

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 566**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2014 PCT/ES2014/070803**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15059338**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2014 E 14856578 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3061815**

54 Título: **Péptidos derivados de GSE24.2 para tratar enfermedades producidas por estrés oxidativo y daño al ADN**

30 Prioridad:

25.10.2013 ES 201331573

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

03.09.2020

73 Titular/es:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (25.0%)

C/ Serrano 117

28006 Madrid, ES;

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (25.0%);

ADVANCED MEDICAL PROJECTS (25.0%) y

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN

RED (CIBER) (25.0%)

72 Inventor/es:

PERONA ABELLÓN, ROSARIO;

SASTRE GARZÓN, LEANDRO;

PINTADO BERNINCHES, LAURA;

CARRILLO GARCÍA, JAIME;

MOLINA PACHÓN, ANTONIO;

IRRADICCIO SILVA, LAURA y

MANGUAN GARCÍA, CRISTINA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 781 566 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

Péptidos derivados de GSE24.2 para tratar enfermedades producidas por estrés oxidativo y daño al ADN

5 Sector de la técnica

Los péptidos derivados de GSE24.2 tendrán aplicaciones el sector biotecnológico y farmacéutico para tratar las enfermedades y/o manifestaciones causadas y/o relacionadas con el estrés oxidativo y/o el daño al ADN, como pueden ser la inflamación o el envejecimiento celular.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

GSE24.2 es un péptido correspondiente a la proteína disquerina la cual forma parte del complejo telomerasa. GSE24.2 es capaz de reactivar telomerasa en situaciones patológicas y fisiológicas; en enfermedades con defectos en telomerasa la actividad del GSE24.2 aumenta la viabilidad de las células derivadas de enfermos.

15

En la solicitud patente internacional: W02007/090911 A1 "Secuencia de nucleótidos y péptidos GSE24.2 de la disqueria, inductores de la actividad telomerasa, procedimiento de obtención, composiciones terapéuticas y sus aplicaciones" se divulga el uso del GSE24.2 para reactivar la actividad telomerasa o en un medicamento o composición farmacéutica. En dicha solicitud de patente internacional se identifica una secuencia de 55 aminoácidos como la unidad funcional original. En la presente invención se describen nuevos péptidos de menor tamaño derivados de la secuencia original, así como nuevos usos y aplicaciones de los mismos, como puede ser la protección frente al estrés oxidativo y el daño al ADN, ambos procesos íntimamente relacionados con procesos inflamatorios y envejecimiento celular.

20

25

Además, en la presente divulgación se aportan variantes de dichos péptidos derivados de GSE24.2 que incluyen secuencias de localización nuclear que permiten un mayor y mejor acceso al núcleo que es donde deben ejercer su actividad biológica aumentando su eficacia y reduciendo la necesidad de encapsulación de la secuencia de 55 aminoácidos original.

30

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

La presente divulgación proporciona un compuesto que reduce o disminuye la producción de radicales libres y/o el daño en la estructura del ADN celular, donde dicho compuesto se basa en un fragmento de la secuencia nucleotídica o aminoácídica del péptido GSE24.2 de la disquerina, capaz de restablecer el equilibrio redox normal de una célula y/o de corregir un daño en su ADN. De este modo, la invención aborda el problema de proporcionar nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades que involucran un incremento del estrés oxidativo celular y/o daños en la estructura del ADN, tales como la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson, la encefalopatía miálgica, la enfermedad de Alzheimer, la ataxia telangectasia, la disqueratosis congénita o el envejecimiento.

35

40

Se describen en esta divulgación secuencias internas del péptido GSE24.2 (SEQ ID No.: 1) que tienen una mayor actividad biológica que la secuencia completa y los fragmentos ya conocidos de la misma; además, para mejorar su actividad se les han añadido secuencias de transporte nuclear que mejoran adicionalmente la actividad de los péptidos al mejorar su internalización por las células e incrementar su presencia en el núcleo celular.

45

El péptido GSE24.2 (con secuencia SEQ ID No.: 1) y los péptidos derivados presentan actividades biológicas no descritas anteriormente como la disminución del contenido en radicales libres por parte de las células, y por tanto tiene actividad reductora del estrés oxidativo, y la disminución del daño estructural en el ADN producido por mutaciones en la maquinaria de reconocimiento del mismo; todo ello aumenta la viabilidad de las células expuestas a diversos agentes causantes de los efectos antes descritos. Esta actividad se ha probado en algunas patologías como la ataxia telangiectasia y la disqueratosis congénita; pero además permite su aplicación en enfermedades neurodegenerativas, de degeneración muscular (distrofia de Duchene), progerias, hipersensibilidad a luz, inestabilidad genética causada por mutaciones o agentes externos; todas ellas aplicaciones no descritas previamente para este péptido.

50

55

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se basa en que los inventores han ensayado la capacidad de los péptidos derivados de GSE24.2 para disminuir el nivel de radicales libres y el daño en el ADN presentes en diferentes enfermedades humanas o derivadas de la exposición a agentes como la radiación o los agentes genotóxicos. Por tanto, los péptidos derivados de GSE24.2 de esta divulgación así como el propio GSE24.2 se podrían aplicar a todas aquellas enfermedades ocasionadas o que cursan con acumulación de daño al ADN y aumento de radicales libres, como:

60

65

5 enfermedades de envejecimiento acelerado como el síndrome de Werner y el de Hutchison Gilford; otras donde hay
 10 daño al ADN causado por mutaciones en la maquinaria de reconocimiento y procesamiento del mismo como ataxia
 telangiectasia, xeroderma pigmentosum, síndrome de Rothmund Thompson, síndrome de "Nijmegen breakage",
 entre otros; enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo la enfermedad de Huntington, Alzheimer,
 enfermedad de Parkinson; enfermedades que cursen con degeneración muscular como la distrofia muscular de
 Duchene; enfermedades cardiovasculares o pulmonares como la fibrosis pulmonar o la aterosclerosis; además de
 enfermedades que cursen con un componente inflamatorio importante en su patología como la artritis reumatoide.
 Entre las aplicaciones de estos péptidos también se encuentran las relacionadas con la ingeniería de tejidos y el
 cultivo celular, entre otras aplicaciones biotecnológicas. Estos péptidos además podrían tener aplicaciones en la
 20 industria cosmética, como por ejemplo en el tratamiento de los daños producidos por el envejecimiento en la piel.

15 Los inventores han producido péptidos de pequeño tamaño derivados del GSE24.2 (SEQ ID No.: 1), con capacidad
 de entrar en la célula y que tienen una mayor actividad biológica que el péptido original, identificándolos en lisados
 bacterianos de bacterias que expresan la secuencia completa de GSE24.2. Éstos lisados fueron analizados
 mediante HPLC previamente a la identificación de sus secuencias. En el lisado se identificaron 5 péptidos además
 del GSE24.2, y cuyas secuencias corresponden con SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.: 3, SEQ ID No.: 4, SEQ ID No.: 5 y
 SEQ ID No.: 6.

20 Un listado de las secuencias y las correspondencias con los péptidos descritos en esta divulgación puede hallarse
 en la Tabla 1:

Nombre	Secuencia	No. Aminoácidos	SEQ ID No.
GSE24.2	GFINLDKPSNPSSHEWAWIRRILRVEKT HSGTLDPKVTGCLIVCIERATRLVK	55	1
GSE4	GFINLDKPSNP	11	2
GSE1	GFINLDKPSNPSSHEW	17	3
GSE2	GFINLDKPSNPSSHEWA	18	4
GSE3	GFINLDKPSNPSSHEWAW	19	5
GSE5	GFINLDKPSNPSSHEWAWIRRILR	25	6
GSE4NLS1-3	GFINLDKPSNPKRKR	15	7
GSE24.2NLS1-3	GFINLDKPSNPSSHEWAWIRRILRVEKTG HSGTLDPKVTGCLIVCIERATRLVKKRKR	59	8
GSE24.2NLS2-3	GFINLDKPSNPSSHEWAWIRRILRVEKT HSGTLDPKVTGCLIVCIERATRLVKKKE KKKSK	63	9
GSE 24.2NLS1-5	KRKRGFINLDKPSNPSSHEWAWIRRILRV EKTGHSGLDPKVTGCLIVCIERATRLVK	59	10
GSE 24.2NLS2-5	KKEKKKSKGFINLDKPSNPSSHEWAWI RRILRVEKTGHSGLDPKVTGCLIVCIER ATRLVK	63	11
GSE4NLS1-5	KRKRGFINLDKPSNP	15	12
GSE4NLS2-3	GFINLDKPSNPKKEKKKSK	19	13
GSE4NLS2-5	KKEKKKSKGFINLDKPSNP	19	14
SGSE4	HSGTLDPKVTG	11	15

Tabla 1. Correspondencia entre la descripción de los péptidos y las secuencias empleadas en la descripción.

Se ha estudiado la actividad biológica de los péptidos identificados en los lisados bacterianos en un ensayo de rescate de daño al ADN, de ellos el péptido GSE4 (SEQ ID No.: 2) que se encuentra comprendido en el dominio Tral mehora sustancialmente la actividad del dominio completo (SEQ ID No.: 4, GSE2) y de GSE24.2 (SEQ ID No.: 1); dicha actividad es incluso mejorada aún más con la inserción de una secuencia de localización nuclear en posición carboxilo terminal (pero no en el N-terminal). Dado el pequeño tamaño de los péptidos identificados en la presente divulgación, no es necesario emplear sistemas de captación celular como son los liposomas para introducirlos en la célula, lo cual es una mejora sustancial respecto al empleo del péptido completo GSE24.2 (SEQ ID No.: 1) o del dominio TRUBL (GSE2, SEQ ID No.: 4) que sí los precisa. Estos nuevos péptidos, por tanto, proporcionan un sistema más reproducible y estable para fines terapéuticos que los actuales. Además, dichos péptidos pueden obtenerse por síntesis química, simplificando el proceso de obtención de los mismos. Estos péptidos presentan funciones análogas a las de GSE24.2 y por tanto es posible emplearlos en aplicaciones equivalentes.

En la presente divulgación se identifica la unidad mínima o polipéptido mínimo con actividad que se encuentra comprendida en el péptido GSE24.2 de secuencia SEQ ID No.: 1, y que consiste en un fragmento de 11 aminoácidos de SEQ ID No.: 1 y que comprende, al menos, la SEQ ID No.: 2. Dicho péptido constituye la unidad mínima responsable de la actividad de GSE24.2 de disminución de la producción de radicales libres y/o el daño en la estructura del ADN de una célula.

Así, la divulgación se refiere a un polipéptido que comprende al menos un fragmento de la secuencia del péptido GSE24.2 con SEQ ID No.: 1 capaz de disminuir la producción de radicales libres y/o el daño en la estructura del ADN de una célula, y donde dicho fragmento comprende, al menos, la SEQ ID No.: 2, excepto cuando dicho polipéptido consiste en el péptido GSE24.2 (SEQ ID No.: 1), o un fragmento del mismo con secuencia SEQ ID No.: 4 (GSE2). Preferiblemente, el polipéptido tiene una secuencia aminoacídica que comprende un fragmento del péptido GSE24.2 seleccionado entre al menos uno del grupo formado por: SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.: 3, SEQ ID No.: 5 y SEQ ID No.: 6.

En consecuencia, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende al menos un fragmento de la secuencia del péptido GSE24.2 (SEQ ID No. 1) con SEQ ID No. 2 capaz de reducir la producción de radicales libres y/o el daño en la estructura del ADN celular y dicho polipéptido se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.: 5 y SEQ ID No.: 6.

