Thr Ser Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser
 770 775 780
 Ser Leu Asn Glu Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe
 785 790 795 800
 Met Cys His His Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys
 805 810 815
55 Gln Gly Ile Pro Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu
 820 825 830

ES 2 729 872 T3

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
850 855 860
5 Leu Thr His Ala Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro
865 870 875 880
Glu Tyr Gly Cys Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro
885 890 895
10 Val Glu Asp Glu Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala
900 905 910
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
15 Ser Leu Thr Phe Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg
945 950 955 960
Lys Leu Phe Gly Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp
965 970 975
20 Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile
980 985 990
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
25 Ser Asp Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala
1025 1030 1035 1040
Gly Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu
1045 1050 1055
30 Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg
1060 1065 1070
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
35 Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp
1105 1110 1115 1120

<210> 5
40 <211> 3426
<212> ADN
<213> Mus musculus
<400> 5
gtgggaggcc catcccggcc ttgagcacia tgaccgcgc tcctcgttgc cccgcggtgc 60
45 gctctctgct gcgcagccga taccgggagg tgtggccgct ggcaaccttt gtgcggcgcc 120
tggggcccga gggcaggcgg cttgtgcaac ccggggacc gaagatctac cgcactttgg 180
ttgoccaatg cctagtgtgc atgcactggg gctcacagcc tccacctgcc gacctttcct 240
tccaccaggt gtcacccctg aaagagctgg tggccagggt tgtgcagaga ctctgcgagc 300
gcaacgagag aaacgtgctg gcttttggct ttgagctgct taacgaggcc agaggcgggc 360
50 ctcccatggc cttcactagt agcgtgcgta gctacttgcc caacactggt attgagacct 420
tgcggtgctag tgggtgcatgg atgctactgt tgagccgagt gggcgacgac ctgctggtct 480
acctgctggc aactgtgtct ctttatcttc tgggtgcccc cagctgtgcc taccaggtgt 540
gtgggtctcc cctgtaccaa atttgtgcca ccacggatat ctggccctct gtgtccgcta 600
gttacaggcc caccgaccc gtgggcagga atttcactaa ccttaggttc ttacaacaga 660
55 tcaagagcag tagtcgccag gaagcaccga aaccctggc cttgccatct cgaggtataa 720
agaggcatct gagtctcacc agtacaagtg tgccttcagc taagaaggcc agatgctatc 780

