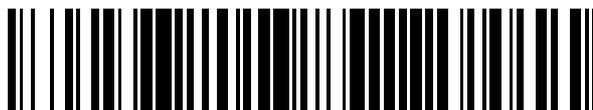


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 097**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2009 E 09707233 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2300614**

54 Título: **Procedimientos y composiciones de tratamiento de trastornos mitocondriales**

30 Prioridad:

04.02.2008 US 25931 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2016

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM
LTD. (50.0%)
Hi-Tech Park, Edmond J. Safra Campus, Givat-
Ram, Jerusalem, P.O. Box 39135
Jerusalem 91390, IL y
HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES AND
DEVELOPMENT LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GALSKI-LORBERBOUM, HAYA;
RAPOPORT, MATAN;
ELPELEG, ORIY y
SAADA, ANN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el
folleto original publicado por la Oficina
Europea de Patentes**

ES 2 560 097 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

Procedimientos y composiciones de tratamiento de trastornos mitocondriales

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a proteínas de fusión que comprenden un resto de transferencia a través de la membrana y un resto enzimático para su uso en procedimientos de tratamiento de la enfermedad.

Antecedentes de la invención

Trastornos metabólicos mitocondriales

10 Las mitocondrias desempeñan un papel importante y crítico en la homeostasis celular. Participan en la señalización intracelular, la apoptosis y llevan a cabo numerosas tareas bioquímicas, tales como la oxidación de piruvato, el ciclo de Krebs y el metabolismo de los aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos y esteroides. Una tarea fundamental es su papel en el metabolismo energético celular.

Esto incluye la β -oxidación de los ácidos grasos y la producción de ATP por medio de la cadena de transporte de electrones y el sistema de fosforilación oxidativa (Chinnery 2003).

15 La cadena respiratoria mitocondrial consta de cinco complejos de proteínas de múltiples subunidades embebidos en la membrana interna, que comprende: complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa), complejo II (succinato-ubiquinona oxidoreductasa), complejo III (ubiquinol-ferricitocromo c oxidoreductasa), complejo IV (citocromo c oxidoreductasa) y complejo V (F1F0 ATPasa).

20 La mayoría de los aproximadamente 900 productos génicos de las mitocondrias están codificados por el ADN nuclear (ADNn); el ADNmt contiene sólo 13 genes codificantes de proteínas. La mayoría de estos polipéptidos se sintetizan con una secuencia de direccionamiento mitocondrial (MTS), que permite su importación desde el citoplasma a la mitocondria a través de la maquinaria de translocación (TOM/TIM). Una vez dentro de las mitocondrias, el MTS se reconoce y escinde, lo que permite el procesamiento adecuado y, si es necesario, el montaje en complejos enzimáticos mitocondriales (Chinnery, 2003).

Deficiencia de LAD

25 Una de estas proteínas importadas es la lipoamida deshidrogenasa (LAD) (EC 1.8.1.4), que es la tercera subunidad catalítica (E3) de tres complejos enzimáticos de la matriz mitocondrial, que es crucial para el metabolismo de azúcares y aminoácidos, los complejos α -cetoácido deshidrogenasa. Esto incluye el complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC), el complejo α -cetoglutarat deshidrogenasa (KGDHC) y el complejo cetó-ácido de cadena ramificada deshidrogenasa- (BCKDHC). La LAD es también un componente (L-proteína) del sistema de escisión de glicina en las mitocondrias (Chinnery, 2003; Brautigam, 2005).

30 Los defectos en cualquiera de las numerosas vías bioquímicas mitocondriales pueden causar enfermedad mitocondrial. Una de dichas enfermedades mitocondriales es la deficiencia de lipoamida deshidrogenasa (LAD) (Elpeleg 1997). La LAD es una flavoproteína disulfuro oxidoreductasa que cataliza la re-oxidación reversible del resto dihidrolipoil unido a proteínas, donde el NAD^+ actúa como su aceptor de electrones final (Vettakkorumakankav 1996). El precursor de LAD se sintetiza con una secuencia de MTS de 35AA N-terminal. Un número significativo de pacientes han sido diagnosticados con deficiencia de LAD (Berger 1996, Elpeleg 1997, Shaag 1999). Este trastorno hereditario autosómico recesivo tiene como resultado grandes alteraciones metabólicas debido a la reducción de las actividades de los tres complejos α -cetoácido deshidrogenasa. Los síntomas incluyen acidemia láctica, disfunción del ciclo de Krebs y alteración de la degradación de aminoácidos de cadena ramificada. El curso clínico de la deficiencia de LAD se caracteriza por presentarse o bien en la infancia como una enfermedad neurológica de diversa gravedad o más tarde en la vida con episodios recurrentes de insuficiencia hepática o mioglobinuria (Shaag, 1999).

35 La base molecular de la deficiencia de LAD se ha dilucidado y se ha puesto de manifiesto la correlación genotipo-fenotipo (Shaag 1999). La mayoría de las mutaciones se asocian con el curso neurodegenerativo grave, por ejemplo, D479V, P488L, K72E, R495G, Y35X, E375K y una delección en marco de Gly136. La mayoría de los pacientes mueren en la primera infancia. En los homocigotos para la mutación G229C, una mutación común en judíos Ashkenazi (tasa de portadores \sim 1:94), el sistema nervioso central está a salvo entre los episodios. La heterocigosidad compuesta para las mutaciones G229C e Y35X se asocia con enfermedad hepática episódica y afectación neurológica moderada (Shaag, 1999).

Deficiencia de complejo I

50 El complejo I es el principal punto de entrada de los electrones en la cadena respiratoria mitocondrial y contribuye a la creación de un gradiente de protones requeridos para la síntesis de ATP. El complejo I es el más complicado de los complejos de la cadena respiratoria, contiene 45 subunidades diferentes en mamíferos, formando un complejo de \sim 1 MDa. De las subunidades del complejo I, siete están codificadas por el ADN mitocondrial (ADNmt), mientras que el resto son codificadas por genes nucleares, traducidas en el citosol e importadas en el orgánulo a través de las

translocasas de la membrana externa e interna. El complejo I tiene una configuración en forma de L bipartita que consiste en un brazo de matriz periférica y un brazo de membrana. La deficiencia aislada de complejo I es el más común de los trastornos metabólicos mitocondriales, lo que representa un tercio de todos los casos de deficiencia de la cadena respiratoria. Sólo en el 20 % de los pacientes se detectan mutaciones en los genes de ADNmt, lo que sugiere que la mayoría de los pacientes con deficiencias aisladas de complejo I llevan mutaciones en genes nucleares que codifican subunidades del complejo I.

Actualmente, no existe una cura para los trastornos metabólicos mitocondriales genéticos. El tratamiento es principalmente paliativo.

Terapia de reemplazo enzimático

La terapia de reemplazo enzimático (TRE) es un enfoque terapéutico para los trastornos metabólicos, mediante el cual, la enzima deficiente o ausente se fabrica artificialmente, se purifica y se administra por vía intravenosa al paciente de forma regular. La TRE ha sido aceptada como el tratamiento de elección para las enfermedades metabólicas por depósito lisosomal, como la enfermedad de Gaucher (Sly WS. Enzyme replacement therapy: from concept to clinical practice. *Acta Paediatr, Suppl* 91(439):71-8, 2002), la enfermedad de Fabry (Desnick RJ y col., Fabry disease: clinical spectrum and evidence-based enzyme replacement therapy. *Nephrol Ther, Suppl* 2:S172-85, 2006) y variantes atenuadas de mucopolisacaridosis (MPS 1)

(Scarpa M y col., Mucopolysaccharidosis VI: the Italian experience. *Eur J Pediatr.* Jan 7, 2009). Sin embargo, la TRE nunca ha demostrado, ni se cree, ni si quiera se ha sugerido que sea útil para tratar trastornos que implican componentes enzimáticos de complejos enzimáticos multicomponente tales como el PDHC. Por otra parte, la incapacidad de las enzimas administrados por vía intravenosa para atravesar la barrera hematoencefálica limita severamente la aplicación de este enfoque para el tratamiento de otros trastornos metabólicos relacionados con el sistema nervioso central (Brady, 2004).

Un enfoque para la administración de proteínas en las células es la fusión con dominios de transducción de proteínas (PTD). La mayoría de los PTD son péptidos catiónicos (11-34 aminoácidos) que interactúan con los fosfolípidos cargados negativamente y los componentes de carbohidratos de la membrana celular, Futaki 2001. Los PTD permiten el paso de una proteína a través de las membranas celulares de una manera no totalmente aclarada, pero que se cree que no es ni a través de la fagocitosis ni tampoco a través de endocitosis en depresiones de clatrina mediada por el receptor. El PTD mejor conocido y utilizado es el péptido transactivador de la transcripción del VIH-1 (TAT). El péptido TAT es una porción rica en arginina y lisina de 11 aminoácidos (residuos 47-57) de la proteína Tat del VIH-1 que tiene la secuencia expuesta en la SEC. ID. N.º 10 (Kuppuswamy 1989). Las proteínas de fusión TAT pueden introducirse en células cultivadas, tejido intactos y tejidos vivos y atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) cuando se inyectan en ratones (Futaki 2001; Del Gaizo 2003a, Del Gaizo 2003b).

Las proteínas de fusión TAT también atraviesan las membranas mitocondriales. Cuando una MTS está presente, una proteína fluorescente verde (GFP) es retenida dentro de la matriz mitocondrial a lo largo del tiempo y persiste dentro de los tejidos de ratones inyectados durante varios días (Del Gaizo, V y col. Targeting proteins to mitochondria using TAT. *Mol. Genet. Metab* 80: 170-180, 2003; Del Gaizo, V y col. A novel TAT-mitochondrial signal sequence fusion protein is processed, stays in mitochondria, and crosses the placenta. *Mol. Ther.* 7: 720-730, 2003). El documento WO 05/042560, Payne, desvela además el uso de TAT dirigida a la frataxina de las mitocondrias, aunque no se ha demostrado que la frataxina translocada tenga alguna funcionalidad.

El documento US 20060211647, Khan, desvela el uso de un PTD para introducir GFP y el factor de transcripción A (TFAM) en las mitocondrias.

El documento WO 05/001062, Khan, desvela el uso de un vector dirigido a ácidos nucleicos de las mitocondrias que comprende un dominio de transducción de proteínas, Arg11 (SEC. ID. N.º 38) a la proteína de cabeza de un vector y la administración de GFP y proteína fluorescente roja utilizando el mismo.

Rapoport M. y col., *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, August 2006, Vol. 29, no. Suppl. 1, p. 15, describe una TRE para las enfermedades mitocondriales, tales como la deficiencia de LAD, utilizando una proteína de fusión que comprende LAD y el péptido TAT del VIH. La LAD administrada en las células y sus mitocondrias reemplaza la enzima endógena mutada. El TAT-LAD se incorpora de forma natural en los complejos α -ceto ácidos deshidrogenasa.

Angdisen J. y col., *Current Drug Targets. Immune, Endocrine and Metabolic disorders*, Mar 2005, Vol. 5, n.º 1, páginas 27-40 se refiere a defectos de la proteína trifuncional mitocondrial (MTP) y describe una construcción de proteína fluorescente verde (GFP) fusionada a TAT y MTS (secuencia de direccionamiento mitocondrial), que se localiza en las mitocondrias de las células.

Toro A. y col., *The Journal of Clinical Investigation*, octubre de 2006, vol. 116, n.º 10, páginas 2717, describe la administración intracelular mediada por TAT de la enzima citoplasmática purina nucleósido fosforilasa a diversos tejidos/órganos.

Khan S.M. y col., Journal of Bioenergetics and Biomembranes, agosto de 2004, Vol. 36, n.º 4, páginas 387-393 se refiere a la terapia génica y desvela la tecnología de transducción (protofección) que permite la inserción y expresión de genes mitocondriales humanos en las mitocondrias de las células vivas.

5 Ninguna de las referencias anteriores divulga o sugiere que cantidades suficientes de una enzima unida a un PTD puedan, después de atravesar tanto las membranas celulares como mitocondriales, retener no sólo la actividad enzimática sino la conformación adecuada para formar un componente funcional de un complejo enzimático multicomponente o reemplazar la función fisiológica desaparecida en un trastorno metabólico mitocondrial. Además, ninguna de las referencias anteriores desvela ni sugiere que una estrategia de este tipo pudiera funcionar a pesar de la presencia de una enzima mutada (sin sentido) en el complejo, de la cual se esperaría que bloquease la integración de cantidades significativas de la enzima funcional.

Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona una proteína de fusión para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno mitocondrial en un sujeto, comprendiendo dicha proteína de fusión un dominio de transducción de proteínas (PTD) fusionado a un componente funcional de una enzima mitocondrial y una secuencia de direccionamiento mitocondrial (MTS), en la que dicha MTS está situada entre dicho PTD y dicho componente funcional y en la que dicha MTS es una MTS de otra enzima mitocondrial que está codificada por un gen nuclear, en la que dicha enzima mitocondrial es una enzima de un complejo enzimático multicomponente mitocondrial, y en la que dicho dominio de transducción de proteínas es un péptido TAT, en la que dicho tratamiento comprende la administración de dicha proteína de fusión a dicho sujeto y es un tratamiento prolongado continuo para una enfermedad crónica o comprende una única o varias administraciones temporales para el tratamiento de un trastorno agudo.

20 Se desvela una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y como principio activo una proteína de fusión que comprende un dominio de transducción de proteínas fusionado a un componente funcional de una enzima mitocondrial.

25 La composición farmacéutica es para el tratamiento de un trastorno mitocondrial.

También se desvela el uso de una proteína de fusión que comprende un dominio de transducción de proteínas fusionado a un componente funcional de una enzima mitocondrial, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mitocondrial.

30 La proteína de fusión comprende una secuencia de direccionamiento mitocondrial (MTS). La MTS está presente entre el dominio de transducción de proteínas y el componente funcional de la enzima mitocondrial.

También se desvela un procedimiento para el tratamiento de un trastorno mitocondrial, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión que comprende un dominio de transducción de proteínas fusionado a un componente funcional de una enzima mitocondrial.

35 La expresión "**proteína de fusión**" en el contexto de la invención se refiere a una secuencia de aminoácidos, en su mayoría (pero no necesariamente) conectados entre sí por enlaces peptídicos, en el que una parte de la secuencia deriva (es decir, tiene similitud de secuencia con secuencias) de un origen (natural o sintético) y otra parte de la secuencia deriva de uno o más orígenes. Esta expresión se refiere al origen de las secuencias, ya que en la práctica cuando la proteína se prepara mediante técnicas recombinantes no hay distinción entre las partes "fusionadas".

40 El término "**fusionado**" de acuerdo con la proteína de fusión de la invención, se refiere al hecho de que las secuencias de los dos orígenes, preferentemente también las secuencias del dominio de translocación mitocondrial, MTS y la enzima mitocondrial, están unidas entre sí por enlaces covalentes. La fusión puede ser por conjugación química tal como mediante el uso de las metodologías del estado de la técnica usadas para conjugar péptidos. Sin embargo, de acuerdo con una realización preferida, la fusión es preferentemente mediante técnicas recombinantes, es decir, mediante la construcción de una secuencia de ácido nucleico que codifica para el conjunto de la proteína de fusión (que codifica para ambas secciones) de modo que esencialmente todos los enlaces son enlaces peptídicos. Tales proteínas de fusión recombinante en las que todos los enlaces son peptídicos tienen la ventaja de que el producto presenta una mayor homogeneidad con respecto a moléculas químicas químicamente conjugadas.

50 El término "**dominio de transducción de proteínas (PTD)**" se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos capaz de provocar el transporte de un péptido, secuencia o compuesto unido a él a través de las membranas celulares de forma independiente de la entrada mediada por receptor. En particular, es una secuencia que puede provocar el transporte a través tanto de la membrana citoplasmática como de la membrana mitocondrial. Estos son péptidos catiónicos caracterizados por estar fuertemente cargados de carga positiva, ser ricos en aminoácidos positivos tales como arginina o lisina.

55 Generalmente, estos dominios son péptidos catiónicos que tienen una longitud de 11-34 aminoácidos.

El PTD de la proteína de fusión para su uso de la presente invención es un péptido transactivador de la transcripción (TAT). Un ejemplo no limitante es el dominio de la proteína TAT del VIH-1 (SEC. ID. N.º 10).

La expresión "**enzima mitocondrial**" se refiere a una enzima que es esencial para una actividad biológica de las mitocondrias. La expresión "**complejo enzimático mitocondrial**" se refiere a una enzima que forma un complejo con otras enzimas, formando un complejo que es esencial para una actividad biológica de las mitocondrias. Generalmente, estas son enzimas o complejos de enzimas que, cuando faltan o están mutadas en al menos una subunidad, provocan un trastorno mitocondrial.

Un ejemplo preferido específico es la lipoamida deshidrogenasa (LAD), que es una disulfuro flavoproteína oxidorreductasa que cataliza la re-oxidación reversible del resto dihidrolipoil unido a proteínas, donde el NAD⁺ actúa como su aceptor de electrones final.

La "LAD" o dihidrolipoamida deshidrogenasa, como se usa en el presente documento, se refiere a un gen conocido también como DLD, tcag7.39, DLDH, E3, GCSL, LAD, PHE3, y que tiene el número de Acceso del GenBank N.º NG_008045 y número EC = "1.8.1.4". Una secuencia de aminoácidos representativa de LAD se expone en la SEC. ID. N.º 16 (GenBank N.º de acceso NP_000099).

En otra realización, la enzima mutante cuya actividad le es conferida por una proteína de fusión para su uso de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en la subunidad alfa de la 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (cetoácido deshidrogenasa E1 α de cadena ramificada) (N.º de acceso a la base de datos de proteínas del NCBI N.º P12694; OMIM: 248600), la subunidad beta de la 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (cetoácido deshidrogenasa E1 β de cadena ramificada; P21953), acil-CoA deshidrogenasa, específica de cadena media (P11310; OMIM: 201450), acil-CoA deshidrogenasa, específica de cadena muy larga (P49748; OMIM: 201 475), la subunidad alfa de la enzima trifuncional (3-hidroxiacil-Co-A deshidrogenasa de cadena larga o LCHAD) (P40939; OMIM: 609015) (HADHA), la subunidad beta de la enzima trifuncional (hidroxiacil-CoA deshidrogenasa/3-cetoacil-CoA Tiolasa/Enoil-CoA hidratasa (P55084) (HADHB)), la subunidad beta del componente E1 de la piruvato deshidrogenasa (P11177; OMIM: 208800) y la subunidad alfa del componente E1 de la piruvato deshidrogenasa (P08559; OMIM: 312170).

Cada enzima representa una realización separada de la proteína de fusión para su uso de la presente invención.

La expresión "**componente funcional**" se refiere al hecho de que la enzima, como se describió anteriormente, tiene una actividad enzimática cuando está presente en la mitocondria como una parte de un complejo enzimático (con otras enzimas, cofactores, o proteínas). En una realización, el componente funcional es la secuencia completa de la enzima. En otra realización, el componente funcional es un dominio (fragmento) suficiente para llevar a cabo la actividad enzimática de la enzima, ya sea solo o como parte de un complejo, según corresponda. En otra realización, el componente funcional es un derivado mutado en el que uno o más de los residuos de aminoácidos nativos ha sido eliminado, sustituido o modificado manteniéndose la funcionalidad enzimática del componente (solo o como parte de un complejo). Esta expresión también se refiere a precursores de las enzimas que en la célula o en la mitocondria se convierten en una enzima funcional o se ensamblan para formar un complejo enzimático funcional. En otra realización, la expresión se refiere a cualquier fragmento de la enzima que comprende el dominio catalítico de la misma, en el que la conformación del fragmento en condiciones fisiológicas es tal que se mantiene la actividad enzimática del dominio catalítico. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

La expresión "**complejo enzimático multicomponente**" se refiere a un grupo de al menos dos enzimas diferentes ensamblados entre sí en una relación específica que funciona de una manera coordinada para catalizar una serie de reacciones. La función de un complejo enzimático multicomponente es dependiente de su estructura; por lo tanto, las enzimas que componen el complejo deben encajar físicamente en la configuración apropiada con el fin de catalizar eficazmente la serie de reacciones. Ejemplos no limitantes de complejos enzimáticos multicomponente mitocondriales son el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDHC), el complejo de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (KGDHC) y el complejo de la ceto-ácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKDHC) (los enumerados hasta ahora contienen LAD), los complejos de la cadena respiratoria y los que intervienen en la β -oxidación de los ácidos grasos y el ciclo de la urea. Los complejos de la cadena respiratoria son el complejo I (NADH-ubiquinona oxidorreductasa), complejo II (succinato-ubiquinona oxidorreductasa), complejo III (ubiquinol-ferricitocromo c oxidorreductasa), complejo IV (citocromo c oxidorreductasa) y complejo V (F1F0 ATPasa).

Cada complejo enzimático multicomponente representa una realización separada de la proteína de fusión para su uso de la presente invención.

La expresión "**secuencia de direccionamiento mitocondrial (MTS)**" se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos capaz de provocar el transporte de un péptido, secuencia o compuesto unido al mismo al interior de la mitocondria. En otra realización, la MTS es una MTS humana. En otra realización, la MTS es de otra especie. Ejemplos no limitantes de tales secuencias son la MTS de la LAD humana (SEC. ID. N.º 39), la MTS del producto del gen C6ORF66 (SEC. ID. N.º 9) y las MTS de la malato deshidrogenasa mitocondrial humana (SEC. ID. N.º 40), OGG1 (SEC. ID. N.º 49) y GLUD2 (SEC. ID. N.º 50). Ejemplos adicionales no limitantes de secuencias MTS son las MTS naturales de cada proteína mitocondrial individual que está codificada por el ADN nuclear, traducida (producida) en el citoplasma y transportada a la mitocondria. Las diversas MTS puede ser intercambiables entre sí

por cada enzima mitocondrial. Cada posibilidad representa una realización separada de la proteína de fusión para su uso de la presente invención.

5 Cabe señalar que cada enzima mitocondrial que se produce en el citoplasma y se transporta a la mitocondria se produce como una enzima precursora que lleva su MTS natural, por lo que el uso de la enzima mitocondrial precursora ya tiene su MTS; sin embargo, esta secuencia de origen natural en la enzima precursora puede ser intercambiada con cualquier otra MTS conocida, principalmente para aumentar la eficacia de translocación.

10 La expresión **“trastorno mitocondrial”** en el contexto de la invención se refiere a un grupo de enfermedades sistémicas causadas por el daño heredado o adquirido en la mitocondria que causa una escasez de energía en esas áreas del cuerpo que consumen grandes cantidades de energía, tales como el hígado, los músculos, el cerebro y el corazón. El resultado suele ser con frecuencia insuficiencia hepática, debilidad muscular, fatiga y problemas cardíacos, oculares y en diversos sistemas. En ciertas realizaciones preferidas, el trastorno mitocondrial es la deficiencia de LAD.

15 En ciertas otras realizaciones preferidas, el trastorno metabólico mitocondrial es la deficiencia de complejo I (OMIM: 252010). La deficiencia de complejo I puede ser causada por una mutación en cualquiera de las subunidades del mismo. En otra realización, la deficiencia de complejo I está causada por una mutación en un gen seleccionado del grupo que consiste en NDUFV1 (OMIM: 161015), NDUFV2 (OMIM: 600532), NDUFS1 (OMIM: 157655), Ndufs2 (OMIM: 602985), NDUFS3 (OMIM: 603.846), NDUFS4 (OMIM: 602694), NDUFS6 (OMIM: 603.848), NDUFS7 (OMIM: 601825), NDUFS8 (OMIM: 602141) y NDUFA2 (OMIM: 602137).

20 En otra realización, el trastorno metabólico mitocondrial es la deficiencia de complejo IV (citocromo c oxidasa; OMIM: 220110). La deficiencia de complejo IV puede ser causada por una mutación en cualquiera de las subunidades del mismo. En otra realización, la deficiencia de complejo IV está causada por una mutación en un gen seleccionado del grupo que consiste en MTCO1 (OMIM: 516030), MTCO2 (OMIM: 516040), MTCO3 (OMIM: 516050), COX10 (OMIM: 602125), COX6B1 (OMIM: 124089), SCO1 (OMIM: 603644), FASTKD2 (OMIM: 612322) y SCO2 (OMIM: 604272).