Cuando al menos uno de los polipéptidos definidos anteriormente se introduce o se induce su expresión en el interior celular, preferentemente en el interior de una célula eucariota, como puede ser una célula humana, es capaz de provocar una disminución en la producción de radicales libres y/o el daño del ADN en dicha célula. De este modo, al cuantificar los niveles de radicales libres en una célula viva por alguno de los métodos conocidos, como por ejemplo mediante el compuesto Dihidroethidium (DHE, Hydroethidine), la producción de radicales libres en una célula puede disminuir dependiendo de la secuencia de dicho polipéptido hasta alcanzar niveles fisiológicos con respecto a una célula del mismo tipo a la que no se ha introducido o inducido su expresión. Del mismo modo, cuando se cuantifica el daño del ADN celular por alguno de los métodos existentes, como por ejemplo por el estudio de la señal de hibridación de las células con un anticuerpo contra la histona H2AX fosforilada en la posición Ser139 (γ -H2AX), se observa que dicho daño del ADN puede reducirse dependiendo de la secuencia del polipéptido en un 50% con respecto a una célula del mismo tipo a la que no se ha introducido o inducido su expresión.

Teniendo en cuenta que la acción de los polipéptidos definidos en este aspecto de la invención puede llevarse a cabo en el núcleo celular, para facilitar su expresión o localización en el núcleo y/o mejorar la actividad de los mismos, dicho polipéptido aparte del fragmento del péptido GSE24.2 con actividad, puede comprender además al menos una secuencia de localización nuclear (NLS) unida en al menos uno de los extremos carboxilo o amino terminal de dicho fragmento, y más preferentemente en el extremo carboxilo terminal.

En el ámbito de este primer aspecto se entiende por secuencia de localización nuclear a un grupo de aminoácidos capaz de dirigir la localización del péptido al que se hallan unido al núcleo celular; dicha secuencia puede ser tanto una secuencia de transporte al núcleo como una secuencia de transporte al nucléolo. Preferentemente, la secuencia de localización nuclear es una secuencia de localización nuclear que se encuentra en el gen DKC1 de donde deriva la secuencia del GSE24.2, como son por ejemplo las secuencias de transporte al núcleo KRKR (NLS1) (SEQ ID NO: 16) o de transporte al nucléolo KKEKKKSK (NLS2) (SEQ ID NO: 17), y más preferentemente es la secuencia de transporte al núcleo KRKR (NLS1) (SEQ ID NO: 16).

Así, en una realización preferida del polipéptido de este aspecto de la invención, cuando comprende una secuencia de localización nuclear unida al fragmento activo del GSE24.2, dicho polipéptido consiste en una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo compuesto por: SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.:13 y SEQ ID No.:14.

A lo largo del presente documento, cualquiera de los polipéptidos definidos en este primer aspecto de la invención, puede ser igualmente referido como un "polipéptido de la invención" o "péptido de la invención".

Los polipéptidos de la invención se pueden obtener a través de los procedimientos habituales conocidos en la técnica para la síntesis de péptidos: mediante la inserción en vectores de expresión o mediante su síntesis química. Los procedimientos de síntesis química de péptidos comprenden tanto la síntesis en solución o fase líquida como la síntesis peptídica en fase sólida (SPPS en sus siglas en inglés). Preferentemente se empleará la síntesis peptídica en fase sólida, empleando alguno de los métodos conocidos en el estado de la técnica como el Fmoc y el t-Boc.

Otro aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica al menos uno de los polipéptidos de la invención como cualquiera de los anteriormente definidos. Dicho polinucleótido, referido en la presente memoria igualmente como polinucleótido de la invención, permite la expresión de un polipéptido que es capaz de disminuir la producción de radicales libres y/o el daño en la estructura del ADN en una célula eucariota, preferentemente una célula humana, y puede referirse a un polinucleótido de ADN, de ADNc o de ARN.

En una realización preferida, el polinucleótido de la invención comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la invención seleccionado entre al menos uno del grupo formado por: SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 5 y SEQ ID No: 6.

Teniendo en cuenta que la acción del polipéptido que codifica el polinucleótido de la invención, puede llevarse a cabo en el núcleo celular, de manera similar a como se indicó para el polipéptido de la invención, la secuencia del polinucleótido de la invención puede comprender además al menos una secuencia de localización nuclear (NLS) unida en al menos uno de los extremos 3' ó 5' de la secuencia del fragmento del péptido GSE24.2, y más preferentemente unida en el extremo 3'.

Preferentemente, la secuencia de localización nuclear escogida para el polipéptido de la invención es una secuencia de localización nuclear dirigida al núcleo o al nucléolo, y más preferentemente se encuentra en el gen DKC1 de donde deriva la secuencia del GSE24.2. Ejemplos preferidos de secuencias de transporte al núcleo del gen DKC1 son las secuencias de transporte al núcleo que codifican por la secuencia peptídica KRKR (NLS1) (SEQ ID NO: 16) o las secuencias de transporte al nucléolo que codifican por la secuencia peptídica KKEKKKSK (NLS2) (SEQ ID NO: 17), y preferentemente es una secuencia de transporte al núcleo que codifica la secuencia peptídica KRKR (NLS1) (SEQ ID NO: 16).

En una realización preferida, cuando el polinucleótido de la invención comprende una secuencia de localización nuclear unida a la secuencia codificante del fragmento activo del GSE24.2, dicho polinucleótido consiste en una secuencia que codifica un polipéptido seleccionado del grupo compuesto por: SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.:13 y SEQ ID No.:14.

El polinucleótido de la invención como cualquiera de los descritos anteriormente puede obtenerse por un experto mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook et al. "Molecular cloning, a Laboratory Manual" 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 vol1-3). Las secuencias de estos polinucleótidos pueden estar integradas en un vector de expresión génica que permite la regulación de la expresión de la misma en condiciones adecuadas en el interior de las células.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un vector de expresión que comprende un polinucleótido de la invención o una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de la invención, y que permite la expresión de un polipéptido que es capaz de disminuir la producción de radicales libres y/o el daño en la estructura del ADN en una célula eucariota, preferentemente una célula humana, de ahora en adelante vector de la invención.

En general, según la presente descripción, el vector de expresión comprende, además del polinucleótido descrito en la invención, un promotor que dirige su transcripción (por ejemplo, pT7, plac, ptrc, ptac, pBAD, ret, etc.), al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan dicha transcripción y, en su caso, la traducción del producto de interés, por ejemplo, señales de inicio y terminación de transcripción (ttt2, etc.), señal de poliadenilación, origen de replicación, secuencias de unión a ribosomas (RBS), secuencias codificantes de reguladores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), represores, etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos de expresión, vectores virales (ADN o ARN), cósmidos, cromosomas artificiales, etc. que pueden contener, además, marcadores utilizables para seleccionar las células transfectadas o transformadas con el gen o genes de interés. La elección del vector dependerá de la célula huésped y del tipo de uso que se quiera realizar. Por tanto, según un modo de realización particular de la presente descripción dicho vector es un plásmido o un vector viral. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia al igual que para la transformación de microorganismos y células eucariotas se pueden utilizar diferentes métodos ampliamente conocidas- transformación química, electroporación, microinyección, etc. - descritos en diversos manuales (Sambrook et al. "Molecular cloning, a Laboratory Manual" 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 vol1-3).

El polipéptido de la invención, el polinucleótido de la invención y/o el vector de expresión génica definido en la presente invención, pueden utilizarse como un medicamento en un procedimiento de tratamiento y/o prevención de un ser humano afectado por una enfermedad causada por un aumento del estrés oxidativo y/o un daño en el ADN celular, preferentemente a través de su acción biológica en aquellas células afectadas por un aumento en sus niveles de radicales libres y/o un daño en la estructura de su ADN, preferentemente células humanas; también puede emplearse como herramienta biotecnológica en sistemas de cultivo celular o de ingeniería de tejidos "in vitro" para mejorar la viabilidad de los mismos. No obstante, la presente divulgación también contempla que la secuencia completa del péptido GSE24.2 (SEQ ID No.: 1) y/o de su fragmento de 18 aminoácidos SEQ ID No.: 4 (GSE2) pueden utilizarse también para esa misma finalidad. Debe entenderse que las herramientas biotecnológicas, farmacéuticas, así como los procedimientos de terapia son suficientemente conocidos por un experto del sector de la técnica de tal forma que con la información descrita en la presente descripción pueden desarrollarse sin excesivo esfuerzo.

Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso de un polipéptido, o de un polinucleótido o vector que codifica dicho polipéptido, y que es capaz de disminuir la producción de radicales libres y/o el daño en la estructura del ADN de una célula, en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de, al menos, una enfermedad causada por una alteración, preferentemente un aumento, del estrés oxidativo y/o del daño del ADN celular. A título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, dicha enfermedad es una perteneciente al siguiente grupo: disqueratosis congénita, una enfermedad neurodegenerativa (tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, ataxia cerebelosa o degeneración de medula espinal), síndrome del maullido de gato (Cri du Chat), ataxia telangiectasia, síndrome de "Nijmegen Breackage", síndrome de Bloom, síndrome de Werner, anemia de Fanconi, colitis ulcerosa, envejecimiento vascular, arterosclerosis, preferentemente aterosclerosis, cáncer, distrofia muscular de Duchene, progerias, hipersensibilidad a luz, inestabilidad genética causada por una mutaciones o un agente externo, síndrome de Hutchison Gilford; xeroderma pigmentosum, síndrome de Rothmund Thompson, fibrosis pulmonar y una enfermedad con inflamación crónica, como por ejemplo la artritis reumatoide.

Según un aspecto de la invención, el medicamento o composición farmacéutica comprende un polipéptido y/o un polinucleótido o vector de expresión que lo codifica, donde dicho polipéptido comprende una secuencia seleccionada entre, al menos, una del grupo formado por: SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.: 5 y/o SEQ ID No.: 6.

En otro aspecto de la invención, el medicamento o composición farmacéutica comprende un polipéptido y/o un polinucleótido o vector de expresión que lo codifica, donde el polipéptido además comprende, al menos, una secuencia de localización nuclear, unida de manera preferida a su extremo carboxilo terminal, seleccionada preferentemente entre al menos una del grupo formado por: SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.: 13, y SEQ ID No.: 14.

Otro objeto de la invención lo constituye una composición farmacéutica o medicamento, preferentemente para el tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías causadas por una alteración del contenido de radicales libres en el interior celular, causando un estrés oxidativo asociado y/o causadas por un daño de la estructura del ADN celular, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende al menos un polipéptido, polinucleótido y/o vector de expresión capaz de disminuir la producción de radicales libres y/o el daño en la estructura del ADN celular, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables y que es capaz de regular y mantener el equilibrio redox y corregir un daño en el ADN. En el ámbito de la presente invención, dicha composición farmacéutica o medicamento pueden ser igualmente referidos como "composición farmacéutica o medicamento de la invención".

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas. A modo de ejemplo, pueden mencionarse las nanopartículas o liposomas, los cuales ayudan a la absorción e internalización de las moléculas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad del polipéptido de la invención, o de una molécula o compuesto que permite la expresión de una secuencia nucleotídica que codifique por dicho polipéptido, capaz de disminuir la producción de radicales libres y/o el daño en la estructura del ADN celular, calculada para producir el efecto deseado y que, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

En una realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida.

En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

En una realización preferida, la composición farmacéutica o medicamento comprende un polipéptido de la invención que se selecciona entre al menos uno del grupo formado por: SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.: 5, SEQ ID No.: 6, SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.: 13 y SEQ ID No.: 14; o un polinucleótido o vector que codifica dicho polipéptido.

La composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse en un método de tratamiento de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos.

Otro aspecto de la descripción lo constituye por tanto el uso de la composición farmacéutica de la invención, en adelante uso de la composición farmacéutica de la invención, en un método de tratamiento o prevención de un individuo, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad, desorden o patología causada por una alteración del contenido de radicales libres en el interior celular, causando un estrés oxidativo asociado y/o causadas por un daño de la estructura del ADN. Preferentemente, la enfermedad o patología a tratar es una de las definidas en los usos de la composición anteriormente mencionados.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un polipéptido, o del polinucleótido o vector que lo codifica, en ingeniería de tejidos y cultivo celular para mejorar la viabilidad de los mismos. Preferentemente, dicho polipéptido consiste en al menos uno seleccionado del grupo compuesto por: SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.: 5, SEQ ID No.: 6, SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.: 13, y SEQ ID No.: 14.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Determinación del daño al ADN en células AT: Las células AT AT3784 fueron infectadas con un vector lentiviral expresando el GSE24.2 o un vector vacío GFP y 24 horas más tarde fijadas para ser procesadas e hibridadas con un anticuerpo contra la histona H2AX fosforilada (Ser139). Como control negativo se utilizaron las células controles C-1787. Posteriormente se hibridaron con un anticuerpo marcado con fluoresceína y fueron teñidas con DAPI para localizar los núcleos. Se evaluaron los focos (foci) con tinción para la histona H2AX fosforilada en 200 células por tipo y los resultados se agruparon entre células que no presentaban focos, un número de focos entre 5 y 20 y mayor de 20.