ES 2 729 872 T3

	ctgtcccagag	agtggaggag	ggaccccaca	ggcaggtgct	accaacccca	tcaggcaaat	840
	catgggtgcc	aagtccctgct	cggtcccccg	aggtgcctac	tgcagagaaa	gatttgtctt	900
	ctaaaggaaa	ggtgtctgac	ctgagtcctc	ctgggtcggg	gtgctgtaaa	cacaagccca	960
	gctccacatc	tctgctgtca	ccaccccggc	aaaatgcctt	tcagctcagg	ccatttattg	1020
5	agaccagaca	tttcctttac	tccaggggag	atggccaaga	gcgtctaaac	ccctcattcc	1080
	tactcagcaa	cctccagcct	aacttgactg	gggccaggag	actggtggag	atcatctttc	1140
	tgggctcaag	gcctaggaca	tcaggaccac	tctgcaggac	acaccgtcta	tcgctcgat	1200
	actggcagat	gcggcccctg	ttccaacagc	tgctggtgaa	ccatgcagag	tgccaatatg	1260
	tcagactcct	caggtcacat	tgcaggtttc	gaacagcaaa	ccaacagggtg	acagatgcct	1320
10	tgaacaccag	cccaccgcac	ctcatggatt	tgctccgcct	gcacagcagt	ccctggcagg	1380
	tatatgggtt	tcttcggggc	tgtctctgca	aggtgggtgc	tgctagtctc	tggggtagca	1440
	ggcacaatga	gcgcccgttc	tttaagaact	taaagaagtt	catctcgttg	gggaaatagc	1500
	gcaagctatc	actgcaggaa	ctgatgtgga	agatgaaagt	agaggattgc	cactggctcc	1560
	gcagcagccc	ggggaaggac	cgtgtccccg	ctgcagagca	ccgtctgagg	gagaggatcc	1620
15	tggctacgtt	cctgttctgg	ctgatggaca	catacgtggt	acagctgctt	aggtcattct	1680
	tttacatcac	agagagcaca	ttccagaaga	acaggctcct	cttctaccgt	aagagtgtgt	1740
	ggagcaagct	gcagagcatt	ggagtcaggc	aacaccttga	gagagtgcgg	ctacgggagc	1800
	tgtcacaaga	ggaggtcagg	catcaccagg	acacctggct	agccatgcc	atctgcagac	1860
	tgcgcttcat	ccccaaagccc	aacggcctgc	ggcccattgt	gaacatgagt	tatagcatgg	1920
20	gtaccagagc	tttgggcaga	aggaagcagg	cccagcattt	caccacagcgt	ctcaagactc	1980
	tcttcagcat	gctcaactat	gagcggacaa	aacatcctca	ccttatgggg	tcttctgtac	2040
	tgggtatgaa	tgacatctac	aggacctggc	gggcctttgt	gctgcgtgtg	cgtgctctgg	2100
	accagacacc	caggatgtac	tttgtttaagg	cagatgtgac	cggggcctat	gatgccatcc	2160
	cccagggtaa	gctggtggag	gttgttgcca	atatgatcag	gcactcggag	agcacgtact	2220
25	gtatccgcca	gtatgcagtg	gtccggagag	atagccaagg	ccaagtccac	aagtccctta	2280
	ggagacaggt	caccaccctc	tctgacctcc	agccatacat	gggccagttc	cttaagcatc	2340
	tgcaggattc	agatgccagt	gcactgagga	actccgttgt	catcgagcag	agcatctcta	2400
	tgaatgagag	cagcagcagc	ctgtttgact	tcttctctgca	cttctctgcgt	cacagtgtcg	2460
	taaagattgg	tgacaggtgc	tatacgcagt	gccagggcat	ccccagggc	tccagcctat	2520
30	ccacctgct	ctgcagtcct	tgtttcggag	acatggagaa	caagctgttt	gctgaggtgc	2580
	agcgggatgg	gttgctttta	cgttttgttg	atgactttct	gttggtgacg	cctcacttgg	2640
	accaagcaaa	aaccttcctc	agcaccctgg	tccatggcgt	tcctgagtat	gggtgcatga	2700
	taaacttgca	gaagacagtg	gtgaacttcc	ctgtggagcc	tggtagcctg	gggtggtgag	2760
	ctccatacca	gctgcctgct	cactgcctgt	ttccctgggt	tggcttgcct	ctggacactc	2820
35	agactttgga	ggtgttctgt	gactactcag	gttatgccca	gacctcaatt	aagacgagcc	2880
	tcaccttcca	gagtgtcttc	aaagctggga	agacctgcg	gaacaagctc	ctgtcggctc	2940
	tgcggttgaa	gtgtcacggt	ctatctctag	acttgcaggt	gaacagcctc	cagacagtct	3000
	gcatcaatat	atacaagatc	ttcctgcttc	aggcctacag	gttccatgca	tgtgtgattc	3060
	agcttccctt	tgaccagcgt	gttaggaaga	acctcacatt	ctttctgggc	atcatctcca	3120
40	gccaaagcatc	ctgctgctat	gctatcctga	aggtcaagaa	tccaggaatg	acactaaagg	3180
	cctctggctc	ctttcctcct	gaagccgcac	attggctctg	ctaccaggcc	ttcctgctca	3240
	agctggctgc	tcattctgtc	atctacaaat	gtctcctggg	acctctgagg	acagcccaaa	3300
	aactgctgtg	ccggaagctc	ccagaggcga	caatgacat	ccttaaagct	gcagctgacc	3360
	cagccctaag	cacagacttt	cagaccattt	tggactaacc	ctgtctcctt	ccgctagatg	3420
45	aacatg						3426
	<210>	6					
	<211>	1122					
50	<212>	PRT					