25 En otras realizaciones, el trastorno mitocondrial está causado por o está asociado con una mutación sin sentido en la enzima cuya actividad está siendo reemplazada. Según lo previsto en el presente documento, las composiciones de la presente invención exhiben la capacidad sorprendente de complementar mutaciones sin sentido, a pesar de la presencia de la proteína mutada en los complejos enzimáticos multicomponente.

30 En otras realizaciones, el trastorno mitocondrial es una enfermedad neurodegenerativa. Según lo previsto en este documento, las proteínas de fusión para su uso de la presente invención exhiben la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). En esta realización, se seleccionará un PTD capaz de atravesar la BHE.

En otras realizaciones, el trastorno mitocondrial se selecciona del grupo que consiste de la encefalopatía e insuficiencia hepática que se acompaña de acidosis láctica severa, hiperamonemia y coagulopatía.

35 En otras realizaciones, el trastorno mitocondrial se selecciona del grupo que consiste en deficiencia de la ornitina transcarbamilasa (hiperamonemia) (OTCD), deficiencia de carnitina O-palmitoiltransferasa II (CPT2), deficiencia de fumarasa, deficiencia de citocromo c oxidasa asociada con el síndrome de Leigh, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (MSUD), deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD), deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (LCAD), deficiencia de proteína trifuncional, oftalmoplejía externa progresiva con deleciones de ADN mitocondrial (POLG), DGUOK, TK2, deficiencia de piruvato descarboxilasa y el síndrome de Leigh (SL). En otra realización, el trastorno metabólico mitocondrial se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedad de Alpers; síndrome de Barth; defectos de la β -oxidación; deficiencia de la acil-carnitina; deficiencia de carnitina; deficiencia de coenzima Q10; deficiencia del complejo II (OMIM: 252011), deficiencia del complejo III (OMIM: 124000), deficiencia del complejo V (OMIM: 604.273), LHON- Neuropatía óptica hereditaria de Leber; MM-Miopatía mitocondrial; LMM- miopatía mitocondrial infantil letal; MMC-Miopatía y miocardiopatía materna; NARP- Debilidad muscular neurogénica, ataxia y retinitis pigmentosa; enfermedad de Leigh; FICP-Miocardiopatía infantil mortal plus, una miocardiopatía asociada a MELAS; MELAS-Encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de pseudoictus; LDYT- neuropatía óptica y distonía hereditaria de Leber; MERRF-Epilepsia mioclónica con fibras musculares rojas rasgadas; MHCM-Miocardiopatía hipertrófica de herencia materna; CPEO-Oftalmoplejía externa progresiva crónica; KSS-síndrome de Kearns Sayre; DM-Diabetes mellitus; DMD- Diabetes mellitus + sordera; CIPO-pseudoobstrucción crónica intestinal con miopatía y oftalmoplejía; DEAF-Sordera de herencia materna; PEM-Encefalopatía progresiva; SNHL-Pérdida de la audición neurosensorial; Encefalomiopatía; Citopatía mitocondrial; DEMCHO-demencia y corea; AMDF-Ataxia, mioclonos; ESOC-Epilepsia, atrofia óptica; FBSN-Necrosis estriatal bilateral familiar; FSGS-Glomeruloesclerosis focal y segmentaria; LMM-Miopatía mitocondrial infantil mortal; MDM-Miopatía y diabetes mellitus; MEPR-Epilepsia mioclónica y retraso psicomotor; MERME MERRF/MELAS-enfermedad solapante; MHCM-Miocardiopatía hipertrófica de herencia materna; MICM-Miocardiopatía de herencia materna; MILS-Síndrome de Leigh de herencia materna; Encefalomiocardiopatía mitocondrial; Trastorno multisistémico mitocondrial (miopatía, encefalopatía, ceguera, pérdida de audición, neuropatía periférica); NAION-Neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica; PEM-Encefalopatía progresiva; PME-Epilepsia mioclónica progresiva; RTT-Síndrome de Rett; SIDS-Síndrome de la muerte súbita del lactante y MIDD-Diabetes y sordera de herencia materna.

ES 2 560 097 T3

Los trastornos mitocondriales son trastornos hereditarios o adquiridos, aunque rara vez pueden ser el resultado de una mutación espontánea en el desarrollo temprano del embrión. Los dos patrones de herencia más comunes de citopatías mitocondriales son la mendeliana y la materna. Algunos ejemplos representativos de enfermedades mitocondriales se representan en la siguiente tabla.

Enfermedad	Proteína afectada	OMIM
Deficiencia de ornitina transcarbamilasa (hiperamoniemia) (OTCD)	Ornitina transcarbamilasa (P00480)	311250
Deficiencia de carnitina O-palmitoiltransferasa II (CPT2)	Carnitina O-palmitoiltransferasa II (P23786)	255110
Deficiencia de fumarasa	Fumarato hidratasa (P07954)	606812
Deficiencia de citocromo c oxidasa asociada con síndrome de Leigh	Proteína del locus surfeit 1 (SURF1) (Q15526)	220110
Enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (MSUD)	1. Subunidad alfa de la 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (ceto-ácido deshidrogenasa E1 α de cadena ramificada) (P12694) 2. Subunidad beta de la 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (ceto-ácido deshidrogenasa E1 β de cadena ramificada) (P21953)	248600
Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD)	Acil-CoA deshidrogenasa, específica de cadena media (P1310)	201450
Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (LCAD)	Acil-CoA deshidrogenasa, específica de cadena muy larga (P49748)	201475
Deficiencia de proteína trifuncional	1. Subunidad alfa de la enzima trifuncional (3- hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCHAD) (P40939) (HADHA). 2. Subunidad beta de la enzima trifuncional (hidroxiacil-CoA deshidrogenasa/3-cetoacil-CoA tiolasa/enoil-CoA hidratasa (P55084)(HADHB)	609015
Oftalmoplejía externa progresiva con deleciones de ADN mitocondrial (POLG)	Subunidad gamma de la ADN polimerasa 1 (P54098)	157640
DGUOK	Desoxiguanosina quinasa	601465
TK2	Timidina quinasa-2	188250
Deficiencia de piruvato descarboxilasa	Subunidad beta del componente E1 de la piruvato deshidrogenasa E1 (P11177) Subunidad alfa del componente E1 de la piruvato deshidrogenasa (P08559)	312170
Síndrome de Leigh (SL)	El síndrome de Leigh puede ser una característica de una deficiencia de cualquiera de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial: I (OMIM: 252010), II (OMIM: 252011), III (OMIM: 124000), IV (citocromo c oxidasa; OMIM: 220110) o V (OMIM: 604273).	

Cada enfermedad mitocondrial representa una realización separada de la proteína de fusión para su uso de la presente invención. El término “**tratamiento**” en el contexto de la invención no se refiere a completar la curación de las enfermedades, ya que no cambia el gen mutado que causa la enfermedad. Este término se refiere a aliviar al menos uno de los síntomas no deseados asociados con la enfermedad, la mejora de la calidad de vida del sujeto, la disminución de la mortalidad causada por la enfermedad, o (si el tratamiento se administra lo suficientemente temprano), la prevención de la manifestación plena del trastorno mitocondrial antes de que ocurra, sobre todo en los órganos y tejidos que tienen una alta demanda de energía. El tratamiento puede ser un tratamiento prolongado continuo para una enfermedad crónica o una única o varias administraciones en el tiempo para el tratamiento de una enfermedad aguda como encefalopatía e insuficiencia hepática y que se acompaña de acidosis láctica severa, hiperamonemia y coagulopatía.

Los inventores de la presente invención utilizan la enfermedad “deficiencia de LAD” como modelo; sin embargo, el alcance de esta invención no se limita a esta enfermedad.

De acuerdo con un ejemplo específico de la invención, la enzima precursora LAD humana se fusionó a un resto para la administración (TAT), que condujo a esta enzima hasta el interior de las células y sus mitocondrias, sustituyendo de este modo a la enzima endógena mutada.

Para probar este enfoque, se construyó la proteína de fusión TAT-LAD y fue altamente purificada. Se observó que TAT-LAD es capaz de entrar en las células de los pacientes y sus mitocondrias, a la vez que aumenta la actividad de LAD. Además, se demostró que TAT-LAD es capaz de sustituir a la enzima LAD mutada del complejo enzimático mitocondrial piruvato deshidrogenasa (PDHC), restaurando así su actividad a niveles casi normales.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Representación esquemática de las proteínas de fusión TAT-LAD y LAD, su expresión y purificación.

A. Representación esquemática de la proteína de fusión TAT-LAD y las proteínas control-TAT-Δ-LAD (carece de la fracción MTS) y LAD (carece de la fracción TAT). **B.** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y transferencia Western utilizando el análisis de anticuerpos anti-LAD de las proteínas de fusión TAT-LAD, TAT-Δ-LAD y LAD purificadas. Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad. **C.** Actividad enzimática de las proteínas de fusión TAT-LAD, TAT-Δ-LAD y LAD purificadas. Los valores de actividad de la LAD (nmol/min/mg) presentados son valores medios ± DE de tres ensayos enzimáticos independientes, cada uno realizado por triplicado. LAD: deshidrogenasa lipoamida; MTS: secuencia de direccionamiento mitocondrial; TAT: transactivador del péptido transcripción.

Figura 2. Administración de TAT-LAD en células de pacientes G229C/Y35X y E375K. **A.** Análisis de transferencia Western de extractos de proteínas de células enteras procedentes de células G229C/Y35X tratadas utilizando anticuerpos contra LAD (1:1.000). La proteína de fusión TAT-LAD (flecha) y la LAD mutada endógena corresponden a un PM de 58kDa y 50 kDa, respectivamente, como se esperaba. **B.** Análisis de transferencia Western de extractos de proteínas de células enteras procedentes de células E375K tratadas, utilizando anticuerpos contra LAD (1:1.000) y α-tubulina (1:10.000). La anti-tubulina sirvió como control interno para la carga de proteínas. **C.** Análisis de microscopía de fluorescencia de las células G229C/Y35X tratadas con TAT-LAD marcadas con FITC (paneles 1-3) y LAD (panel 4) (0,1 μg/μl, concentración final) durante 30 min (panel 1), 2 horas (panel 2) y 4 horas (panel 3). **D-E.** Actividad LAD en células G229C/Y35X tratadas (**D**) y células E375K (**E**). Las células fueron tratadas con proteína TAT-LAD, TAT-PAH o LAD (0,075-0,1 μg/μl, concentración final) durante diferentes períodos de tiempo. La actividad de LAD se analizó en los extractos de proteínas de células enteras mediante un ensayo de actividad enzimática. Los ensayos de actividad se realizaron al menos tres veces. Los valores se presentan como la media ± e.e.m. (panel izquierdo) o muestran resultados típicos (panel derecho). Los valores de actividad se presentan como nmol/min/mg de proteína.

Figura 3. Destino de TAT-LAD y TAT-Δ-LAD dentro de las mitocondrias aisladas. (**A**) TAT-LAD y TAT-Δ-LAD marcadas radiactivamente se expresaron *in vitro* y se analizaron usando autorradiografía SDS-PAGE, coincidiendo con sus tamaños moleculares esperados, 58 y 54 kd, respectivamente. (**B**) Las mitocondrias aisladas de células se incubaron durante 30 min con las proteínas marcadas radiactivamente. Las mitocondrias se lavaron a continuación, se trataron con proteinasa K y se analizaron mediante autorradiografía SDS-PAGE. El asterisco marca la banda de 50 kd de la proteína de fusión TAT-LAD procesada.

Figura 4. Administración de TAT-LAD en las mitocondrias de células de pacientes G229C/Y35X (AD) y D479V (E-H). Las células de los pacientes fueron tratadas con la proteína de fusión (0,1 μg/μl, concentración final) durante 4-6 horas. Se obtuvieron fracciones subcelulares (citoplásmicas y mitocondriales) por centrifugación diferencial. Se analizaron las actividades enzimáticas de LAD (**A, E**) y CS (**B, F**) en las fracciones citoplásmicas y mitocondriales de las células tratadas y se calculó la relación LAD/CS (**C, G**) en su fracción mitocondrial. La relación LAD/CS fue casi dos veces mayor para TAT-LAD que para TAT-Δ-LAD. Los valores de actividad se presentan como nmol/min/mg de proteína. **D** y **H.** Análisis de transferencia Western de las fracciones subcelulares que muestra la distribución intracelular de TAT-LAD y su pureza, utilizando anticuerpos contra LAD (1:1.000) y los marcadores específicos VDAC (porina) (1:5000) para la mitocondria y la α-tubulina (1:10000) para el citoplasma. El E1α también se utilizó para confirmar la pureza de la fracción mitocondrial.