FIG. 2. Determinación del daño al ADN en células AT: Las células AT AT3784 fueron infectadas con un vector lentiviral expresando el GSE24.2 o un vector vacío GFP y 24 horas más tarde fijadas para ser procesadas e hibridadas con un anticuerpo contra la quinasa pCHK2thr68. Como control negativo se utilizaron las células controles C-1787. Posteriormente se hibridaron con un anticuerpo marcado con fluoresceína y fueron teñidas con DAPI para localizar los núcleos. Se evaluaron los foci con tinción para pCHK2thr68 en 200 células por tipo y los resultados se agruparon entre células que no presentaban focos, un número de focos entre 5 y 20 y mayor de 20.

FIG. 3. Determinación de los niveles de ROS en células AT: Las células AT AT3189-P fueron infectadas con un vector lentiviral expresando el GSE24.2 o un vector vacío GFP y tres semanas después cargadas con el reactivo DHE que detecta niveles de ROS (del inglés Reactive Oxygen Species, o especies reactivas del oxígeno). Como control se utilizaron las células AT736C. Mediante citometría de flujo se determinaron las fluorescencias relativas de las tres líneas celulares y la proporción de células con intensidad máxima utilizando una longitud de onda: absorción 518 y emisión 605nm. Los datos se han representado como porcentaje relativo de células que emiten a esta longitud de onda.

FIG. 4. Determinación de los niveles de fosforilación de p38 en células AT: Las células AT AT719-P fueron infectadas con un vector lentiviral expresando el GSE24.2 o un vector vacío GFP y tres semanas después se obtuvieron extractos proteicos. También se utilizaron células AT AT719-P infectadas con el GSE24.2 y seleccionada la población con máxima fluorescencia utilizando un sorter (AT AT719-P GSE24.2 sorter). Como control se utilizaron las células AT736C. Las proteínas se resolvieron en geles de poli-acrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La membrana se hibridó con un anticuerpo policlonal contra la proteína p38 fosforilada Thr180/Tyr182 y sin fosforilar como control de carga. Los valores relativos entre la proteína fosforilada y sin fosforilar obtenidos (mediante el programa NIH-IMAJE) para la línea celular control fueron considerados 1 y los demás referidos a ésta.

FIG. 5. Determinación de la viabilidad en respuesta a bleomicina en células AT: Las células AT AT719-P fueron infectadas con un vector lentiviral expresando el GSE24.2 o un vector vacío GFP y tres semanas después trataron con diferentes dosis de bleomicina. Como control se utilizaron las células AT736C. Las células se fijaron tras 72 horas de tratamiento y la viabilidad determinada con el reactivo MTS. Los valores representan el resultado del ensayo realizado en triplicado y expresan la viabilidad respecto a células sin tratar.

FIG. 6. Western blot de células F9 y F9A353V 24 horas después de transfectar los péptidos derivados del GSE24.2 sintetizados químicamente. Los péptidos indicados en cada línea del gel se transfectaron (15µg de cada péptido) en una placa de 30mm. Tras separar los extractos proteicos en geles de poliacrilamida y transferirlos a una membrana de nitrocelulosa la membrana se hibridó con un anticuerpo contra la histona H2AX (Ser139) y posteriormente con uno contra α -tubulina como control de carga.

FIG. 7. Cuantificación del western blot de la figura 6, para ello la señal obtenida con la histona H2AX (Ser139) se corrigió con la señal de α -tubulina considerando como 1 la señal obtenida con las células F9 transfectadas con betagalactosidasa (como control) utilizando el programa NIH-IMAGE.

FIG. 8. Western blot de células F9 y F9A353V 24 horas después de transfectar el péptido GSE4 a concentraciones crecientes. El péptido sintético GSE4 se transfectó a las concentraciones indicadas en cada línea del gel. La membrana se hibridó con un anticuerpo contra la Histona H2AX (Ser139) y α -tubulina como control de carga.

FIG. 9. Cuantificación del western blot de la figura 8, para ello la señal obtenida con la histona H2AX (Ser139) se corrigió con la señal de α -tubulina considerando como 1 la señal obtenida con las células F9 transfectadas con betagalactosidasa.

FIG. 10. Determinación de la actividad telomerasa en células VA13 tras la transfección de los péptidos GSE4 y GSES. Para determinar el efecto de la expresión de los péptidos GSE4 y GSE5 se transfectaron en células VA13 mediante lipofección y 24 horas después se realizó un ensayo TRAP para la actividad telomerasa.

FIG. 11. Determinación de los niveles de estrés oxidativo en células de ataxia telangiectasia, después de expresar los péptidos GSE24.2 y GSE4. Las células AT AT719-P fueron infectadas con un vector lentiviral expresando el GSE24.2, GSE4 o un vector vacío GFP y tres semanas después cargadas con el reactivo DHE que detecta niveles de ROS (del inglés Reactive Oxygen Species, o especies reactivas del oxígeno). Como control se utilizaron las células AT736C. Mediante citometría de flujo se determinaron las fluorescencias relativas de las cuatro líneas celulares y la proporción de células con intensidad máxima utilizando una longitud de onda: absorción 518 y emisión 605nm. Los datos se han representado como porcentaje relativo de células que emiten a esta longitud de onda.

FIG 12. Niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias en células de ataxia telangiectasia, después de expresar los péptidos GSE24.2 y GSE4. Las células AT AT719-P fueron infectadas con un vector lentiviral expresando el GSE24.2, GSE4 o un vector vacío GFP y tres semanas después se extrajo RNA y después de obtener el cADN correspondiente se determinó el nivel de expresión de las citoquinas proinflamatorias IL6 e IL8. Como control se utilizaron las células AT736C. Como control de expresión se midieron los niveles de expresión del gen β -actina. Los resultados se expresan como el incremento en número de veces de la expresión relativa de cada uno de los genes respecto a la β -actina considerando 1, los niveles de expresión de las células AT736C.

FIG. 13. Determinación de la senescencia en células AT después de expresar los péptidos GSE24.2 y GSE4: Las células AT AT2078 fueron infectadas con un vector lentiviral expresando el GSE24.2, GSE4 o un vector vacío GFP y 3 días u ocho días más tarde fijadas para determinar la expresión del enzima β -galactosidasa ácida asociada a senescencia (senescence-associated β -galactosidase). Como control negativo se utilizaron las células controles C-1787. Se determinó el porcentaje de células expresando galactosidasa del total de células por campo. Se evaluaron 200 células por tipo celular y los resultados se agruparon entre células que no presentaban actividad (β gal-, en división) y las células senescentes (β -gal+).

FIG. 14. Determinación del daño al ADN en células AT después de transfectar los péptidos GSE4 y SGSE4: Las células AT AT2078 fueron infectadas con un vector lentiviral expresando el GSE4, SGSE4 o un vector vacío GFP y 24 horas más tarde fijadas para ser procesadas e hibridadas con un anticuerpo contra la histona H2AX fosforilada (Ser139). Como control negativo se utilizaron las células controles C-1787. Posteriormente se hibridaron con un anticuerpo marcado con fluoresceína y fueron teñidas con DAPI para localizar los núcleos. Se evaluaron los focos (foci) con tinción para la histona H2AX fosforilada en 200 células por tipo y los resultados se agruparon entre células que no presentaban focos, un número de focos entre 5 y 20 y mayor de 20.

FIG. 15. Secuencias NLS1 (SEQ ID NO: 16) y NLS2 (SEQ ID NO: 17) de la secuencia de disquerina. Secuencias de localización nuclear (NLS1) y nucleolar (NLS2) contenidas en el gen DKC1.

FIG. 16. Esquema de las construcciones utilizadas para colocar las señales de localización nuclear NLS1 o NLS2 en las posiciones 5' o 3' en la secuencia del GSE24.2. Se obtuvieron 4 construcciones colocando las secuencias NLS1 o NLS2 en la región 5' o 3' del GSE24.2 conteniendo un Tag para myc en el vector de expresión pCDNA3myc.

5 **FIG. 17.** Expresión de las construcciones NLS1-3, NLS1-5, NLS2-3 y NLS2-5 GSE24.2 y GSE24.2 en células HeLa. 24 horas después de transfectar los plásmidos (utilizando lipofectamina) se detectaron la expresión y localización subcelular de los péptidos mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo contra el Tag de c-myc presente en las construcciones (ver Fig. 16).

10 **FIG. 18.** Expresión de las construcciones NLS1-3 GSE24.2 y GSE24.2 en células HeLa. Tras 24 horas de transfectar los plásmidos (utilizando lipofectamina), se detectaron la expresión y localización subcelular de los péptidos mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo contra el Tag de c-myc que se encuentra en la construcción.

15 **FIG. 19.** Expresión de las construcciones NLS2-3 GSE24.2 y GSE24.2 en células HeLa. Tras 24 horas de transfectar los plásmidos (utilizando lipofectamina) se detectaron la expresión y localización subcelular de los péptidos mediante inmunofluorescencia, con un anticuerpo contra el Tag de c-myc que se encuentra en la construcción.

20 **FIG. 20.** Actividad de las construcciones GSE24.2NLS1-3 y GSE24.2NLS2-3 sobre el promotor de c-myc. Los vectores de expresión para las construcciones GSE24.2, GSE24.2NLS1-3 y GSE24.2NLS2-3 se transfectaron (utilizando lipofectamina) en células 293T junto con el gen reportero del promotor de c-myc, pXP1 y 24 horas después se midió la actividad luciferasa utilizando un kit comercial. Los valores se expresan como actividad relativa considerando 1 el valor de luciferasa con el vector de expresión pCDNA3myc vacío.

25 **FIG. 21.** Transfección de los péptidos GSE4 y GSE4NLS1 en células HeLa. Los péptidos GSE4 y GSE4NLS1 (SEQ ID No.: 7) marcados con fluoresceína y obtenidos por síntesis química, fueron transfectados en células HeLa utilizando el reactivo Proteojuice y visualizadas en un microscopio de fluorescencia confocal, 9, 24 y 48 horas tras la transfección.

30 **FIG. 22.** Internalización de los péptidos GSE4 y GSE4NLS1 en células HeLa. Los péptidos GSE4 y GSE4NLS1 (SEQ ID No.: 7) marcados con fluoresceína y obtenidos por síntesis química, fueron añadidos al medio de cultivo de células HeLa y visualizadas en un microscopio de fluorescencia confocal, 9, 24 y 48 horas tras la transfección.

EJEMPLOS

35 **EJEMPLO 1.** Capacidad del GSE24.2 de revertir daño al ADN en células de pacientes con ataxia telangiectasia.

Para realizar este ensayo se utilizaron líneas celulares de pacientes con ataxia telangiectasia (AT, del repositorio Coriell) con mutación en el gen ATM y denominada AT3487. La línea celular C-1787 se utilizó como línea celular control. Las células se infectaron con el vector lentiviral bicistrónico pCMV-GFP-GSE24.2. Tras 48 horas después de la infección las células fueron fijadas con formaldehído y posteriormente permeabilizadas tratándolas con Tritón X-100. El daño al ADN se estimó estudiando la señal tras la hibridación de las células con un anticuerpo contra la histona H2AX Ser139 y posterior hibridación con un anticuerpo ligado a fluoresceína. El número de focos (foci) con tinción para histona H2AX/núcleo se ha determinado utilizando microscopía confocal en un total de 200 células y los datos representados como porcentaje de células con un determinado número de focos.

45 En la figura 1, se puede observar que la expresión del GSE24.2 corrige totalmente el daño global en el ADN en un 20% de las células AT y disminuye los niveles del daño al ADN en un 25% de las células AT por lo tanto se observa una corrección global del daño al ADN del 40%.