ES 2 729 872 T3

<213> Mus musculus
 <400> 6
 Met Thr Arg Ala Pro Arg Cys Pro Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 5 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
 10 Thr Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Met His Trp Gly Ser Gln Pro
 50 55 60
 Pro Pro Ala Asp Leu Ser Phe His Gln Val Ser Ser Leu Lys Glu Leu
 65 70 75 80
 Val Ala Arg Val Val Gln Arg Leu Cys Glu Arg Asn Glu Arg Asn Val
 85 90 95
 15 Leu Ala Phe Gly Phe Glu Leu Leu Asn Glu Ala Arg Gly Gly Pro Pro
 100 105 110
 Met Ala Phe Thr Ser Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Ile
 115 120 125
 20 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
 Leu Val Pro Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Ser Pro Leu Tyr
 165 170 175
 25 Gln Ile Cys Ala Thr Thr Asp Ile Trp Pro Ser Val Ser Ala Ser Tyr
 180 185 190
 Arg Pro Thr Arg Pro Val Gly Arg Asn Phe Thr Asn Leu Arg Phe Leu
 195 200 205
 30 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
 Val Pro Ser Ala Lys Lys Ala Arg Cys Tyr Pro Val Pro Arg Val Glu
 245 250 255
 35 Glu Gly Pro His Arg Gln Val Leu Pro Thr Pro Ser Gly Lys Ser Trp
 260 265 270
 Val Pro Ser Pro Ala Arg Ser Pro Glu Val Pro Thr Ala Glu Lys Asp
 275 280 285
 40 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
 Gln Asn Ala Phe Gln Leu Arg Pro Phe Ile Glu Thr Arg His Phe Leu
 325 330 335
 45 Tyr Ser Arg Gly Asp Gly Gln Glu Arg Leu Asn Pro Ser Phe Leu Leu
 340 345 350
 Ser Asn Leu Gln Pro Asn Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Ile
 355 360 365
 50 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
 Leu Leu Val Asn His Ala Glu Cys Gln Tyr Val Arg Leu Leu Arg Ser
 405 410 415
 55 His Cys Arg Phe Arg Thr Ala Asn Gln Gln Val Thr Asp Ala Leu Asn
 420 425 430

ES 2 729 872 T3

Thr Ser Pro Pro His Leu Met Asp Leu Leu Arg Leu His Ser Ser Pro
 435 440 445
 Trp Gln Val Tyr Gly Phe Leu Arg Ala Cys Leu Cys Lys Val Val Ser
 450 455 460
5 Ala Ser Leu Trp Gly Thr Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Phe Lys Asn
 465 470 475 480
 Leu Lys Lys Phe Ile Ser Leu Gly Lys Tyr Gly Lys Leu Ser Leu Gln
 485 490 495
10 Glu Leu Met Trp Lys Met Lys Val Glu Asp Cys His Trp Leu Arg Ser
 500 505 510
 Ser Pro Gly Lys Asp Arg Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu
 515 520 525
 Arg Ile Leu Ala Thr Phe Leu Phe Trp Leu Met Asp Thr Tyr Val Val
 530 535 540
15 Gln Leu Leu Arg Ser Phe Phe Tyr Ile Thr Glu Ser Thr Phe Gln Lys
 545 550 555 560
 Asn Arg Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser
 565 570 575
20 Ile Gly Val Arg Gln His Leu Glu Arg Val Arg Leu Arg Glu Leu Ser
 580 585 590
 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
 610 615 620
25 Asn Met Ser Tyr Ser Met Gly Thr Arg Ala Leu Gly Arg Arg Lys Gln
 625 630 635 640
 Ala Gln His Phe Thr Gln Arg Leu Lys Thr Leu Phe Ser Met Leu Asn
 645 650 655
30 Tyr Glu Arg Thr Lys His Pro His Leu Met Gly Ser Ser Val Leu Gly
 660 665 670
 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
 690 695 700
35 Gly Ala Tyr Asp Ala Ile Pro Gln Gly Lys Leu Val Glu Val Val Ala
 705 710 715 720
 Asn Met Ile Arg His Ser Glu Ser Thr Tyr Cys Ile Arg Gln Tyr Ala
 725 730 735
40 Val Val Arg Arg Asp Ser Gln Gly Gln Val His Lys Ser Phe Arg Arg
 740 745 750
 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
 770 775 780
45 Ile Glu Gln Ser Ile Ser Met Asn Glu Ser Ser Ser Ser Leu Phe Asp
 785 790 795 800
 Phe Phe Leu His Phe Leu Arg His Ser Val Val Lys Ile Gly Asp Arg
 805 810 815
50 Cys Tyr Thr Gln Cys Gln Gly Ile Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ser Thr
 820 825 830
 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
 850 855 860
55 Leu Val Thr Pro His Leu Asp Gln Ala Lys Thr Phe Leu Ser Thr Leu
 865 870 875 880