Figura 5. Co-localización de PDHC y actividad enzimática en las células de pacientes tratadas con TAT-LAD. **(A)** Las células D479V se trataron con TAT-LAD marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o LAD (fluorescencia verde, columna central), se lavaron, fijaron, permeabilizaron y se incubaron con anticuerpo anti-E1 α . Las células se lavaron a continuación y se incubaron con anticuerpo anti-Cy5 de ratón (fluorescencia roja, columna izquierda). Se analizaron las células en cuanto a la co-localización mediante microscopía confocal (amarillo en la superposición, columna derecha). Aumentos originales: 60 (LAD) y 100 (TATLAD). **(B-C)** Las células fueron incubadas con TAT-LAD (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, concentración final) durante 3, 6, o 24 horas. Los ensayos de actividad de PDHC se realizaron como se describe en Materiales y Procedimientos. **(B)** Actividad de PDHC en células de pacientes E375K tratadas. Los valores de actividad se presentan como nmol/min/mg de proteína. **(C)** Actividad de PDHC en células de pacientes E375K y D479V tratadas. Los valores de actividad se presentan como el porcentaje de la actividad normal de PDHC medida en fibroblastos sanos en los mismos experimentos. Los ensayos de actividad se repitieron tres veces. Los valores presentados en **B** y **C** son valores medios \pm DE. PDHC, complejo piruvato deshidrogenasa. La co-localización también se observó en células de pacientes G229C/Y35X tratadas.

Figura 6. Actividad enzimática de LAD en el plasma de ratones E3 inyectados con TAT-LAD. El comportamiento y estabilidad de la TAT-LAD inyectada fueron seguidos en el plasma de los ratones inyectados mediante la medición de la actividad enzimática de la LAD. Se extrajeron muestras de sangre de los ratones E3 inyectados en diferentes puntos temporales y se preparó el plasma.

Figura 7. A. Actividad de TAT-LAD en diversos órganos de los ratones E3 tratados con TAT-LAD: dependencia del tiempo. La actividad de LAD se presenta como aumento porcentual de la actividad basal medida en los ratones E3 no tratados (inyectados con PBS). **B-D.** Efecto de TAT-LAD frente a proteína de control LAD en el hígado **(B)**, cerebro **(C)** y corazón **(D)**.

Figura 8. A. Actividad de PDHC en los órganos de ratones E3 tratados con TAT-LAD. Los resultados se presentan como el aumento porcentual de la actividad basal de PDHC en el mismo órgano que los ratones E3 no tratados (inyectados con PBS). **B-D.** Efecto de TAT-LAD frente a proteína de control LAD en el hígado **(B)**, cerebro **(C)** y corazón **(D)**.

Figura 9. Actividad de PDHC frente a actividad de LAD en los órganos de los ratones E3 tratados con TAT-LAD. **A.** hígado. **B.** cerebro. **C.** corazón.

Figura 10. La actividad del complejo I se restaura en células de pacientes con deficiencia del complejo I que son tratadas con TAT-ORF66. "PBS" se refiere a células no tratadas.

Descripción detallada de la invención

En una realización, la presente invención proporciona una proteína de fusión para su uso en un procedimiento de tratamiento como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones preferidas, la proteína de fusión se produce por técnicas recombinantes. Tal como se establece en el presente documento, la administración de proteínas de fusión con PTD que contienen un dominio catalítico de una enzima mitocondrial a un sujeto en necesidad del mismo es capaz de tratar y aliviar trastornos metabólicos mitocondriales.

La proteína de fusión comprende una secuencia de direccionamiento mitocondrial (MTS). La MTS es una MTS de otra enzima mitocondrial que es codificada por el ADN nuclear, traducida/producida en el citoplasma y transportada a la mitocondria. Los expertos en la técnica entenderán que las MTS de diversas enzimas mitocondriales sintetizadas a partir de genes nucleares son en gran parte, si no completamente, intercambiables, y por lo tanto pueden ser utilizadas de manera intercambiable en los procedimientos y composiciones de la presente invención.

La MTS está situado entre el PTD y el componente funcional según el caso. En ciertas realizaciones más preferidas, la porción de la proteína de fusión C-terminal a la MTS consiste en el componente funcional de una enzima. En otra realización, no están presentes residuos heterólogos en la enzima en la porción C-terminal a la MTS. En esta realización, la escisión de la MTS genera una enzima con la secuencia nativa, por lo tanto capaz de integrarse fácilmente en un complejo enzimático multicomponente conformacionalmente sensible.

El PTD es un péptido TAT. En el presente documento se citan ejemplos no limitantes representativos de secuencias de PTD adecuadas.

Cada tipo de proteína de fusión para su uso en el procedimiento de tratamiento representa una realización separada de la presente invención.

En el presente documento se describe una composición farmacéutica para tratar o aliviar un trastorno mitocondrial, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y como principio activo la proteína de fusión.

También se describe aquí el uso de una proteína de fusión de la presente invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mitocondrial.

También se describe aquí un procedimiento para tratar un trastorno mitocondrial, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de la presente invención, tratando de este modo un trastorno mitocondrial. Cuando entra en una mitocondria del sujeto, la proteína de fusión restaura la actividad enzimática que falta.

5 También se describe en el presente documento un procedimiento para la introducción de una actividad enzimática mitocondrial en una mitocondria de un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de la presente invención, introduciendo de este modo una actividad enzimática mitocondrial en una mitocondria de un sujeto en necesidad del mismo.

10 Conforme a lo dispuesto en el presente documento en los Ejemplos 1-4, TAT-LAD es capaz de entrar en las células y en sus mitocondrias rápida y eficientemente. Por otra parte, es capaz de elevar la actividad de la LAD dentro de las células deficientes en LAD, devolviendo a sus mitocondrias a los valores de la actividad normal y superior. Y lo que es más importante, es capaz de reemplazar la enzima mutada e incorporarse naturalmente en los complejos de α -cetoácido deshidrogenasa como el PDHC. Mostramos aquí que la actividad de PDHC de células deficientes en LAD tratadas con TAT-LAD cambió de $\sim 10\%$ al $70-75\%$ de la actividad normal después de tan solo 3 horas de incubación. Estos elevados valores de actividad enzimática disminuyeron después de 24 h de incubación pero permanecieron estables muy por encima de la actividad basal. Por lo tanto, en un contexto clínico, una sola aplicación puede ser suficiente para un paciente que presenta un episodio de descompensación potencialmente mortal.

20 Una ventaja del uso de las proteínas de fusión con TAT para el tratamiento de trastornos mitocondriales es su capacidad para ser administradas en prácticamente todas las células sin ninguna especificidad. Cuando se intenta reemplazar una enzima mitocondrial mutado no hay necesidad de direccionamiento específico, sino más bien la administración de la enzima en cada célula/tejido, alcanzando principalmente de tejidos que tienen gran demanda de energía como los músculos, el hígado y sistema nervioso central (SNC), que son habitualmente los más afectados en este tipo de trastornos.

25 Por otra parte, LAD-TAT exhibió un modo muy rápido de acción, aumentando la actividad de LAD de células enteras en células deficientes en LAD hasta valores normales después de tan solo 30 minutos de incubación y hasta valores aún más altos cuando el tratamiento se prolongaba (Figura 2D-E). La actividad de LAD normal en fibroblastos oscila entre $60-140$ nmol/min/mg y en portadores asintomáticos de la deficiencia de LAD entre $25-50$ nmol/min/mg (Berger, 1996).

30 El PDHC es una máquina enzimática multi-componente macromolecular. Su proceso de ensamblaje implica numerosas subunidades diferentes. El posicionamiento óptimo de los componentes individuales dentro de este complejo multi-subunidad afecta directamente a la eficiencia de la reacción enzimática en general y a la estabilidad de sus intermedios (Vettakkorumakankav, 1996; Berger, 1996; Del Gaizo 2003b). Dada la estructura del complejo, no cabría esperar que la restauración de la actividad de un complejo completo reducida debido a un único componente que no funciona mutado fuera tratable mediante la administración exógena del componente mutado. Curiosamente, como se demuestra en el presente documento, el reemplazo del componente E3 mediado por TAT era suficiente para aumentar la actividad enzimática del complejo entero del PDHC (Figura 5).

35 Conforme a lo dispuesto en el presente documento, las proteínas de fusión con PTD para su uso de la presente invención provocaron la actividad de PDHC de cuatro a cinco veces de forma sostenida, hasta el último punto temporal de las 24 horas (Figura 5B). Cuando se trata una enfermedad metabólica como la deficiencia de LAD, no hay necesidad de volver a aumentar la actividad enzimática hasta el 100% ; más bien, lo que se necesita es elevarla por encima del umbral energético requerido para un metabolismo normal. Aunque un ligero aumento de la actividad de LAD puede elevar la tasa de síntesis de ATP y puede afectar favorablemente a la afectación neurológica en la deficiencia de LAD. Por lo tanto los cambios demostrados en el presente documento en la actividad de LAD, es probable que la relación LAD/CS y la actividad de PDHC puedan afectar significativamente a la presentación clínica en los pacientes, al menos, hasta el nivel de los portadores de deficiencia de LAD asintomáticos.

40 Hoy en día, una gran impedimento de la TRE es la incapacidad de la enzima administrada para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Este obstáculo fundamental ha limitado fuertemente el desarrollo de la TRE para los trastornos metabólicos en los cuales está afectado el SNC (Brady, 2004). Las proteínas de fusión con TAT son capaces de atravesar la BHE, lo que las convierte en una opción favorable para el desarrollo de la TER para los trastornos metabólicos relacionados con el SNC.

45 Conforme a lo dispuesto en el presente documento en los Ejemplos 5-7, la deficiencia de LAD de los ratones E3 es tratable con proteínas PTD-LAD para su uso de la presente invención. Es de destacar que los experimentos con ratones E3 han establecido pruebas sustanciales de que las alternancias en las α -cetoácido deshidrogenasas (los complejos que contienen LAD) pueden desempeñar un papel en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas. La disminución de la actividad de los complejos α -cetoglutarato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa asociados a LAD en el cerebro, representa un elemento común en varias enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad, incluidas las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Gibson y col., 2000

y Sullivan y Brown, 2005). Estudios en ratones adultos deficientes en LAD han sugerido que una disminución parcial de LAD, que es suficiente para disminuir la actividad de sus complejos enzimáticos asociados (Johnson y col., 1997), da como resultado un elevado nivel de susceptibilidad a la neurotoxicidad química (Klivenyi y col., 2004). Por otra parte, las variaciones en el gen *DLD* (el análogo murino de LAD) se han relacionado con la enfermedad de Alzheimer (Brown y col., 2004 y Brown y col., 2007). Además, en este documento se ha mostrado que las proteínas de fusión PTD-LAD de la presente invención restauran la actividad de LAD y PDHC en el cerebro, lo que demuestra que pueden atravesar la barrera hematoencefálica e integrarse allí funcionalmente en el PDHC. Estos resultados muestran claramente que las proteínas de fusión PTD-LAD de la presente invención son capaces de tratar las enfermedades neurodegenerativas.

10 **SECCIÓN DETALLES EXPERIMENTALES**

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES (EJEMPLOS 1-4)

Cultivo celular

Se establecieron células de cultivos primarios de fibroblastos de pacientes portadores de los genotipos mutados G229C/Y35X, E375K/E357K y D479V/D479V a partir de biopsias de la piel del antebrazo. Las células se mantuvieron en DMEM (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel) complementado con 15 % de suero bovino fetal (Hyclone, Logan UT, EE.UU.), penicilina/estreptomina y L-glutamina (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel) en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ a 37 °C. Todos los cultivos celulares dieron negativo para la contaminación por micoplasma. Todos los experimentos con células de los pacientes fueron aprobados por el comité de ética del Hospital Universitario Hadassah.