50 Posteriormente se realizó un experimento similar al anterior pero determinando el daño al ADN mediante la hibridación con un anticuerpo que reconoce la proteína pCHK2 fosforilada en la Thr68, y los datos indican que en este caso un 25% menos de células AT, presentan daño basal tras expresar el GSE24.2 y se disminuyen los niveles altos de daño al ADN en un 13% (Figura 2). Por tanto la expresión del GSE24.2 es capaz de corregir el daño en el ADN en un 28% de las células, confirmando los datos obtenidos con la histona H2AX fosforilada.

55 **EJEMPLO 2.** Capacidad del GSE24.2 de disminuir los niveles de radicales libres en células de pacientes con ataxia telangiectasia.

60 Una de las características de las células AT es un aumento en el contenido de radicales libres. Esto se debe a la falta de función de la proteína ATM, la cual es capaz de mantener el equilibrio redox en las células normales, cuando las células están expuestas a estrés ambientales como son el cultivo in vitro. Para verificar si la expresión del GSE24.2 tenía algún impacto sobre la regulación de los niveles de radicales libres, utilizamos el compuesto Dihydroethidium (Hydroethidine), el cual permite cuantificar los niveles de radicales libres en células vivas. Para este experimento utilizamos linfoblastos controles AT736C y una línea de linfoblastos AT AT3189-P. Estas últimas se infectaron con el vector lentiviral expresando el GSE24.2 pCMV-GFP-GSE24.2 o un vector vacío expresando solo

GFP (GFP). Tres semanas después de la infección las células se cargaron con el reactivo DHE durante 30 minutos y mediante citometría de flujo se determinó la proporción de células con diferente contenido en radicales libres. Los resultados mostraron (Figura 3) que el nivel de radicales libres en las células AT736C era menor que las células AT3189-P, expresando el vector vacío (GFP). En cambio, los niveles de ROS disminuían en las células AT3189-P GSE24.2 hasta valores comparables a los encontrados en células controles AT736C.

EJEMPLO 3. Capacidad del GSE24.2 de disminuir los niveles la quinasa p38 fosforilada en células de pacientes con ataxia telangiectasia.

Una de las características de las células de pacientes AT, es una mayor activación de la MAP quinasa p38, debido a la falta de función de la proteína ATM. Este aumento en la activación de p38, desencadena el proceso de muerte celular en las células AT y por tanto una disminución en el número de células neuronales. Por tanto, se comprobó si la expresión del GSE24.2 era capaz de disminuir la activación de p38 en las líneas celulares de pacientes AT. Para ello, las células AT AT719 se infectaron con un vector lentiviral expresando el GSE24.2 pCMV-GFP-GSE24.2 o un vector vacío expresando solo GFP (GFP) y tres semanas tras la infección se obtuvieron extractos proteicos de ambas líneas celulares. Como control negativo se utilizó la línea celular de linfoblastos normales AT736. Los extractos se resolvieron en geles de poliacrilamida y las proteínas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa para su posterior hibridación con anticuerpos. Se empleó un anticuerpo que detecta la proteína p38 fosforilada y posteriormente se rehibridaron con un anticuerpo contra la proteína p38 no fosforilada, como control de carga. La señal obtenida en ambas hibridaciones se cuantificó con el programa NIH-IMAGE y los valores relativos entre la proteína fosforilada y sin fosforilar obtenidos para la línea celular control considerados 1. En la Figura 4 se puede observar que los valores aumentan mucho en el caso de las células AT719 infectadas con el virus GFP, pero disminuyen de forma relevante a niveles similares a las células controles cuando se infectan con el virus GSE24.2. Estos datos indican que una de las consecuencias de la falta de activación de ATM y el estrés oxidativo asociado, la activación de p38, se revierte tras la expresión del GSE24.2

EJEMPLO 4. Capacidad del GSE24.2 de aumentar la viabilidad tras el tratamiento con un fármaco radiomimético en células de pacientes con ataxia telangiectasia.

Las mutaciones en el gen ATM, sensibilizan las células de pacientes AT al tratamiento con radiación ionizante o drogas radiomiméticas como la bleomicina. Con el fin de verificar si el efecto protector inducido por el GSE24.2 en células de pacientes AT, se extendía también a los agentes radiomiméticos, células de pacientes AT719 expresando el pCMV-GFP-GSE24.2 o un vector vacío expresando solo GFP (GFP) fueron tratadas con concentraciones crecientes de bleomicina durante 72 horas, tras las cuales la viabilidad celular se evaluó utilizando el reactivo MTS. Como control se utilizaron las células AT736C. Los resultados mostraron que la expresión del GSE24.2 era capaz de aumentar la viabilidad de las células AT719 hasta niveles similares a las células control, mientras que de acuerdo con lo descrito, las células AT719 o AT719GFP eran más sensibles que las controles (Figura 5). Estos resultados demuestran que la expresión del GSE24.2 es capaz de proteger de la muerte celular inducida por agentes radiomiméticos.

EJEMPLO 5. Ensayo de la actividad de los péptidos descritos. Rescate del daño al ADN.

Se obtuvieron lisados bacterianos de bacterias RosettaGami2 expresando el vector bacteriano pGATEVGSE24-2. Para ello las bacterias se sonicaron en un medio salino con inhibidores de proteasas y la proteína de fusión expresada por el plásmido bacteriano fue purificada por columnas de glutation sepharosa. Los lisados se sometieron a HPLC para separar los péptidos del resto de proteínas celulares arrastradas utilizando columnas de separación por tamaño y carga. Las fracciones resultantes fueron secuenciadas utilizando un secuenciador que utiliza un método derivado del método de EDMA y de uso comercial. Los diferentes péptidos encontrados en los lisados bacterianos de bacterias expresando el GSE24.2 fueron obtenidos por síntesis química y se ensayaron para la actividad de rescate del daño al ADN utilizando las células F9A353V que portan la mutación más frecuente en pacientes con disqueratosis congénita A353V. Para ello los diferentes péptidos se lipofectaron utilizando el reactivo Proteojuice en células F9A353V y como control de daño (células sin daño) se utilizaron las células control F9. Se utilizó un péptido no relacionado como control negativo y el GSE 24.2 completo como control positivo. Tras cuantificar los western blot (Figura 6) se encontró que el GSE4 es el péptido de menor tamaño capaz de rescatar el daño al ADN medido por magnitud de fosforilación de la histona H2AX Ser319, que aparece en las células A353V (Figura 7).

Con el fin de optimizar las condiciones de funcionamiento del péptido GSE4, se transfectaron diferentes cantidades del péptido GSE4 en las células F9A353V y se determinó la magnitud del daño al ADN utilizando un anticuerpo específico tal como se realizó en la Figura 6 (Figura 8). Tras la cuantificación del western blot (Figura 9) se observa que la máxima inhibición del daño al ADN se obtiene transfectando 8µg del péptido GSE4.

EJEMPLO 6. Medida de aumento de actividad telomerasa tras el tratamiento con el péptido GSE4.

La otra forma de cuantificar la actividad del péptido GSE4 ha sido evaluar la capacidad del mismo de aumentar la actividad telomerasa en las células VA13. Para ello se transfectaron estas células con 8µg de los dos péptidos GSE4 y GSES. Tras 48 horas las células se procesaron para ensayar la actividad telomerasa por el método TRAP.

- 5 Tal como se puede apreciar en la figura 10 (A y B), a pesar de que el péptido GSES tiene una actividad de rescate del daño al ADN similar al GSE4, este último tiene una actividad mucho mayor reactivando la actividad telomerasa. Por tanto, la actividad del péptido GSE4 es la más eficiente para la reactivación de la actividad telomerasa.

10 **EJEMPLO 7.** Medida de disminución de estrés oxidativo, inflamación y senescencia tras el tratamiento con el péptido GSE4.

15 Como el péptido denominado GSE4, era el de menor tamaño entre los péptidos con capacidad de rescatar actividad telomerasa, estudiamos si tenía la misma actividad que el péptido GSE24.2 para atenuar el estrés oxidativo, la expresión de citoquinas proinflamatorias y rescatar la senescencia en células de ataxia telangiectasia. Tal como se puede apreciar en la figura 11, el péptido GSE4 es capaz de disminuir hasta en un 50% los niveles de radicales libres al igual que lo hace el péptido GSE24.2 en células AT-719P. Además, en estas células es capaz de disminuir hasta en un 80% y 90% respectivamente los niveles de expresión de IL6 e IL8 (Figura 12), estos valores están en el mismo rango que el péptido GSE24.2. Finalmente dado que el aumento en la expresión de las interlequinas IL6 e IL8 están asociadas a un fenotipo secretor ligado a senescencia en ataxia telangiectasia, evaluamos la capacidad de ambos péptidos GSE24.2 y GSE4 de disminuir la senescencia, mediante la evaluación de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-beta-Gal) (Figura 13). Los datos mostraron que la expresión de ambos péptidos, disminuye el porcentaje de células positivas para actividad βgal de una forma progresiva en el tiempo. Los resultados de estos experimentos demuestran que la secuencia del péptido GSE4 conserva la región necesaria para además de la disminución del daño al ADN y aumento de actividad telomerasa, para disminuir el estrés oxidativo, los niveles de interlequinas proinflamatorias y la senescencia.

25 **EJEMPLO 8.** Medida del daño al ADN con el péptido GSE4 y uno de secuencia similar localizado en el dominio TRUBII de la disquerina denominado SGSE4.

30 Como el péptido denominado GSE4, era el de menor tamaño entre los péptidos con capacidad de inhibir el daño en el ADN, estudiamos si otro péptido con secuencia similar localizado dentro de la secuencia del péptido GSE24.2 tenía la misma actividad o si la misma era específica del GSE4. El péptido SGSE4 (SEQ ID No.15) utilizando similar al GSE4 en secuencia (los aminoácidos LDPKILDKP que constituyen una secuencia consenso para pseudouridina sintetas) y tamaño se encuentra en el dominio TRUBII de la disquerina. Para realizar este ensayo se utilizaron líneas celulares de pacientes con ataxia telangiectasia AT2078. La línea celular C-1787 se utilizó como línea celular control. Las células se infectaron con el vector lentiviral bicistrónico pCMV-GFP-GSE4, SGSE4 o GFP. Tras 48 horas después de la infección las células fueron fijadas con formaldehído y posteriormente permeabilizadas tratándolas con Tritón X-100. El daño al ADN se estimó estudiando la señal tras la hibridación de las células con un anticuerpo contra la histona H2AX Ser139 y posterior hibridación con un anticuerpo ligado a fluoresceína. El número de focos (foci) con tinción para histona H2AX/núcleo se ha determinado utilizando microscopia confocal en un total de 200 células y los datos representados como porcentaje de células con un determinado número de foci.

45 En la figura 14, se puede observar que la expresión del GSE4 corrige el daño global en el ADN en un 38% de las células AT por lo tanto se observa una corrección global del daño al ADN del 60%. El péptido SGSE4, no es capaz de corregir el daño al ADN en las mismas condiciones. Por tanto, solo la secuencia GSE4 y no otra similar es capaz de rescatar el daño en el ADN en células AT.

50 **EJEMPLO 9.** Ensayo de la capacidad de entrar en las células de los péptidos GSE24.2 con y sin señal de localización nuclear.

55 Un aspecto relevante a investigar del péptido GSE24.2 es su localización subcelular una vez expresado. Por tanto se obtuvieron diferentes construcciones colocando en la región 5' y 3' del GSE 24.2 dos señales de localización nuclear NLS1 y NLS2. NLS1 es una señal presente en la secuencia del gen DKC1 que lleva a la proteína al núcleo y la secuencia NLS2 media el transporte al nucléolo. En la figura 15 se presenta la secuencia de ambas señales de localización nuclear. Se ha utilizado el plásmido de expresión en células eucariotas, pCDNA3myc, que contiene un Tag del gen c-myc en la posición 5' fusionado con la secuencia GSE24.2. Se han obtenido varias construcciones que se representan en la figura 16, colocando las secuencias NLS1 y NLS2 tanto en las posiciones 5' como 3' en la secuencia del GSE24.2. Las construcciones denominadas NLS1-3, NLS1-5, NLS2-3 y NLS2-5 de GSE24.2 se han transfectado en células HeLa. Estas construcciones llevan la secuencia Tag de c-myc reconocido con el anticuerpo 9E10, para localizar la expresión en las construcciones.