ES 2 729 872 T3

	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		
5	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		
	930		935	940		
10	Thr Ser Ile Lys	Thr Ser Leu Thr	Phe Gln Ser Val	Phe Lys Ala Gly		
	945	950	955	960		
	Lys Thr Met Arg	Asn Lys Leu Leu	Ser Val Leu Arg	Leu Lys Cys His		
		965	970	975		
	Gly Leu Phe Leu	Asp Leu Gln Val	Asn Ser Leu Gln	Thr Val Cys Ile		
		980	985	990		
15	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		
20	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		
	Pro Glu Ala Ala	His Trp Leu Cys	Tyr Gln Ala Phe	Leu Leu Lys Leu		
		1060	1065	1070		
25	Ala Ala His Ser	Val Ile Tyr Lys	Cys Leu Leu Gly	Pro Leu Arg Thr		
	1075		1080	1085		
	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> ADN					
	<213> Secuencia artificial					
40	<220>					
	<223> Cebador					
	<400> 7					
45	ggcaccacac cttctacaat g					21
	<210> 8					
	<211> 18					
	<212> ADN					
50	<213> Secuencia artificial					
	<220>					
	<223> Cebador					
55	<400> 8					
	gtggtggtga agctgtag					18
	<210> 9					
60	<211> 18					
	<212> ADN					
	<213> Secuencia artificial					
	<220>					

ES 2 729 872 T3

<223> Cebador
 <400> 9
 5 ggattgccac tggctccg 18

 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 10
 tgcttgacct cctcttgga c 21

 <210> 11
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Cebador

 <400> 11
 30 cgtaccccga ttcaggtgat 20

 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 12
 ttgagcagaa gagctgctac gt 22

 <210> 13
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 13
 ggcaaagtgg agaggatcga c 21

 <210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 14
 65 tcgtggctgt tgcgtagg 18

 <210> 15
 <211> 19
 <212> ADN
 70 <213> Secuencia artificial

 <220>

ES 2 729 872 T3

	<223> Cebador	
	<400> 15	
5	tgcgccctcc gtatcttac	19
	<210> 16	
	<211> 22	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 16	
	atcttagagg ccacgaacat gc	22
	<210> 17	
20	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador	
	<400> 17	
	cagcctactg gagatcagga tga	23
30	<210> 18	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 18	
40	ggagtccttg gatgagtctc ga	22
	<210> 19	
	<211> 24	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 19	
	gcgaactcac acaggcgaga aacc	24
55	<210> 20	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 20	
65	tcgcttctc ttctctcgac aca	23
	<210> 21	
	<211> 19	
	<212> ADN	
70	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 729 872 T3

	<223> Cebador	
	<400> 21	
5	cccattgccc ctgctcctg	19
	<210> 22	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 22	
	tgtgtccgcc ggtgtctgg	19
	<210> 23	
20	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador	
	<400> 23	
	caattacggg gtcattagtt catagc	26
30	<210> 24	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 24	
40	atacgtagat gtactgccaa gtagga	26
	<210> 25	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 25	
	cttctgcca caatgtcaca g	21
55	<210> 26	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 26	
	cctttctcat gcttgcttct ctg	23

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) para su uso en el tratamiento de la anemia aplásica.
2. El vector de ácido nucleico para su uso según la reivindicación 1, en el que la TERT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.
- 10 3. El vector de ácido nucleico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la TERT comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 4.
- 15 4. El vector de ácido nucleico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la TERT está unida de forma operativa a una secuencia reguladora que dirige la expresión de la secuencia codificante.
- 20 5. El vector de ácido nucleico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el vector es un vector no integrativo.
6. El vector de ácido nucleico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el vector es un vector no integrativo basado en virus adenoasociados.
- 25 7. El vector de ácido nucleico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el vector es un vector basado en virus adenoasociados derivado de un virus adenoasociado del serotipo 9 (AAV9).
- 30 8. El vector de ácido nucleico para su uso según la reivindicación 7, en el que la cápsida del vector basado en virus adenoasociados está formada por proteínas de la cápsida del virus adenoasociado del serotipo 9 (AAV9), y la secuencia del ácido nucleico contenido en la cápsida está flanqueada en ambos extremos por repeticiones internas terminales que corresponden al virus adenoasociado del serotipo 2.
- 35 9. El vector de ácido nucleico para su uso según la reivindicación 8, en el que el ácido nucleico contenido en la cápsida comprende un fragmento que codifica la secuencia de aminoácidos que codifica TERT.
10. El vector de ácido nucleico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el vector comprende una secuencia reguladora que es un promotor constitutivo.
11. El vector de ácido nucleico para su uso según la reivindicación 10, en el que la secuencia reguladora es el promotor del citomegalovirus (CMV).