20 **Construcción de plásmidos que expresan proteínas TAT-LAD y LAD**

Se generaron proteínas de fusión con TAT utilizando el plásmido pTAT, proporcionado por el Dr. S.F. Dowdy. El plásmido contiene un gen que codifica para una cola de His de 6-histidinas, seguido por el péptido TAT (AA 47-57). Para construir un plásmido pTAT con LAD fusionada con el péptido TAT etiquetado con His, el gen del precursor de LAD humana se amplificó por PCR a partir de una biblioteca de ADNc de placenta utilizando los oligonucleótidos expuestos en la SEC. ID. N.º 1 (directa) y SEC. ID. N.º 2 (inversa). El producto de PCR fue clonado corriente abajo de la secuencia TAT en un vector pTAT digerido con *BamHI/XhoI*.

El plásmido de expresión TAT-Δ-LAD se construyó mediante amplificación por PCR de la secuencia de LAD madura a partir del plásmido TAT-LAD utilizando los oligonucleótidos expuestos en las SEC. ID. N.º 5 (directa) y SEC. ID. N.º 6 (inversa). El producto de PCR fue clonado corriente abajo de la secuencia TAT en un plásmido pTAT cortado por *BamHI/XhoI*.

También se clonó una proteína LAD de control que carece del péptido TAT. El vector de expresión LAD se generó por subclonación del fragmento de LAD en un vector pTAT modificado que carece de la secuencia TAT; las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la proteína LAD de control se exponen en la (SEC. ID. N.º 45-46, respectivamente). Todos los clones fueron confirmados por análisis de secuenciación. A continuación se muestran ejemplos de las secuencias utilizadas:

La secuencia del ADN de TAT-LAD (incluye la cola His, péptido TAT y el gen del precursor de LAD humana) se expone en la SEC. ID. N.º 3. La secuencia de aminoácidos se expone en la SEC. ID. N.º 4.

La MTS de la LAD de origen natural tiene la secuencia expuesta en la SEC. ID. N.º 39. La secuencia utilizada en TAT-LAD es idéntica, excepto que carece de la Met N-terminal y se expone en la SEC. ID. N.º 41.

40 **Expresión y purificación de proteínas**

Células competentes BL21-CodonPlus (λDE3) de *E. coli* se transformaron a 37 °C con plásmidos que codifican las proteínas de fusión en medio SLB que contiene kanamicina (50 µg/ml), tetraciclina (12,5 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml). A una DO₆₀₀ de 0,8, la expresión de proteínas se indujo mediante la adición de IPTG (1 mM, concentración final). Después de una incubación de 24 h a 22 °C, las células se cosecharon por centrifugación (2000 x g durante 15 min a 4 °C) seguido por sonicación en tampón de unión (PBS pH 7,4, PMSF 1 mM e imidazol 10 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.)). Las suspensiones se clarificaron por centrifugación (35.000Xg durante 30 min a 4 °C) y los sobrenadantes que contienen las proteínas de fusión se purificaron en condiciones nativas utilizando columnas HiTrap™ Chelating HP (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) pre-equilibradas con tampón de unión. Las columnas se lavaron mediante la adición por etapas de concentraciones crecientes de imidazol. Finalmente, las proteínas diana se eluyeron con tampón de elución (PBS pH 7,4 e imidazol 500 mM). Todos los procedimientos de purificación se llevaron a cabo utilizando el sistema ÄKTA™ FPLC (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). La eliminación de imidazol se realizó por diálisis contra PBS (pH 7,4). Las proteínas se mantuvieron congeladas en alícuotas a -20 °C hasta su uso.

Análisis de transferencia Western

Las proteínas (5-20 µg de proteína/carril) se resolvieron en geles de SDS-PAGE 12 % y se transfirieron a una membrana de transferencia Immobilon-P™ (Millipore, Bradford, EE.UU.). Las transferencias Western se realizaron usando anticuerpos anti-LAD (Elpeleg 1997), anti-His (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), anti-α-tubulina (Serotec, Oxford, Reino Unido) y anti-VDAC (porina) (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) en diluciones 1:1000, 1:10.000, 1:10.000 o 1:5000, respectivamente.

Administración de proteínas de fusión en las células

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos o en matraces de 250 ml (NUNC Brand Products, Roskilde, Dinamarca). Cuando las células alcanzaron un 90 % de confluencia, el medio fue reemplazado con un medio fresco que contiene 0,05-0,1 mg/ml (concentración final) de proteínas de fusión con TAT para varios períodos de tiempo. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron, sedimentaron y se mantuvieron a -80 °C hasta su uso posterior. Los sedimentos se resuspendieron en PBS que contenía Triton X-100 0,5 % y PMSF 1 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.), se mantuvieron en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron a 15.000Xg durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron analizados por análisis de transferencia Western o en cuanto a su actividad enzimática.

Aislamiento de fracciones subcelulares

Las fracciones mitocondriales se aislaron de las células cultivadas utilizando una técnica de centrifugación diferencial (Bourgeron 1992). Las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y sedimentaron. Los sedimentos de las células se mantuvieron congelados a -80 °C hasta su uso. Los sedimentos se resuspendieron en tampón Tris-HCl enfriado con hielo (10 mM, pH 7,6, PMSF 1 mM) y se homogeneizaron con un homogeneizador Dounce (Teflon-vidrio). Los homogeneizados se combinaron con sacarosa (0,25 M, concentración final) y se centrifugaron durante 10 min a 600 x g a 4 °C. Los sobrenadantes se recogieron y se centrifugaron durante 10 min a 14.000 x g a 4 °C. Los sedimentos resultantes que contienen las mitocondrias se resuspendieron en PBS que contenía Triton X-100 0,5 % y PMSF 1 mM y se incubaron en hielo durante 15 min antes de ser analizados en cuanto a las actividades enzimáticas y mediante transferencias Western. La pureza de las fracciones subcelulares se confirmó mediante inmunotransferencia Western usando los siguientes anticuerpos marcadores específicos: α-tubulina para el citoplasma y VDAC (porina) para las mitocondrias.

Ensayos de actividad de la LAD y la citrato sintasa (CS)

Las actividades LAD y CS se determinaron para los extractos de proteínas de células enteras, fracciones subcelulares o proteínas de fusión con TAT purificadas.

La actividad de LAD se determinó como se describe en Berger, 2005. La reacción se realizó en tampón de fosfato de potasio (50 mmol/l, pH 6,5) que contiene EDTA (1 mmol/l) y NADH (1,5 mmol/l) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.). Después de la adición de lipoamida (2 mmol/l) (Sigma-Aldrich, St Louis, EE.UU.), se midió espectrofotométricamente a 340 nm la disminución de la absorción desde un estado de equilibrio (Uvikon XL, Bio-Tek Instruments, Milán, Italia).

La actividad de CS se determinó siguiendo espectrofotométricamente (412 nm) la aparición del grupo SH libre de la CoA-SH liberada tras la adición de 10 mM de oxalacetato a las fracciones subcelulares a las cuales se añadió acetyl-CoA 100 µM y DTNB 2 mM (ácido ditionitrobenzoico; Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Análisis de las células tratadas con TAT-LAD por fluorescencia y microscopía confocal

Las proteínas TAT-LAD y LAD fueron marcadas fluorescentemente con fluoresceína (FITC) utilizando un kit de marcaje de proteínas (EZ-Label, PIERCE Biotechnology, Rockford IL, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El colorante fluorescente no unido se eliminó por diálisis contra PBS. Las células cultivadas en cubreobjetos a un 50-70 % de confluencia se trataron con TAT-LAD o LAD marcado con FITC (0,1 mg/ml, concentración final) durante diversos períodos de tiempo. Cuando se indica, las células se incubaron adicionalmente con el colorante fluorescente selectivo mitocondrial MitoTracker-Red-CMXRos™ (Molecular Probes, Eugene, EE.UU., 200 nM). Las células se lavaron a continuación con PBS, se fijaron en formaldehído al 3,7 % en PBS durante 10 min a temperatura ambiente y se lavaron de nuevo. En los experimentos de fluorescencia, las células se analizaron directamente sin fijación. Las células se analizaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon 90i, Nikon Corporation, Tokio, Japón) o con un microscopio de barrido láser confocal (NIKON C1, Nikon Corporation, Tokio, Japón).

Ensayo de actividad del PDHC

La actividad del PDHC se determinó utilizando piruvato radiactivo como sigue: se suspendieron sedimentos celulares congelados y se sonicó en un tampón de 0,25 ml de potasio-fosfato (10 mM, pH 7,4). La reacción se realizó en 0,4 ml de tampón de reacción que contiene proteínas 200-300 µg de proteínas de extractos de células enteras y se terminó mediante la adición de ácido perclórico 1 M. El ¹⁴CO₂ se recogió en Hyamine Hydroxide™

(Packard, EE.UU.) y se contó en un contador de centelleo líquido (UltimaGold™, Packard, EE.UU.) (Kontron Instruments, Zurich, Suiza). Se llevaron a cabo simultáneamente controles sin coenzimas para tener en cuenta la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ de fondo.

Administración y procesamiento de las proteínas de fusión

5 Se utilizaron mitocondrias aisladas de fibroblastos sanos y proteína TAT-LAD marcada radiactivamente y proteína TAT-Δ-LAD de control. La traducción *in vitro* de las proteínas se realizó utilizando el TnT Quick Coupled Transcription/Translation System™ (Promega, Madison, WI) en presencia de [^{35}S]-metionina (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Las mitocondrias aisladas se incubaron con las proteínas marcadas radiactivamente (1 mg/ml de mitocondrias, relación de volumen a volumen 1:10) durante 30 minutos a 30 °C, a continuación, se sedimentaron, se lavaron con tampón A, y se trataron con proteinasa K 2,5 μg/ml (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) durante 10 minutos en hielo. Se añadió fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1 mmol/l, concentración final) para detener la reacción. Las mitocondrias se volvieron a sedimentar, se lavaron y se analizaron utilizando geles de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico 12 % que se fijaron, se secaron y se visualizaron usando un PhosphorImager™ (BAS-2500; FujiFilm, Valhalla, Nueva York).

15 Ejemplo 1: Construcción, expresión, purificación y actividad *in vitro* de las proteínas TAT-LAD y LAD

La sobreexpresión y purificación de la proteína de fusión TAT-LAD se llevó a cabo mediante la inserción de la secuencia de LAD humana precursora en el vector pTAT. También se construyeron vectores de expresión que codifican para TAT-Δ-LAD, que carece de la secuencia MTS, y una proteína LAD de control que carece del péptido TAT (Figura 1A). Estas proteínas fueron todas expresadas y altamente purificadas en las mismas condiciones. El análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico y transferencia Western confirmó la identidad de estas proteínas altamente purificadas (Figura 1B). Se encontró que estas proteínas de fusión a base de LAD purificadas eran muy activas en un ensayo de actividad enzimática de LAD *in vitro* (Figura 1C).

Ejemplo 2: Administración de TAT-LAD en células deficientes en LAD

25 El siguiente experimento examinó la capacidad de los dominios de transducción de proteínas (PTD) tales como TAT para administrar la enzima LAD humana en células cultivadas de pacientes con deficiencia de LAD. La TAT-LAD purificada se incubó durante diferentes períodos de tiempo con células de pacientes heterocigotos para las mutaciones de LAD G229C/Y35X y E375K. Se prepararon extractos de proteínas de células enteras y se analizaron mediante transferencia Western utilizando anticuerpos anti-LAD. La proteína de fusión TAT-LAD (58kDa) entró rápidamente en las células G229C/Y35X y fue detectable después de 30 minutos de incubación (Figura 2A). En las células homocigóticas para la mutación E375K (Figura 2B), su administración fue algo más lenta; se detectó en el interior de las células después de una incubación de 2 horas. La LAD mutada endógena (50 kDa) se detectó sólo en células G229C/Y35X y no en las células E375K (Figura 2A). En ambas líneas celulares, alcanzó el estado de equilibrio se alcanzó después de 2-3 horas; por lo tanto, la cantidad de la proteína de fusión se mantuvo similar a lo durante los puntos temporales de 6 horas (Figura 2A) y 24 horas (Figura 2B) puntos de tiempo.