60 En la figura 17 se puede observar como las construcciones con la señal de localización NLS1 o NLS2 en la posición 3' del GSE24.2 son las que preferentemente facilitan la expresión en núcleo del GSE24.2. En las figuras 18 y 19 se puede observar un detalle de la localización subcelular de las construcciones NLS1-3 y NLS2-3.

65

EJEMPLO 10. Actividad de las construcciones GSE24.2NLS1-3 y GSE24.2NLS2-3 para activar la expresión de c-myc.

5 Con el objeto de evaluar la actividad biológica de las construcciones conteniendo las señales NLS1-3 y NLS2-3, se transfectoron en células 293T junto con el gen reportero del promotor de c-myc y se evaluó la actividad luciferasa activada por ambas construcciones GSE24.2NLS1-3 y GSE24.2NLS2-3 en relación al GSE24.2. Como se puede observar en la figura 20 tanto los vectores GSE24.2NLS1-3 como GSE24.2NLS2-3 activan la expresión del promotor de c-myc con mayor eficiencia que el GSE24.2. Estos datos están de acuerdo con una mayor capacidad de ambas construcciones de expresarse en el núcleo celular. De entre las dos construcciones la más eficiente ha sido la construcción con la señal NLS1 en la posición 3.

EJEMPLO 11. Capacidad del GSE4 de entrar en las células.

15 Dada la capacidad de la secuencia NLS1 de contribuir a la actividad del GSE24.2, se encargó un péptido sintético en el cual se colocó esta secuencia en la región 3' del péptido GSE4, ya que éste era el péptido para el cual se obtuvo una mayor activación de la telomerasa. Los péptidos obtenidos por síntesis química fueron marcados con fluoresceína para facilitar su visualización en un microscopio de fluorescencia. Se realizaron dos experimentos en paralelo, por una parte los péptidos se transfectoron utilizando el reactivo Proteojuice o se añadieron directamente al medio de cultivo. Los resultados han mostrado que tanto el GSE4 y el GSE4NLS1 (SEQ ID No.7) entran en la célula utilizando el reactivo Proteojuice (Figura 21) o simplemente añadiéndolo al medio de cultivo (Figura 22). Una diferencia importante observada es que cuando se añaden los péptidos directamente al medio de cultivo hay un mayor número de células en las cuales entra el péptido, que cuando se utiliza Proteojuice. Con el reactivo, hay una mayor eficiencia de internalización pero a un menor número de células.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
 Universidad Autónoma de Madrid
 30 Advanced Medical Projects
 Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERER)
 Network

35 <120> PÉPTIDOS DERIVADOS DE GSE24.2 PARA TRATAR ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO AL ADN

<130> 120140261

40 <150> ESP201331573
 <151> 2013-10-25

<160> 15

45 <170> BiSSAP 1.2

<210> 1
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <220>
 <223> GSE24.2

55 <400> 1

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

65 <210> 2

ES 2 781 566 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <220>
 <223> GSE4
 <400> 2
 10 Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> GSE1
 20 <400> 3
 Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val
 1 5 10 15
 25 Val
 <210> 4
 <211> 18
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> GSE2
 35 <400> 4
 Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val
 1 5 10 15
 40 Val Ala
 <210> 5
 <211> 19
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> GSE3
 50 <400> 5
 Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val
 1 5 10 15
 55 Val Ala Trp
 <210> 6
 <211> 25
 60 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> GSE5
 65

<400> 6

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

5 Val Ala Trp Ile Arg Arg Ile Leu Arg
 20 25

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> GSE4NLS1-3

15 <400> 7

Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro Lys Arg Lys Arg
 1 5 10 15

20 <210> 8
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <223> GSE24.2NLS1-3

<400> 8

30 Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val
 1 5 10 15
 Val Ala Trp Ile Arg Arg Ile Leu Arg Val Glu Lys Thr Gly His Ser
 20 25 30

35 Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val Thr Gly Cys Leu Ile Val Cys Ile Glu
 35 40 45
 Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys Lys Arg Lys Arg
 50 55

40 <210> 9
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <220>
 <223> GSE24.2NLS2-3

<400> 9

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

55 Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys Lys Lys Glu Lys Lys Lys Ser Lys
 50 55 60

<210> 10
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> GSE24.2NLS1-5

65

<400> 10

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

<210> 11

<211> 63

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> GSE24.2NLS2-5

20

<400> 11

Lys Lys Glu Lys Lys Lys Ser Lys Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro
 1 5 10 15
 25 Ser Asn Pro Ser Ser His Glu Val Val Ala Trp Ile Arg Arg Ile Leu
 20 25 30
 Arg Val Glu Lys Thr Gly His Ser Gly Thr Leu Asp Pro Lys Val Thr
 35 40 45
 30 Gly Cys Leu Ile Val Cys Ile Glu Arg Ala Thr Arg Leu Val Lys
 50 55 60

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<220>

<223> GSE4NLS1-5

40 <400> 12

Lys Arg Lys Arg Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro
 1 5 10 15

45 <210> 13

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

50 <220>

<223> GSE4NLS2-3

<400> 13

Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro Ser Asn Pro Lys Lys Glu Lys Lys
 1 5 10 15
 Lys Ser Lys

60 <210> 14

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

65 <223> GSE4NLS2-5

ES 2 781 566 T3

<400> 14

5 Lys Lys Glu Lys Lys Lys Ser Lys Gly Phe Ile Asn Leu Asp Lys Pro
1 5 10 15
Ser Asn Pro

<210> 15

10 <211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

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

REIVINDICACIONES

- 5 1- Polipéptido caracterizado por que comprende un fragmento de la secuencia del péptido GSE24.2 (SEQ ID No.:1) con SEQ ID No.: 2 capaz de disminuir la producción de radicales libres y/o el daño en la estructura del ADN de una célula, y dicho polipéptido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.: 5 y SEQ ID No.: 6.
- 2- Polipéptido según la reivindicación 1, caracterizado por que además comprende al menos una secuencia de localización nuclear unida en al menos uno de los extremos carboxilo o amino terminal.
- 10 3- Polipéptido según la reivindicación 2, caracterizado por que la secuencia de localización nuclear es SEQ ID NO:16 y/o SEQ ID NO: 17.
- 15 4- Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, caracterizado por que consiste en una secuencia seleccionada del grupo compuesto por: SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.:13 y SEQ ID No.:14.
- 5- Polinucleótido caracterizado por que codifica un polipéptido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6- Vector de expresión caracterizado por que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 7- Composición farmacéutica caracterizada por que comprende al menos un polipéptido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y/o un polinucleótido según la reivindicación 5 y/o un vector de expresión según la reivindicación 6.
- 25 8- Composición farmacéutica según la reivindicación 7 caracterizada por que comprende además al menos un adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 9- Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad y/o de un trastorno provocado por un aumento del estrés oxidativo y/o del daño del ADN celular.
- 35 10- Polipéptido para su uso según la reivindicación 9 caracterizado por que el polipéptido se selecciona entre al menos uno del grupo compuesto por: SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.: 5, SEQ ID No.: 6, SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.: 13, y SEQ ID No.: 14.
- 40 11- Polipéptido según la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad y/o de un trastorno provocado por un aumento del estrés oxidativo y/o del daño del ADN celular.
- 12- Un vector de expresión según la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad y/o de un trastorno provocado por un aumento del estrés oxidativo y/o del daño del ADN celular.
- 45 13- Polipéptido para su uso según las reivindicaciones 9 y 10, polinucleótido para su uso según la reivindicación 5 o vector de expresión para su uso según la reivindicación 6, caracterizado por que la enfermedad o trastorno se selecciona entre al menos uno del grupo compuesto por: disqueratosis congénita, una enfermedad neurodegenerativa, síndrome del maullido de gato (Cri du Chat), ataxia telangiectasia, síndrome de "Nijmegen Breackage", síndrome de Bloom, síndrome de Werner, anemia de Fanconi, colitis ulcerosa, envejecimiento vascular, arteriosclerosis, preferentemente aterosclerosis, cáncer, distrofia muscular de Duchene, progeria, hipersensibilidad a luz, inestabilidad genética causada por una mutación o un agente externo, síndrome de Hutchison Gilford, xeroderma pigmentosum, síndrome de Rothmund Thompson, fibrosis pulmonar, artritis reumatoide, una enfermedad con inflamación crónica y una enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre al menos una del grupo
- 50 compuesto por: enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelosa y degeneración de medula espinal.
- 55 14- Uso *in vitro* de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o del polinucleótido según la reivindicación 5 o el vector según la reivindicación 6 en ingeniería de tejidos y cultivo celular para mejorar la viabilidad celular.

Línea celular	Sin daño DNA 0 focos/célula	Nivel medio daño DNA 5-20 focos/célula	Nivel alto daño DNA >20 focos/célula
C-1787 Células normales	95% de las células	8% de las células	0% de las células
AT 3487 Células ataxia	5% de las células	45% de las células	55% de las células
AT 3487 GSE24.2 Células ataxia	20% de las células	55% de las células	25% de las células

FIG 1.

Línea celular	Sin daño DNA 0 focos/célula	Nivel medio daño DNA 5-20 focos/célula	Nivel alto daño DNA >20 focos/célula
C-1787 Células normales	95% de las células	5% de las células	0% de las células
AT 3487 Células ataxia	15% de las células	55% de las células	30% de las células
AT 3487 GSE24.2 Células ataxia	30% de las células	53% de las células	17% de las células

FIG 2.

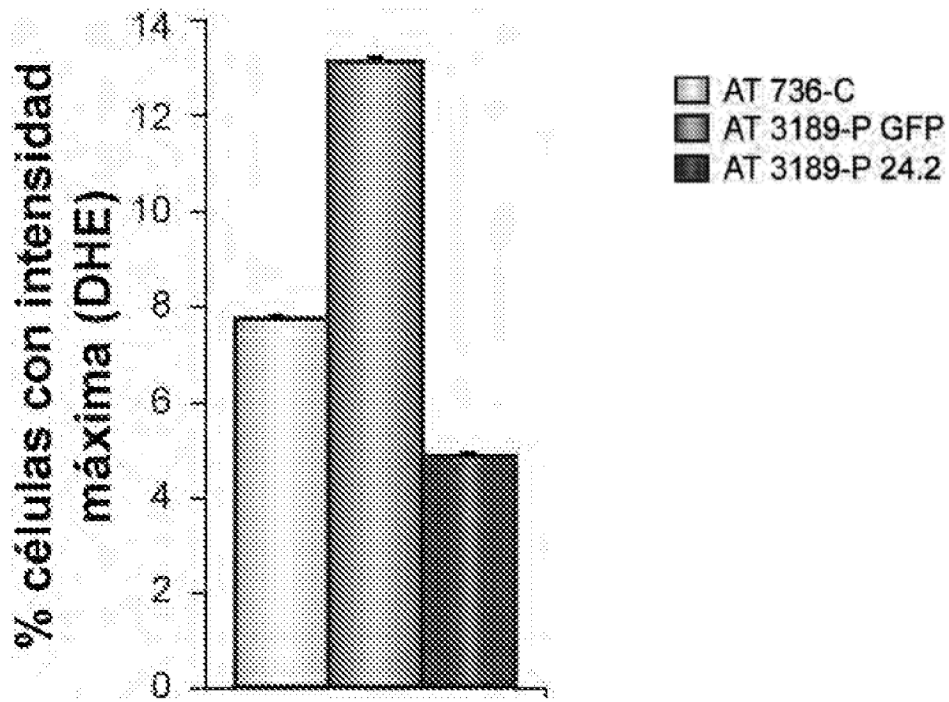


FIG 3.