Figura 1

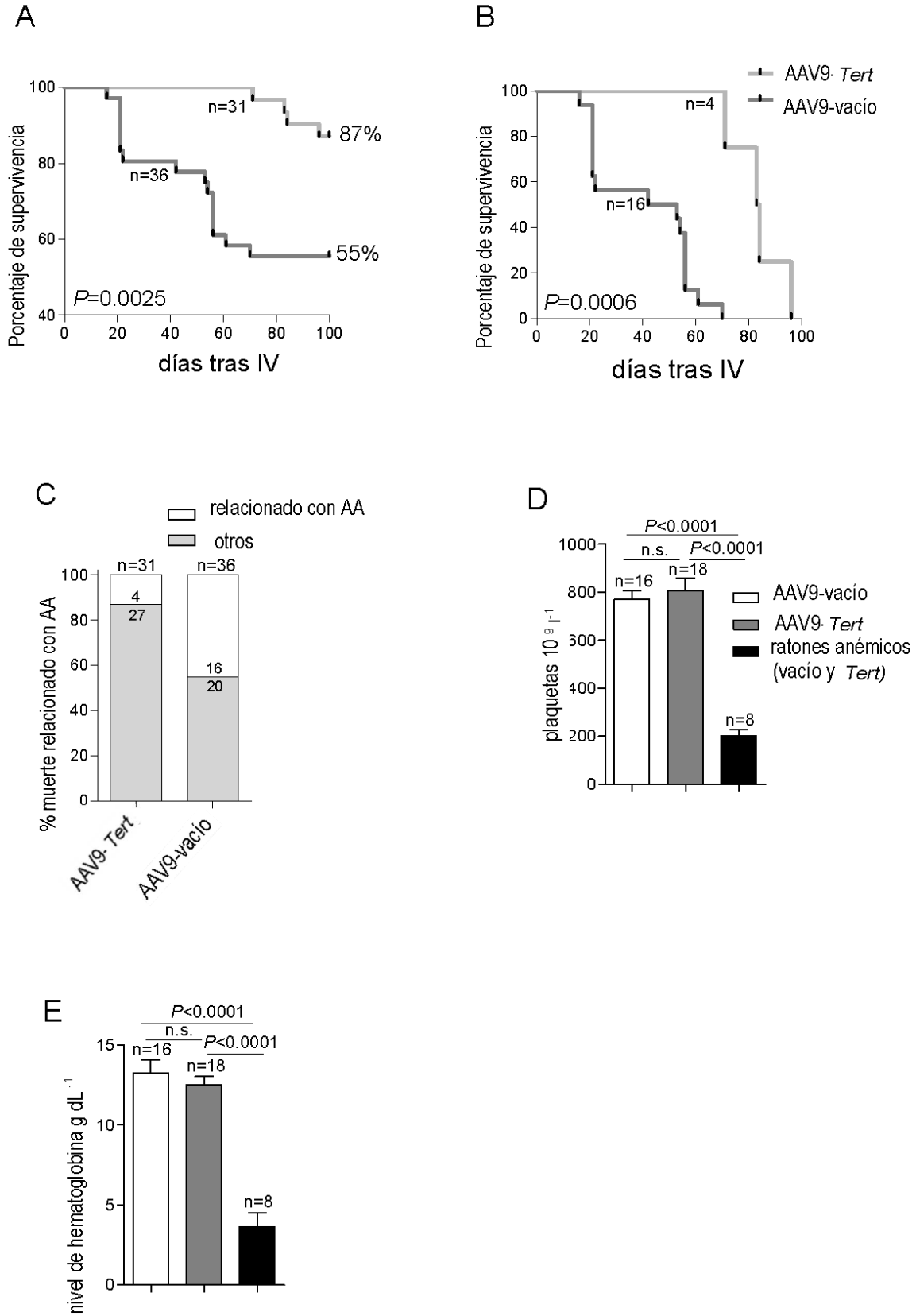


Figura 2