35 La administración de TAT-LAD en las células también se siguió utilizando un análisis de fluorescencia directa. TAT-LAD se marcó fluorescentemente con fluoresceína (FITC), se incubó con células G229C/Y35X durante diferentes períodos de tiempo, y se analizó mediante microscopía de fluorescencia. La proteína LAD marcada con FITC que carece de la fracción PTD se utilizó como una proteína de control. TAT-LAD se administró de manera eficiente en las células (Figura 2C, paneles 1-3), mientras que las señales de fluorescencia no se detectaron en las células tratadas con la proteína LAD control (Figura 2C, panel 4). Estos resultados se correlacionaban con el análisis de transferencia Western (Figura 2A-B). TAT-LAD se detectó rápidamente dentro de las células (después de sólo 30 minutos de incubación; Figura 2C, panel 1) y no hubo diferencias en la intensidad de la señal de fluorescencia después de períodos de incubación más largos (Figura 2C, paneles 2-3).

45 Para probar la capacidad que tiene PTD para administrar una enzima LAD humana activa en células deficientes de LAD, se incubó la TAT-LAD purificada con células G229C/Y35X y E375K durante diferentes períodos de tiempo. Estos experimentos utilizaron la proteína LAD control y la proteína TAT-PAH, que es una enzima de fusión con TAT control que carece de actividad de la LAD. La actividad de LAD se analizó en los extractos de proteínas de las células tratadas. La actividad de LAD en el interior de las células aumentó drásticamente en concordancia con el tiempo de incubación, alcanzando el estado de equilibrio después de 2-3 Hr' (Figura 2D-E). Estos resultados se parecían a los observados con transferencia Western. Este aumento de la actividad de LAD dentro de las células de los pacientes era dependiente de la dosis y no se observó después de la adición de proteínas LAD control.

55 En células G229C/Y35X, la actividad de LAD aumentó en 2,5 veces (desde 31 nmol/min/mg hasta 78 nmol/min/mg) después de sólo 30 minutos de incubación y alcanzó el equilibrio de 230-250 nmol/min/mg, un aumento de 8 veces, después de 2-3 Hr' (Figura 2D). Las células G229C/Y35X incubadas con proteínas de control TAT-PAH o LAD no mostraron cambios en la actividad basal de LAD, > 20 nmol/min/mg, que es inferior a los valores normales (Saada 2000). En las células E375K (Figura 2E), se observaron las mismas tendencias. La actividad de LAD aumentó -9 veces (aumento desde 5 nmol/min/mg hasta 423 nmol/min/mg) después de 2 Hr' de incubación y alcanzó el equilibrio de 630-690 nmol/min/mg después 4 Hr' de incubación, que duró hasta el último punto temporal de la

incubación de 24 Hr'. Las células E375K que se incubaron con la proteína de control LAD no mostraron ningún cambio en su actividad de la LAD basal.

Aunque tratadas con concentraciones de proteínas idénticas, las células E375K y G229C/Y35X respondieron de manera diferente, ya que los valores máximos de actividad eran mucho más altos en las células E375K que en las células G229C/Y35X, lo que indica posibles diferencias en la eficiencia del tratamiento en los pacientes portadores de diferentes genotipos.

Ejemplo 3: Administración de TAT-LAD en las mitocondrias

La siguiente etapa consistió en examinar la capacidad de TAT-LAD para ser transportada a través de la membrana mitocondrial y procesada de forma natural en las mitocondrias. La TAT-LAD marcada con [³⁵S]-metionina traducida *in vitro* se incubó con mitocondrias aisladas a partir de fibroblastos sanos. Las mitocondrias fueron tratadas con proteinasa K para digerir las proteínas adsorbidas de manera no específica a la membrana externa, garantizando así que el extracto mitocondrial contenía sólo las proteínas dentro de las mitocondrias. Como control, se usó proteína TAT-Δ-LAD marcada con ³⁵S-metionina que carece de la MTS (y por lo tanto carece del sitio de procesamiento natural dentro de ella). Como se observa en la Figura 3A, TAT-LAD y TAT-Δ-LAD fueron ambas expresadas en sus tamaños moleculares esperados de 58 y 54 kd, respectivamente. Después del tratamiento, tanto TAT-LAD como TAT-Δ-LAD se detectaron dentro de la mitocondria después de 30 minutos de incubación (**Figura 3B**), debido a la secuencia de PTD que llevan estas proteínas. Sin embargo, sólo la proteína de fusión TAT-LAD se procesó hasta su tamaño maduro, como se indica por la aparición de una banda adicional de 50 kd en la autorradiografía y SDS-PAGE (**Figura 3B**, asterisco). Como era de esperar, la proteína TAT-Δ-LAD (que carece de la MTS) no fue procesada, y apareció como una banda única en su tamaño completo sin procesar. Por lo tanto, TAT-LAD es capaz de ser administrada en las mitocondrias y ser procesadas en la misma.

A continuación se examinó si la TAT-LAD era capaz de llegar a las mitocondrias después de haber sido administrada en células intactas. La TAT-LAD purificada se incubó con células G229C/Y35X y D479V durante diferentes períodos de tiempo. Después de la incubación, se prepararon fracciones subcelulares mitocondriales y citoplasmáticas y se analizaron para determinar la presencia de actividad enzimática de TAT-LAD y LAD. La actividad de la CS se utilizó como un marcador mitocondrial. La transferencia Western blot de las fracciones subcelulares indicó la presencia de TAT-LAD (58kDa) tanto en fracciones citosólicas como mitocondriales de células G229C/Y35X y D479V tratadas tras 4 y 6Hr' de incubación (Figuras 4D y H, respectivamente). La pureza de las fracciones subcelulares se confirmó usando anticuerpos contra los marcadores subcelulares α-tubulina (50 kDa) del citoplasma y VDAC (porina) (31kDa) de la mitocondria.

Como apoyo de estos resultados, se produjo un aumento significativo en la actividad de LAD en ambas fracciones citosólicas y mitocondriales de las células tratadas con TAT-LAD.

En células G229C/Y35X, la actividad de LAD en las fracciones mitocondriales aumentó en 7 veces (desde 28 nmol/min/mg hasta 205 nmol/min/mg) después de 4Hr' de incubación (Figura 4A). La actividad enzimática se mantuvo casi igual después 6Hr' (193 nmol/min/mg), lo que demuestra que se había alcanzado el equilibrio. Este drástico aumento en la actividad de la LAD también se midió en las fracciones citosólicas, pasando de 10 nmoles/min/mg a 222 y 339 nmol/min/mg después de incubaciones 4Hr' y 6HR', respectivamente (Figura 4A). Se observaron resultados similares con células D479V. La actividad de LAD en las fracciones mitocondriales cambió desde 28 nmol/min/mg hasta 165 y 117 nmol/min/mg después de incubaciones de 4Hr' y 6Hr', respectivamente (Figura 4E). En fracciones citosólicas, la actividad cambió desde 20 nmol/min/mg hasta 125 y 193 nmol/min/mg después de incubaciones de 4Hr' y 6Hr', respectivamente.

Además, la actividad enzimática de CS se determinó en células G229C/Y35X (Figura 4B) y D479V (Figura 4F). La CS es una enzima de la matriz mitocondrial que participa en el ciclo de Krebs, que convierte la acetil-CoA en citrato. Se usó el ensayo de actividad enzimática de la CS como una referencia de control para verificar la pureza de las subfracciones mitocondriales y también para calcular la relación LAD/CS para estandarizar los valores de actividad enzimática de la LAD. En ambas líneas celulares, la actividad de la CS en las fracciones citosólicas apenas fue detectable, mientras que en las fracciones mitocondriales estaba dentro del rango de los niveles normales para los fibroblastos, verificando así la pureza de las fracciones subcelulares. Además, la actividad de la CS era constante y casi idéntica en todas las fracciones mitocondriales, lo que permite la normalización adecuada de los valores de actividad de LAD. Las mitocondrias de G225C/Y35X exhibió las relaciones LAD/CS de 0,102 antes de la incubación y de 0,740 y 0,678 después de incubaciones de 4 Hr' y 6 Hr' con TAT-LAD, respectivamente (Figura 4C). En las mitocondrias de las células D479V tratadas, la relación LAD/CS cambió desde 0,142 hasta 0,715 y 0,561 después de 4Hr' y 6Hr' de incubación, respectivamente (Figura 3G).

Los experimentos de co-localización se utilizaron para confirmar adicionalmente la administración de TAT-LAD en las mitocondrias de las células deficientes en LAD. Se incubó TAT-LAD marcada con FITC con células G229C/Y35X cultivadas en cubreobjetos durante diferentes períodos de tiempo. Las células fueron incubadas a continuación con el colorante fluorescente selectivo mitocondrial MitoTracker-Red-CMXRos™ y se analizaron por microscopía confocal. Como se muestra en la Figura 5A, la TAT-LAD (fluorescencia verde, columna central) estaba co-localizada con las mitocondrias (fluorescencia roja, columna izquierda) dentro de los primeros 30 minutos de incubación, como

se indica por la tinción amarilla en la superposición (columna derecha).

Ejemplo 4: Una proteína de fusión PTD-LAD aumenta la actividad del PDHC en células deficientes de LAD

La prueba final y más crucial para demostrar la capacidad de TAT-LAD para tratar con éxito la deficiencia de LAD por la TRE es la capacidad de la enzima para sustituir a la enzima endógena mutada, incluyendo la integración con éxito en sus complejos enzimáticos multicomponente naturales, tales como el complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC). La deficiencia de LAD afecta a tres complejos enzimáticos multicomponente mitocondriales, cuya actividad podría ser restaurada por la TAT-LAD. La capacidad de la TAT-LAD para reemplazar con éxito la enzima defectuosa endógena y aumentar la actividad del PDHC se ensayó en células D479V y E375K.

La actividad del PDHC aumentó en las dos células genótipicamente diferentes. En las células E375K, la actividad del PDHC aumentó significativamente en 12 veces después de 3 horas de incubación (desde 0,029 hasta 0,367 nmol/min/mg), permaneciendo aproximadamente a unos niveles cuatro a cinco veces superiores a los valores basales bajos durante al menos 24 horas (Figura 5B). Presentado como un porcentaje de la actividad del PDHC normal de los fibroblastos sanos, la actividad del PDHC en las células D479V aumentó desde el 9 % hasta el 69 % de la actividad normal después de 3 horas de incubación, manteniéndose en 50 % del nivel normal durante al menos 24 horas. En las células E375K, la actividad del PDHC aumentó desde el 5 hasta el 75 % de la actividad normal después de 3 horas de incubación, disminuyendo hasta aproximadamente el 30 % después de 24 horas de incubación (Figura 5C). Es de destacar que estos valores de actividad del PDHC están en estrecha correlación con los valores de actividad enzimática LAD medidos en las mitocondrias de las células tratadas, alcanzando niveles máximos después de una incubación de 3 Hr' con TAT-LAD.

Las proteínas de fusión PTD-LAD son, por lo tanto, capaces de tratar la deficiencia de LAD aumentando la actividad del PDHC en las células deficientes en LAD.

Ejemplo 5: Actividad enzimática de la LAD en plasma de ratones E3 inyectados con TAT-LAD

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES (EJEMPLOS 5-6)

El modelo de ratón de la deficiencia de LAD se describe en Klivenyi, P. y col. (Mice deficient in dihydrolipoamide dehydrogenase show increased vulnerability to MPTP, malonate and 3-nitropropionic acid neurotoxicity. J Neurochem 88: 1352-1360, 2004) y Johnson, MT y col. (Targeted disruption of the murine dihydrolipoamide dehydrogenase gene (Dld) results in perigastrulation lethality. Proc Natl Acad Sci USA 94: 14512-14517, 1997). Estos ratones son heterocigotos para una mutación de pérdida de función recesiva que afecta a la expresión del gen de la LAD (*Dld*, en ratones) a nivel del ARNm (inestabilidad) (ratones *Dld*^{+/-} o ratones E3). Los ratones homocigotos mueren en el útero en una etapa muy temprana de la gastrulación. Estos ratones son fenotípicamente normales, aunque su actividad de la LAD se reduce en ~ 50 %, lo que afecta a todos los complejos enzimáticos dependientes de LAD. Del mismo modo, los seres humanos heterocigotos para deficiencia de LAD exhiben ~ 50 % la actividad de la LAD, pero por lo general no tienen síntomas clínicos. Estos ratones se utilizan actualmente en experimentos en el campo de los trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer, el Parkinson y la enfermedad de Huntington.