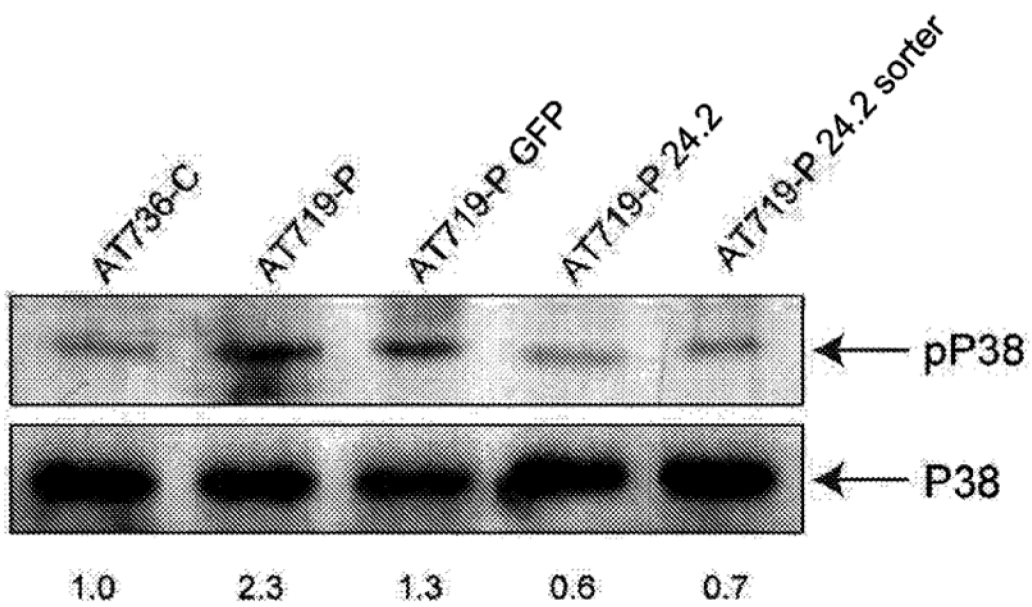


FIG 4.

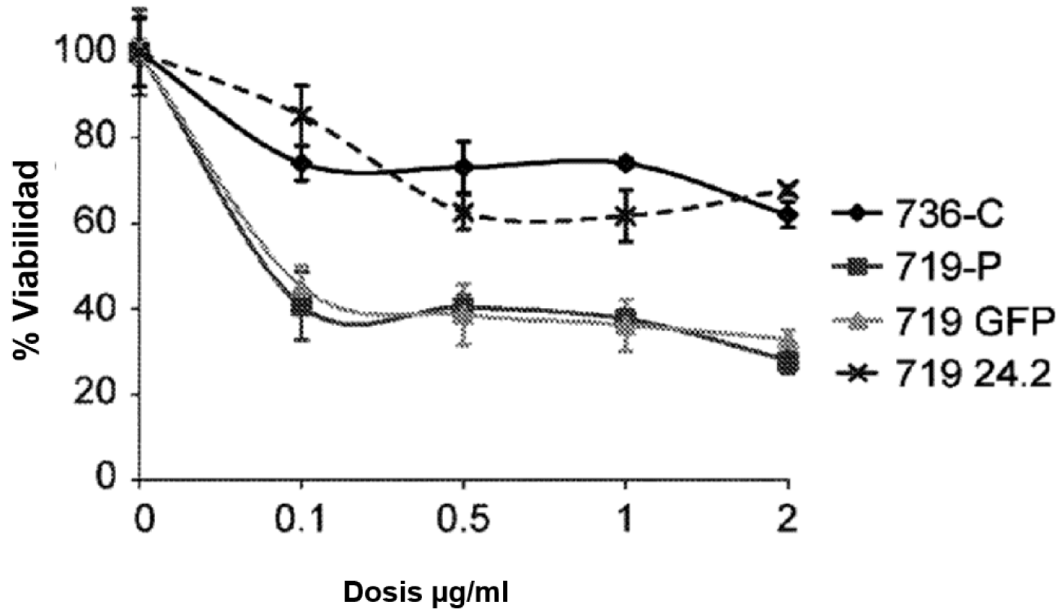
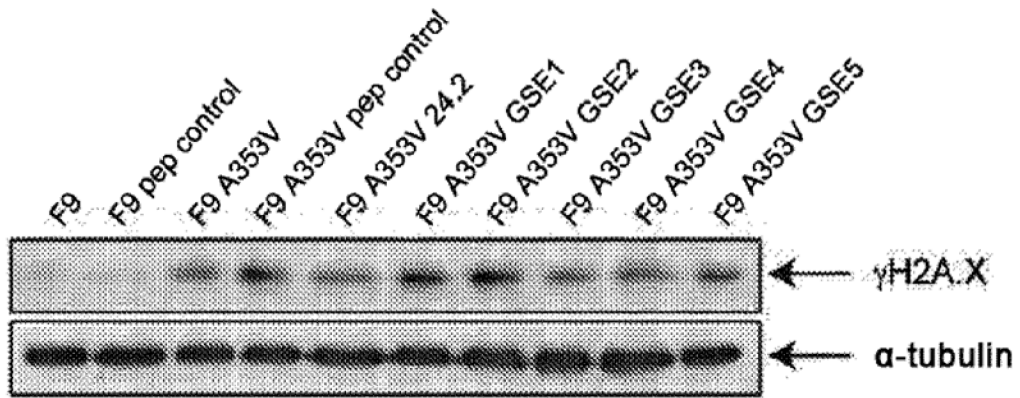


FIG 5.



SEQ ID No.: 1 **24.2 (55aa)** GFINLDKPSNPSSHEVVAVIRRILRVEKTGHSGTLDPKVTGCLIVCIERATRLVK
 SEQ ID No.: 3 **GSE1 (17aa)** GFINLDKPSNPSSHEVV
 SEQ ID No.: 4 **GSE2 (18aa)** GFINLDKPSNPSSHEVVA
 SEQ ID No.: 5 **GSE3 (19aa)** GFINLDKPSNPSSHEVVAV
 SEQ ID No.: 2 **GSE4 (11aa)** GFINLDKPSNP
 SEQ ID No.: 6 **GSE5 (25aa)** GFINLDKPSNPSSHEVVAVIRRILR

FIG 6.

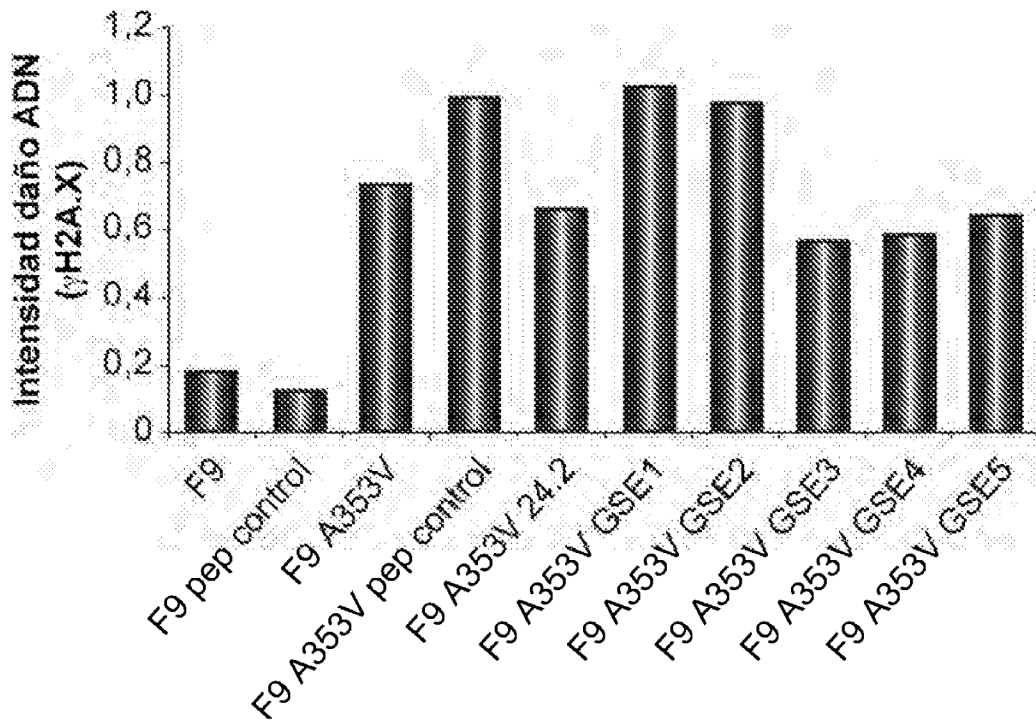


FIG 7.

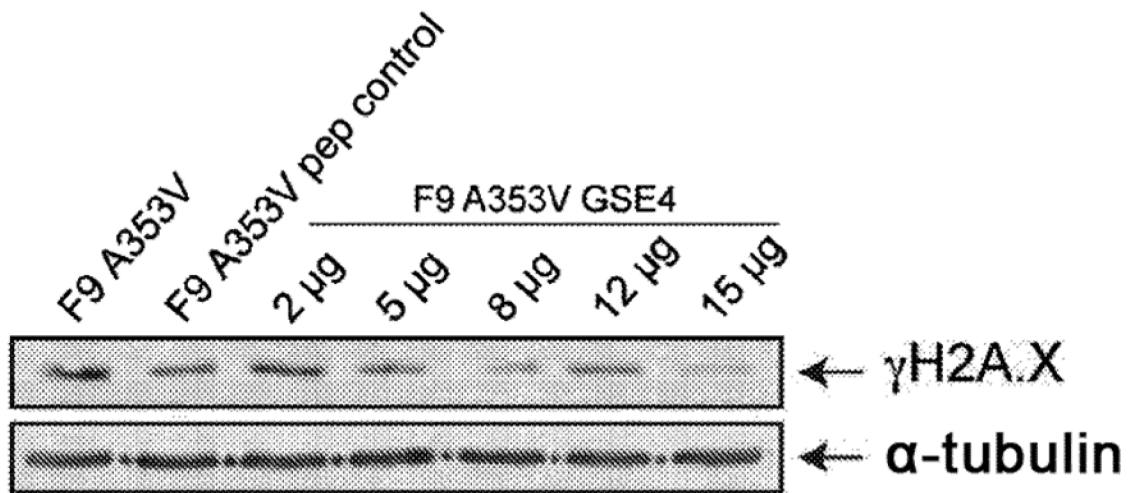


FIG 8.

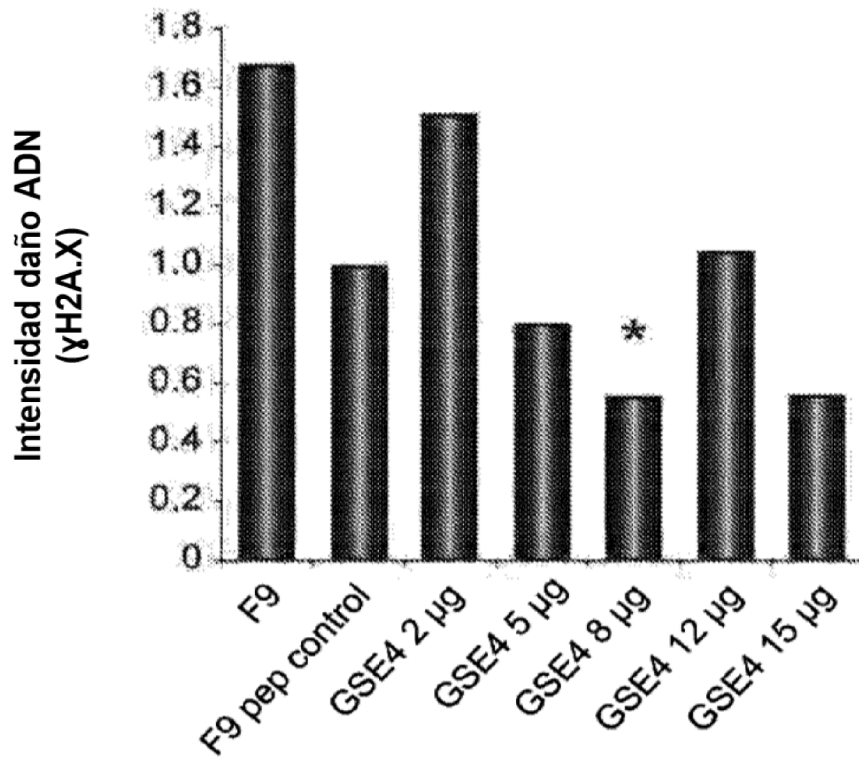


FIG 9.

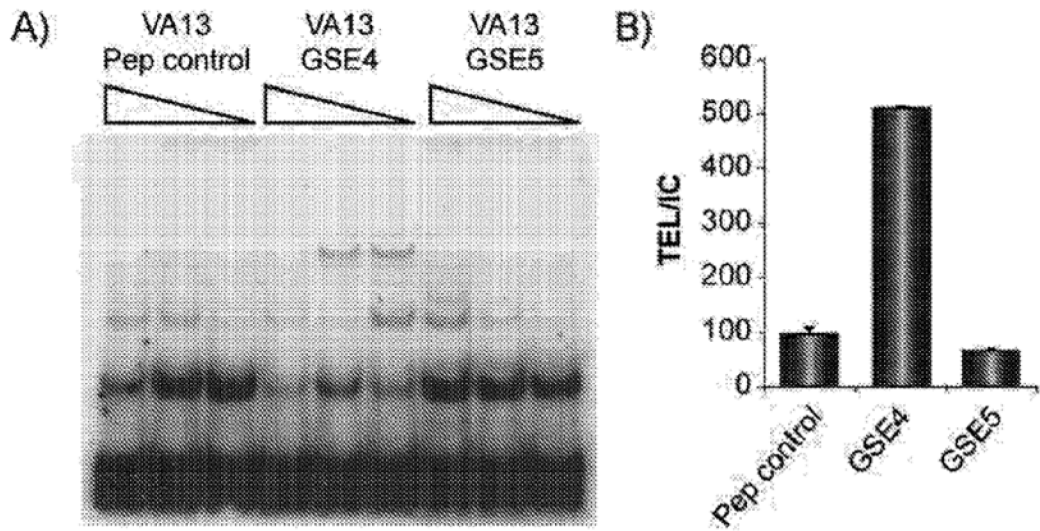


FIG 10.

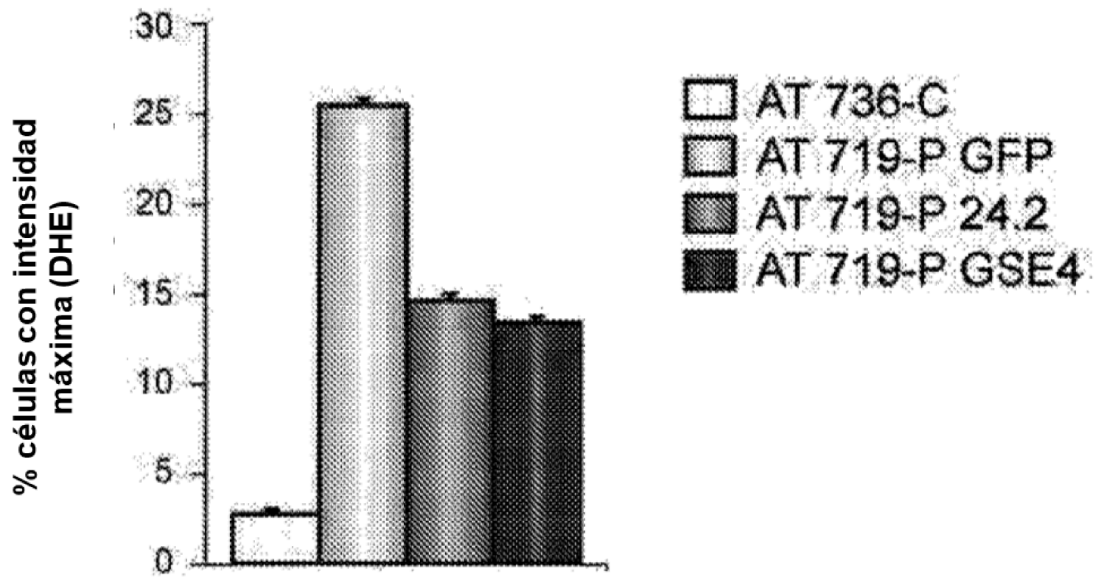


FIG 11.

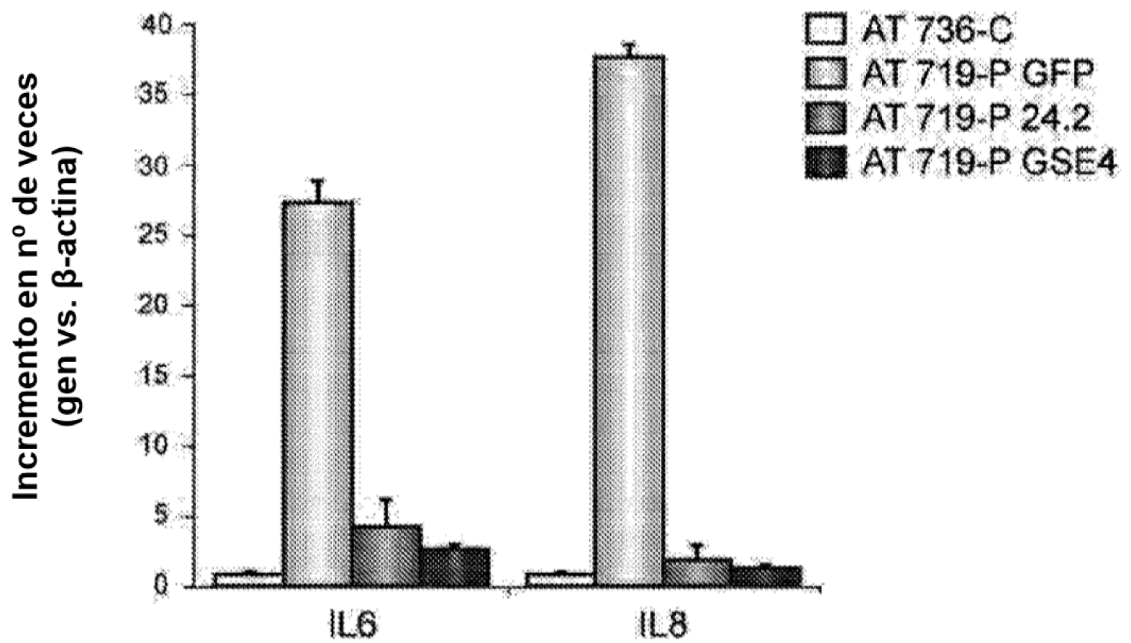


FIG 12.

Línea celular	Células β -gal+ senescentes	Células β -gal- en división
C-1787 Células normales	5% de las células	95% de las células
AT 2078 GFP	85% de las células	15% de las células
AT 2078 GSE24.2	70% de las células (3 días)	30% de las células (3 días)
	60% de las células (8 días)	40% de las células (8 días)
AT 2078 GSE4	68% de las células (3 días)	32% de las células (3 días)
	58% de las células (8 días)	42% de las células (8 días)

FIG 13.

Línea celular	Sin daño DNA 0 focos/célula	Nivel medio daño DNA 5-20 focos/célula	Nivel alto daño DNA >20 focos/célula
C-1787 Células normales	98% de las células	2% de las células	0% de las células
AT 2078 GFP Células ataxia	12% de las células	36% de las células	52% de las células
AT 2078 SGSE4 Células ataxia	14% de las células	31% de las células	55% de las células
AT 2078 GSE4 Células ataxia	38% de las células	46% de las células	16% de las células

FIG 14.

Núcleo (NLS1) KRKR (SEQ ID NO: 16)

Nucleolo (NLS2) KKEKKKSKK (SEQ ID NO: 17)

FIG 15.

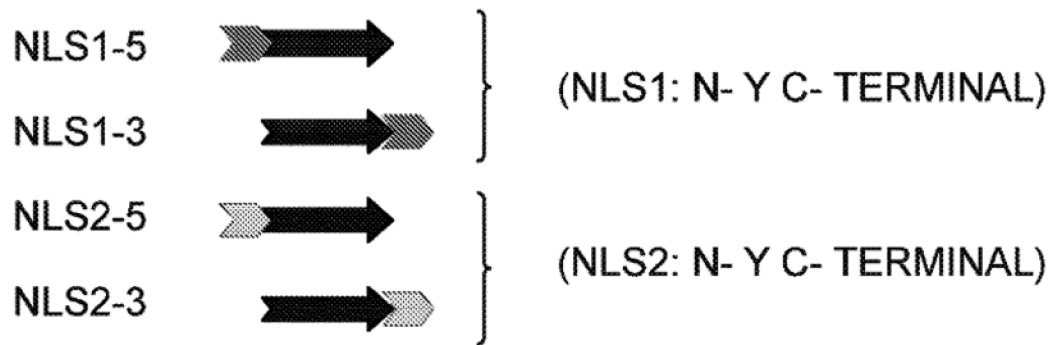


FIG 16.

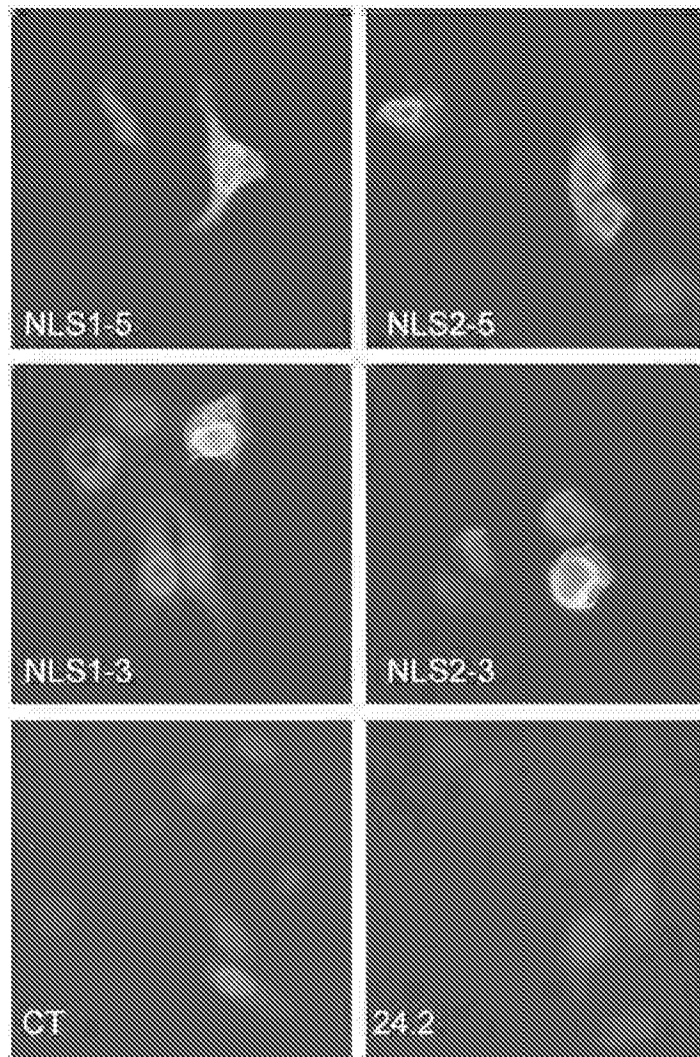


FIG 17.