Una dosis única (0,2 mg por ratón) de TAT-LAD altamente purificada se inyectó en la vena de la cola de los ratones E3 y se extrajeron y analizaron varios tejidos en cuanto a las actividades de LAD y PDHC en diferentes puntos temporales. En cada punto temporal se usaron varios ratones.

RESULTADOS

Para probar la capacidad de TAT-LAD para tratar la deficiencia de LAD *in vivo*, se inyectó por vía intravenosa TAT-LAD purificada en ratones E3 y se midió su efecto sobre las actividades de la LAD y el PDHC en varios tejidos. Este experimento se concentró en nuestros 3 órganos principales que tienen las mayores demandas de energía y, por lo tanto, son los que a menudo se ven afectados en los trastornos mitocondriales, el hígado, el corazón (músculos) y el cerebro.

En primer lugar se caracterizaron el comportamiento y la estabilidad de la proteína de fusión TAT-LAD en el plasma de ratones inyectados mediante la medición de la actividad enzimática de LAD. Se extrajeron muestras de sangre de ratones inyectados E3 en diferentes puntos temporales y se prepararon los plasmas.

No hay presente actividad de la LAD en el plasma de ratones sanos normales, ni de ratones E3, de modo que se establece como referencia la actividad de LAD en el primer punto temporal. Después del primer punto temporal, se observó a lo largo del tiempo una disminución en la actividad de la LAD en el plasma de ratones E3 (Figura 6). Para determinar si existe un componente o factor en el plasma que reduce la actividad de LAD lo largo del tiempo, se incubó plasma de ratón con TAT-LAD *in vitro* en las mismas condiciones: a 37 °C y en los mismos períodos de tiempo. La actividad de la LAD se mantuvo estable en estas muestras de plasma. Por lo tanto, la disminución de la actividad enzimática de LAD en el plasma fue el resultado de la administración de TAT-LAD en los órganos y tejidos de los ratones. De hecho, estos resultados se correlacionan con la actividad de LAD medida dentro de los órganos (Figura 7 siguiente). La proteína de control LAD, que carece de la fracción de administración TAT, también disminuyó con el tiempo su actividad, lo que sugiere en este caso posibles mecanismos de eliminación.

Ejemplo 6: TAT-LAD aumenta la actividad de la LAD en los órganos de los ratones deficientes en LAD

Los órganos fueron cosechadas de los ratones descritos en el Ejemplo anterior y se midió la actividad de la LAD ahí. La figura 7A representa el aumento porcentual de la actividad basal medida en los ratones heterocigotos, concretamente ratones, E3, no tratados, inyectados solamente con PBS. Una sola inyección intravenosa de TAT-LAD (0,2 mg por ratón) aumentó significativamente la actividad enzimática de LAD en el hígado, el corazón y, lo más importante, en el cerebro después de tan solo 30 minutos. Las formas de las curvas fueron similares en el cerebro y el corazón y ligeramente diferentes en el hígado (Figura 7C-D y B, respectivamente).

En el estado estacionario se observaron aumentos incluso más fuertes. En el hígado, la actividad de LAD alcanza un estado estable en alrededor del 40 % de los ratones no tratados y se mantuvo en el mismo nivel durante un máximo de 6 horas, mientras que en el cerebro y el corazón, la actividad de LAD en estado estacionario fue mayor, alcanzando un máximo de 4 horas a los niveles de 80 % y 100 %, respectivamente. La proteína de control de LAD, que carece de la fracción de administración TAT, inyectada en la misma cantidad y en condiciones idénticas, no aumentó de manera significativa la actividad de la LAD en los órganos. Además, otra cosa importante, fue el hecho de que 24 horas después de la inyección, la actividad de LAD todavía era 10 % mayor que la actividad basal.

Por lo tanto, las proteínas de fusión PTD-LAD son capaces de restablecer plenamente la actividad de la LAD deficiente en un modelo de enfermedad deficiente en LAD y, por lo tanto, son capaces de tratar los episodios de descompensación aguda. La magnitud a largo plazo del aumento después de un único tratamiento, 10 %, también es suficiente para afectar el estado clínico de muchos casos.

Ejemplo 7: TAT-LAD aumenta la actividad del PDHC en los órganos de ratones deficientes en LAD**MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

Principio de medición de la actividad del PDHC en los tejidos de ratones. Se utilizó un kit de Mitosciences™ (N.º de Catálogo MSP18) para medir la actividad enzimática del PDHC. El PDHC fue inmunocapturado de lisados de tejidos y se midió su actividad enzimática. Esto aseguró que cualquier aumento en la actividad del PDHC medida fuera sólo el resultado de la TAT-LAD que tenía que integrarse en el complejo PDHC. El ensayo mide la reducción enzimática del NAD⁺ a NADH por un aumento en la absorbancia a 340 nm.

RESULTADOS

El siguiente experimento analizó directamente la capacidad de las proteínas de fusión PTD-LAD para sustituir a la enzima endógena mutada, tras la integración satisfactoria en sus complejos enzimáticos multicomponente naturales, en los órganos de los ratones inyectados con TAT-LAD descritos en el Ejemplo 5. La Figura 8A representa el aumento porcentual sobre la actividad basal del PDHC de los ratones E3 no tratados (tratamiento simulado mediante inyección con PBS) en cada órgano. Los cerebros y los corazones (Figura 8C-D, respectivamente) de los ratones E3 tratados respondieron energicamente al tratamiento con TAT-LAD; alcanzando un máximo de 4 horas, con un incremento del 145 % en la actividad enzimática PDHC; las muestras de hígado (Figura 8B) alcanzaron un máximo a las 2 horas con un aumento del 135 % en la actividad. También fue evidente un aumento sustancial y significativo en la actividad enzimática PDHC (40-65 %) en los tres órganos 24 horas después del tratamiento. El tratamiento con la proteína de control de LAD no afectó a la actividad basal del PDHC. Curiosamente, el aumento porcentual en la actividad del PDHC era mucho mayor que el de la actividad de la LAD en los tejidos, lo que pone de relieve la potencia de las proteínas de fusión utilizadas (Figura 9A-C).

Por lo tanto, una sola aplicación de una proteína de fusión PTD-LAD es capaz de aumentar significativamente la actividad del PDHC en un modelo de enfermedad de la deficiencia de LAD. Las proteínas de fusión PTD-LAD son, por lo tanto, capaces de tratar y aliviar patologías de deficiencia de LAD.

Ejemplo 8: TAT-ORF66 restaura la actividad del complejo I en las células de un paciente con deficiencia en NADH-ubiquinona oxidoreductasa (complejo I)**MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

Con el fin de construir un plásmido que expresa una fusión TAT-C6ORF66, el gen del C6ORF66 humano se amplificó por PCR a partir de una biblioteca de ADN complementario de linfocitos, utilizando los oligonucleótidos expuestos en las SEC ID N.º 47 (directa) y SEC ID N.º 48 (inversa). El producto de PCR fue clonado corriente abajo de la secuencia TAT en un fragmento pTAT digerido con *BamHI/XhoI*.

RESULTADOS

Una mutación de sentido erróneo en un residuo conservado del gen C6ORF66 ha sido identificada en una familia consanguínea que presentaba encefalomiopatía mitocondrial infantil atribuida a deficiencia aislada en la NADH-ubiquinona oxidoreductasa (complejo I). En el músculo de los pacientes, los niveles de la proteína C6ORF66 y del complejo I completamente ensamblado I estaban notablemente reducidos. La transfección de los fibroblastos de los pacientes con el ADNc de C6ORF66 de tipo silvestre restauró la actividad del complejo I (Saada A y col., C6ORF66

is an assembly factor of mitochondrial complex I. *Am J Hum Genet* 82(1):32-8, 2008).

La secuencia del ARNm de C6ORF66 se expone en la SEC. ID. N.º 7 (GenBank nº de acceso NM_014165).

La secuencia de aminoácidos del producto de C6ORF66 se expone en la SEC. ID. N.º 8 (GenBank nº de acceso NM_014165). Los primeros 34 residuos de la proteína, (SEC. ID. N.º 9), son predichos por el software TargetP para formar la secuencia de direccionamiento mitocondrial (Saada A y col., *ibid*).

Para analizar la capacidad de una proteína de fusión TAT-para tratar la deficiencia de Complejo I, se construyó una proteína de fusión TAT-C6ORF66 y fue altamente purificada. Se incubaron células de fibroblastos primarios aislados a partir de un paciente con la mutación de sentido erróneo en el gen C6ORF66 con TAT-ORF66 durante 48 horas, y las mitocondrias se aislaron y se analizaron para determinar la actividad del complejo I. La proteína de fusión con TAT fue capaz de restaurar el 80 % de la actividad del complejo I de tipo silvestre en la mitocondria (Figura 10).

Por lo tanto, la deficiencia de complejo I es tratable utilizando proteínas de fusión con TAT.

Los resultados presentados en el presente documento demuestran que se puede tratar con éxito mediante TRE una variedad de deficiencias en enzimas mitocondriales usando proteínas de fusión basadas en PTD. Las deficiencias en la LAD, una enzima que forma parte de varios complejos enzimáticos multicomponente y C6ORF66, un factor de ensamblaje del complejo I, fueron tratadas con éxito. Hay que señalar que las enzimas fueron capaces de trasladarse a la mitocondria y funcionar en el contexto sensible a la conformación de estos complejos enzimáticos con su actividad intactas, después de la eliminación de las partes heterólogas de la molécula.

Los resultados presentados en el presente documento demuestran que una variedad de trastornos metabólicos mitocondriales son tratables por TRE usando proteínas de fusión basadas en PTD, como se evidencia mediante el tratamiento de la deficiencia de la LAD y la deficiencia del complejo I.

Referencias

- Chinnery, P.F. & Schon, E.A. Mitochondria. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74, 1188-1199 (2003).
- Brautigam, C.A., Chuang, J.L., Tomchick, D.R., Machius, M. & Chuang, D.T. Crystal structure of human dihydrolipoamide dehydrogenase: NAD⁺/NADH binding and the structural basis of disease-causing mutations. *J. Mol. Biol.* 350, 543-552 (2005).
- Vettakkorumakankav, N.N. & Patel, M.S. Dihydrolipoamide dehydrogenase: structural and mechanistic aspects. *Indian J. Biochem. Biophys.* 33, 168-176 (1996).
- Berger, I., Elpeleg, O.N. & Saada, A. Lipoamide dehydrogenase activity in lymphocytes. *Clin. Chim. Acta.* 256, 197-201 (1996).
- Elpeleg, O.N. et al. Lipoamide dehydrogenase deficiency: a new cause for recurrent myoglobinuria. *Muscle Nerve* 20, 238-240 (1997).
- Shaag, A. et al. Molecular basis of lipoamide dehydrogenase deficiency in Ashkenazi Jews. *Am. J. Med Genet.* 82, 177-182 (1999).
- Saada, A., Aptowitz, I., Link, G. & Elpeleg, O.N. ATP synthesis in lipoamide dehydrogenase deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 382-386 (2000).
- Brady, RO. & Schiffmann, R. Enzyme-replacement therapy for metabolic storage disorders. *Lancet Neurol.* 3, 752-756 (2004).
- Futaki, S. et al. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* 276, 5836-5840 (2001).
- Kuppuswamy M et al, Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res* 17(9):3551-61, 1989).
- Del Gaizo, V., MacKenzie, J.A. & Payne, R.M. Targeting proteins to mitochondria using TAT. *Mol. Genet. Metab.* 80, 170-180 (2003a).
- Del Gaizo, V. & Payne, R.M. A novel TAT-mitochondrial signal sequence fusion protein is processed, stays in mitochondria, and crosses the placenta. *Mol. Ther.* 7, 720-730 (2003b).
- Bourgeron, T., Chretien, D., Rotig, A., Munnich, A. & Rustin, P. Isolation and characterization of mitochondria from human B lymphoblastoid cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 16-23 (1992)..

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Yissum Research Development Company of the Hebrew university of Jerusalem
Hadasit Medical Research services and Development Ltd.