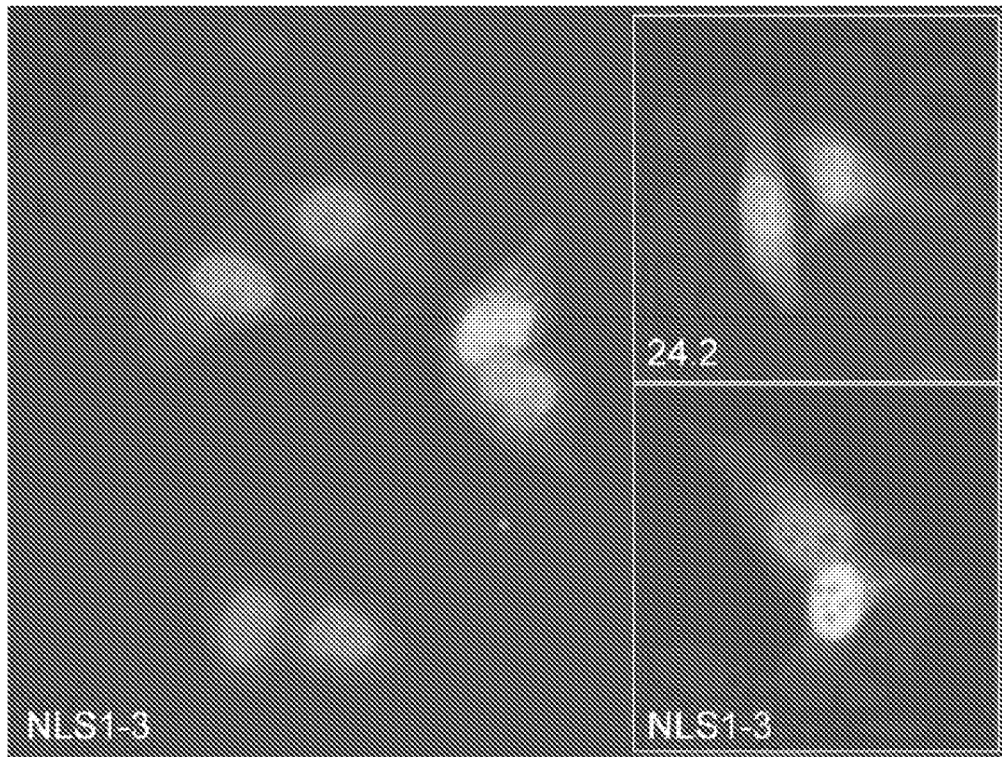


FIG 18.

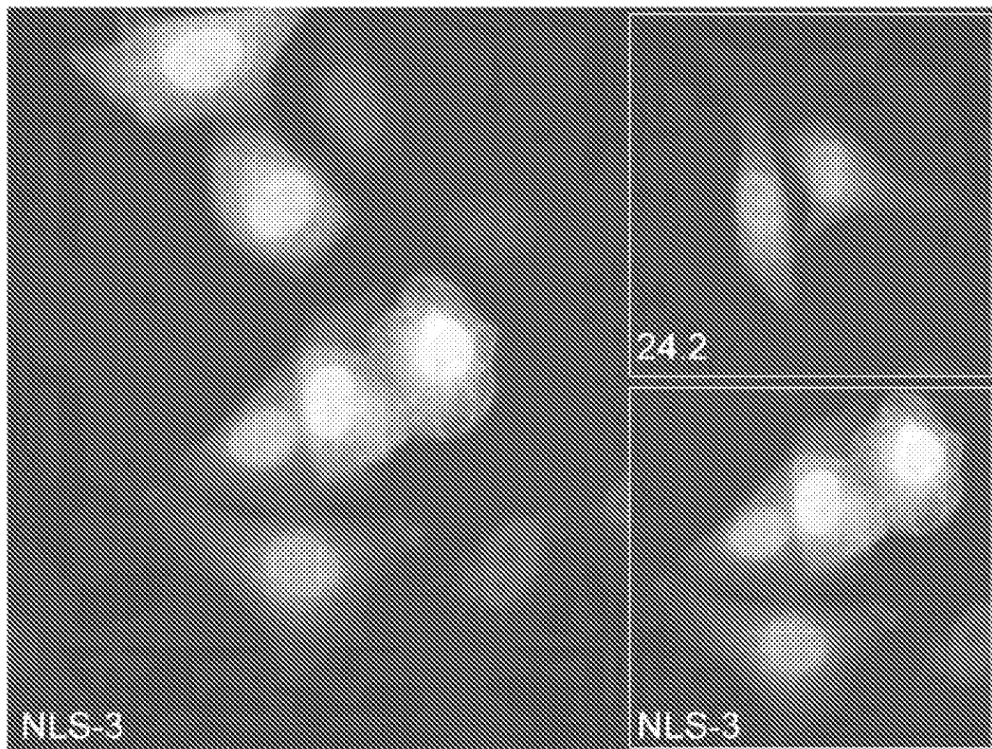


FIG 19.

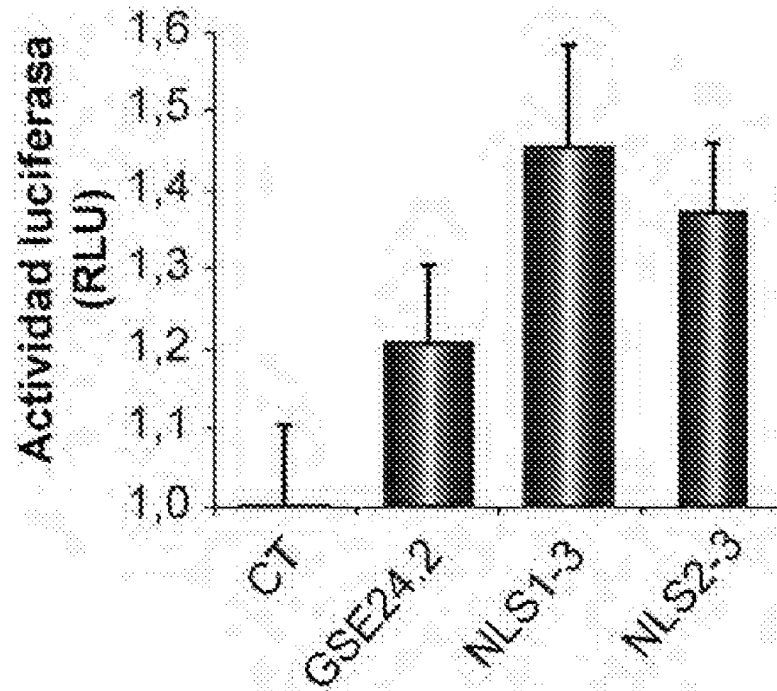


FIG 20.

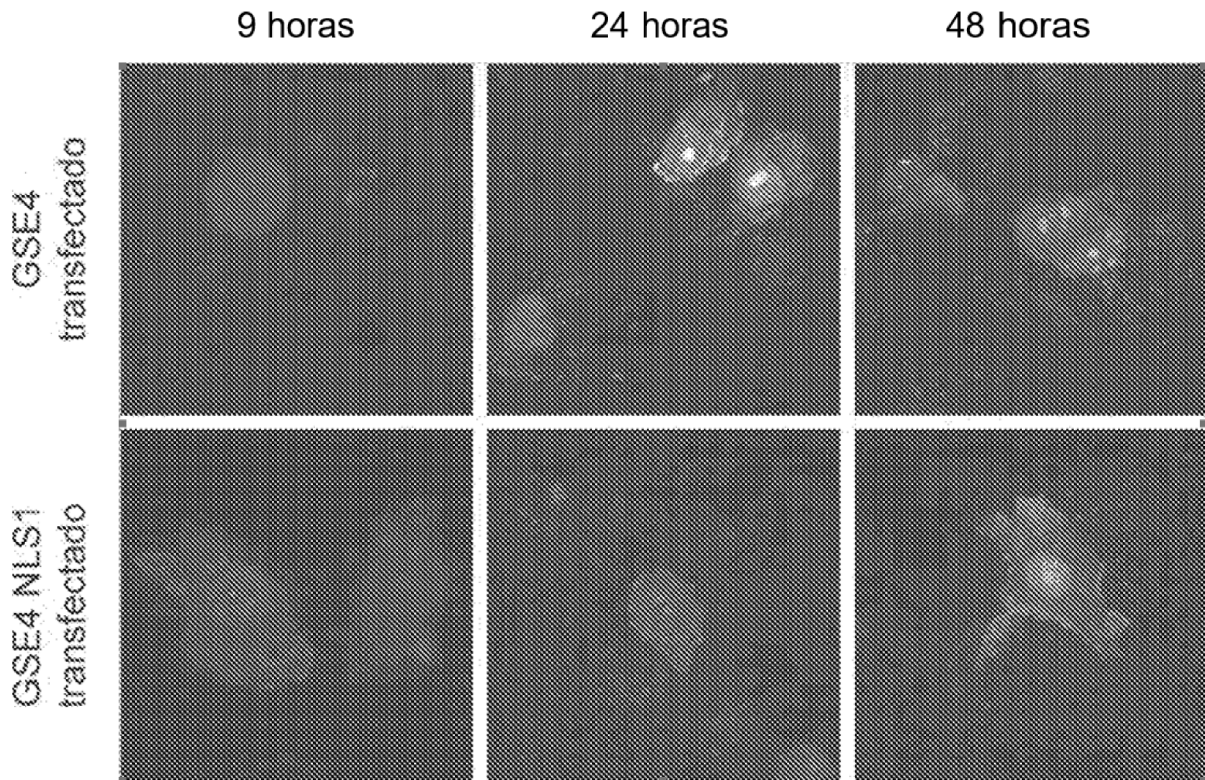


FIG 21.

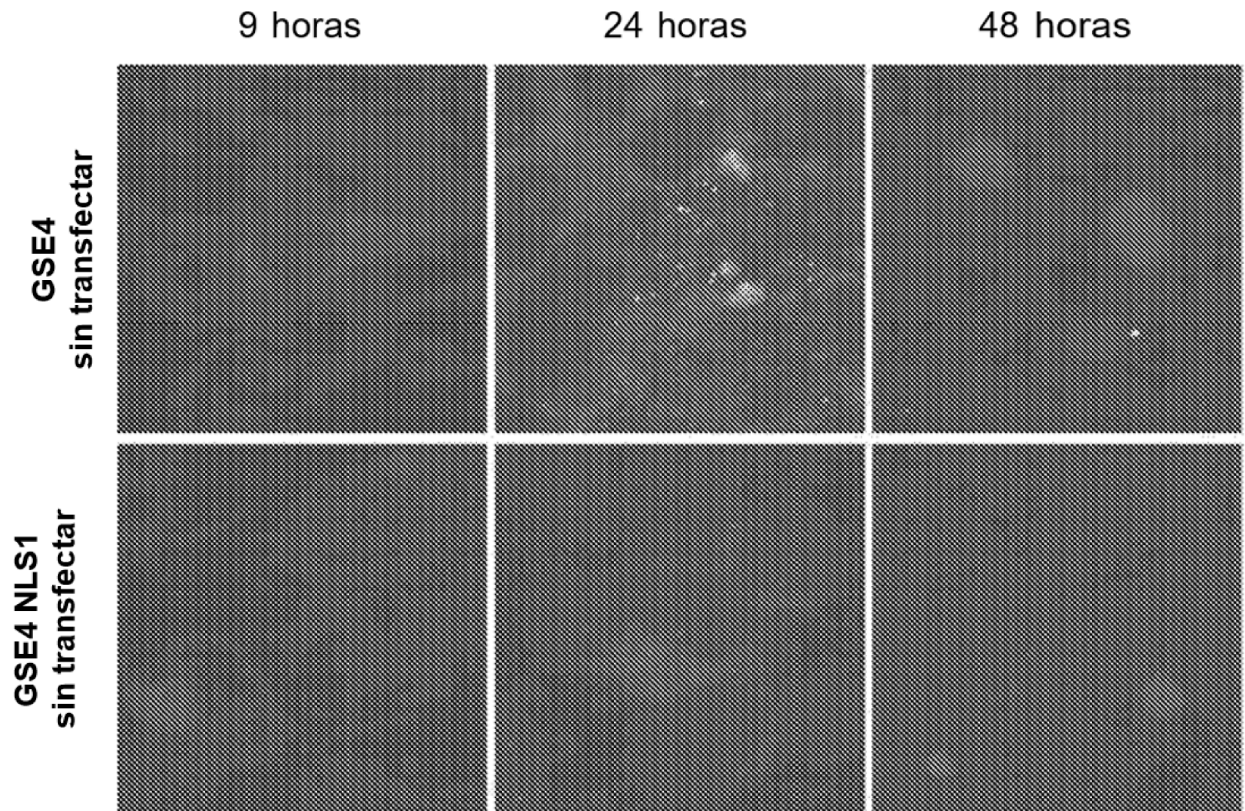


FIG 22.