<120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MITOCONDRIALES

<130> Yissum-001-PCT

<160> 50

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> construcción artificial

<400> 1
 cgggatccgc agagctggag tc 22

15 <210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> construcción artificial

25 <400> 2
 cccctcgagt caaaagttga ttg 23

30 <210> 3
 <211> 1629
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> construcción artificial

<400> 3

atgggagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat 60

atgaggaaga agcggagaca gcgacgaaga ggctcggatc cgcagagctg gagtcgtgtg 120

tactgctcct tggccaagag aggccatttc aatcgaatat ctcattggcct acagggactt 180

tctgcagtgc ctctgagaac ttacgcagat cagccgattg atgctgatgt aacagttata 240

ggttctggtc ctggaggata tgttgctgct attaaagctg cccagttagg cttcaagaca 300

gtctgcattg agaaaaatga aacacttggg ggaacatgct tgaatgttgg ttgtattcct 360

tctaaggctt tattgaacaa ctctcattat taccatattg cccatggaac agattttgca 420

tctagaggaa ttgaaatgtc cgaagttcgc ttgaatttag acaagatgat ggagcagaag 480

agtactgcag taaaagcttt aacaggtgga attgcccact tattcaaca gaataagggt 540

gttcatgtca atggatatgg aaagataact ggcaaaaatc aagtcactgc tacgaaagct 600
gatggcggca ctcaggttat tgatacaaag aacattctta tagccacggg ttcagaagtt 660
actccttttc ctggaatcac gatagatgaa gatacaatag tgtcatctac aggtgcttta 720
tctttaaaaa aagttccaga aaagatgggtt gttattgggtg caggagtaat aggtgtagaa 780
ttgggttcag tttggcaaag acttgggtgca gatgtgacag cagttgaatt tttagggtcat 840
gtaggtggag ttggaattga tatggagata tctaaaaact ttcaacgcat ccttcaaaaa 900
caggggttta aatttaaatt gaatacaaag gttactgggtg ctaccaagaa gtcagatgga 960
aaaattgatg tttctattga agctgcttct ggtggtaaag ctgaagttat cacttgtgat 1020
gtactcttgg tttgcattgg cgcacgacc tttactaaga atttgggact agaagagctg 1080
ggaattgaac tagatcctag aggtagaatt ccagtcaata ccagatttca aactaaaatt 1140
ccaaatatct atgccattgg tgatgtagtt gctgggtcaa tgctggctca caaagcagag 1200
gatgaaggca ttatctgtgt tgaaggaatg gctgggtgggtg ctgtgcacat tgactacaat 1260
tgtgtgccat cagtgattta cacacaccct gaagttgctt gggttggcaa atcagaagag 1320
cagttgaaag aagaggggtat tgagtacaaa gttgggaaat tcccatttgc tgctaacagc 1380
agagctaaga caaatgctga cacagatggc atgggtgaaga tccttgggca gaaatcgaca 1440
gacagagtac tgggagcaca tattcttggga ccaggtgctg gagaaatggt aatgaagct 1500
gctcttggctt tggaaatagg agcatcctgt gaagatatag ctagagtctg tcatgcacat 1560
ccgaccttat cagaagcttt tagagaagca aatcttggctg cgtcatttgg caaatcaatc 1620
aacttttga 1629

<210> 4
<211> 543
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> construcción artificial

10

<400> 4

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

Leu Arg Thr Tyr Ala Asp Gln Pro Ile Asp Ala Asp Val Thr Val Ile
 65 70 75 80
 Gly Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Val Ala Ala Ile Lys Ala Ala Gln Leu
 85 90 95
 Gly Phe Lys Thr Val Cys Ile Glu Lys Asn Glu Thr Leu Gly Gly Thr
 100 105 110
 Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu Leu Asn Asn Ser
 115 120 125
 His Tyr Tyr His Met Ala His Gly Thr Asp Phe Ala Ser Arg Gly Ile
 130 135 140
 Glu Met Ser Glu Val Arg Leu Asn Leu Asp Lys Met Met Glu Gln Lys
 145 150 155 160
 Ser Thr Ala Val Lys Ala Leu Thr Gly Gly Ile Ala His Leu Phe Lys
 165 170 175
 Gln Asn Lys Val Val His Val Asn Gly Tyr Gly Lys Ile Thr Gly Lys
 180 185 190
 Asn Gln Val Thr Ala Thr Lys Ala Asp Gly Gly Thr Gln Val Ile Asp
 195 200 205
 Thr Lys Asn Ile Leu Ile Ala Thr Gly Ser Glu Val Thr Pro Phe Pro
 210 215 220
 Gly Ile Thr Ile Asp Glu Asp Thr Ile Val Ser Ser Thr Gly Ala Leu
 225 230 235 240
 Ser Leu Lys Lys Val Pro Glu Lys Met Val Val Ile Gly Ala Gly Val
 245 250 255
 Ile Gly Val Glu Leu Gly Ser Val Trp Gln Arg Leu Gly Ala Asp Val
 260 265 270
 Thr Ala Val Glu Phe Leu Gly His Val Gly Gly Val Gly Ile Asp Met
 275 280 285
 Glu Ile Ser Lys Asn Phe Gln Arg Ile Leu Gln Lys Gln Gly Phe Lys
 290 295 300
 Phe Lys Leu Asn Thr Lys Val Thr Gly Ala Thr Lys Lys Ser Asp Gly
 305 310 315 320

Lys Ile Asp Val Ser Ile Glu Ala Ala Ser Gly Gly Lys Ala Glu Val
 325 330 335

Ile Thr Cys Asp Val Leu Leu Val Cys Ile Gly Arg Arg Pro Phe Thr
 340 345 350

Lys Asn Leu Gly Leu Glu Glu Leu Gly Ile Glu Leu Asp Pro Arg Gly
 355 360 365

Arg Ile Pro Val Asn Thr Arg Phe Gln Thr Lys Ile Pro Asn Ile Tyr
 370 375 380

Ala Ile Gly Asp Val Val Ala Gly Pro Met Leu Ala His Lys Ala Glu
 385 390 395 400

Asp Glu Gly Ile Ile Cys Val Glu Gly Met Ala Gly Gly Ala Val His
 405 410 415

Ile Asp Tyr Asn Cys Val Pro Ser Val Ile Tyr Thr His Pro Glu Val
 420 425 430

Ala Trp Val Gly Lys Ser Glu Glu Gln Leu Lys Glu Glu Gly Ile Glu
 435 440 445

Tyr Lys Val Gly Lys Phe Pro Phe Ala Ala Asn Ser Arg Ala Lys Thr
 450 455 460

Asn Ala Asp Thr Asp Gly Met Val Lys Ile Leu Gly Gln Lys Ser Thr
 465 470 475 480

Asp Arg Val Leu Gly Ala His Ile Leu Gly Pro Gly Ala Gly Glu Met
 485 490 495

Val Asn Glu Ala Ala Leu Ala Leu Glu Tyr Gly Ala Ser Cys Glu Asp
 500 505 510

Ile Ala Arg Val Cys His Ala His Pro Thr Leu Ser Glu Ala Phe Arg
 515 520 525

Glu Ala Asn Leu Ala Ala Ser Phe Gly Lys Ser Ile Asn Phe Glx
 530 535 540

5 <210> 5
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> construcción artificial

<400> 5
 cgggatccgg cagatcagcc gattgat 27

15 <210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción artificial

5 <400> 6
cccctcgagt caaaagttga ttg 23

10 <210> 7
<211> 1458
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

```

acttgtgctg atgctccggg tgtcccggag ttgtcctgcg ccggtgttcc cacgtgcggc      60
ctgaacctga gcgcataatg ttatgaggag atgggagcac tagtgattcg cggtatcagg      120
aatttcaacc tagagaaccg agcggaacgg gaaatcagca agatgaagcc ctctgtcgct      180
cccagacacc cctctacca cagcctcctg cgagagcaga ttagtctcta tccagaagtt      240
aaaggagaga ttgctcgtaa agatgaaaag ctgctgtcgt ttctaaaaga tgtgtatggt      300
gattccaaag atcctgtgtc ttccttgag gtaaaagctg ctgaaacatg tcaagagccg      360
aaggaattca gattgccgaa agaccatcat tttgatatga taaatattaa gagcattccc      420
aaaggcaaaa tttccattgt agaagcattg acacttctca ataatacataa gcttttccca      480
gaaacctgga ctgctgagaa aataatgcag gaataccagt tagaacagaa agatgtgaat      540
tctctcttta aatattttgt tacttttgaa gtcgaaatct tccctcctga agacaagaaa      600
gcaatacgat caaaatgaag aaaatcacag aaatttccta tgtgtactcc tcatccctcc      660
tgctgtatat tttctcattt tttgcgtaat aaattatggt aattaccaa tatttaatgc      720
tctcattgtg agggcatact cttaatattt attgagctcc ctgacttttc aagattgccca      780
tagaatatct tttgttttat ttttaatttg tttaggcata tttcataagt gcatgtcagc      840
atgactgagc acatctgtac ctttattatg gtgaaagagt taatttgta ttttaggcac      900
atataccaac ttttaaattg gtcataattac cccttgggaa atgtcctgaa tccctcaact      960
gagttttact ttccaagtta ggtgtttagt tcattcttct catgcgatag tgaagtaaa     1020
agctttcctg acccttaaga ctgacatttt ctcgttaggg aaagagactc gatagcaggg     1080
tagactaaca gtagttccca aataaaggca cacaggagaa aatgaatcaa tagaatctaa     1140
ttaaatttac tactccaggg aataagaagt attgaggatt tattttattt tgaattggtt     1200

ttaagtatgg aataattgtc tttacagtta taaaaagtaa ttagtggtgt ttacaaaatg     1260
ttgggaattt ctgctttgac agataggtaa gtcccatggg aatttctgct ttgacaaata     1320
gttaagtccc atggccttca gagaggcagg aagcagaaac tttcaaaaaa gtaacatttc     1380
tctggattta atgtggaat agagaaaaat ttaagaata attaaaaaac catggtagat     1440
gaaatttggg gattacat                                     1458
    
```

15
20 <210> 8
<211> 175
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Met Gly Ala Leu Val Ile Arg Gly Ile Arg Asn Phe Asn Leu Glu Asn
 1 5 10 15
 Arg Ala Glu Arg Glu Ile Ser Lys Met Lys Pro Ser Val Ala Pro Arg
 20 25 30
 His Pro Ser Thr Asn Ser Leu Leu Arg Glu Gln Ile Ser Leu Tyr Pro
 35 40 45
 Glu Val Lys Gly Glu Ile Ala Arg Lys Asp Glu Lys Leu Leu Ser Phe
 50 55 60
 Leu Lys Asp Val Tyr Val Asp Ser Lys Asp Pro Val Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 Val Lys Ala Ala Glu Thr Cys Gln Glu Pro Lys Glu Phe Arg Leu Pro
 85 90 95
 Lys Asp His His Phe Asp Met Ile Asn Ile Lys Ser Ile Pro Lys Gly
 100 105 110
 Lys Ile Ser Ile Val Glu Ala Leu Thr Leu Leu Asn Asn His Lys Leu
 115 120 125
 Phe Pro Glu Thr Trp Thr Ala Glu Lys Ile Met Gln Glu Tyr Gln Leu
 130 135 140
 Glu Gln Lys Asp Val Asn Ser Leu Leu Lys Tyr Phe Val Thr Phe Glu
 145 150 155 160
 Val Glu Ile Phe Pro Pro Glu Asp Lys Lys Ala Ile Arg Ser Lys
 165 170 175

5 <210> 9
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 9

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

15 <210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <400> 10

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
 1 5 10

5
 <210> 11
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> herpesvirus simple 7
 <400> 11

Asp Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr
 1 5 10 15

Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro
 20 25 30

10 Val Asp

15
 <210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Latimeria menadoensis*
 <400> 12

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

20
 <210> 13
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> construcción sintética
 30
 <400> 13

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
 20 25

35
 <210> 14
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> fuente desconocida
 40
 <400> 14

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ala

ES 2 560 097 T3

5 <210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> desconocido

<220>
<223> fuente desconocida
10 <400> 15

Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His
1 5 10 15

Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala
20 25 30

15 <210> 16
<211> 509
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 16

Met Gln Ser Trp Ser Arg Val Tyr Cys Ser Leu Ala Lys Arg Gly His
1 5 10 15

Phe Asn Arg Ile Ser His Gly Leu Gln Gly Leu Ser Ala Val Pro Leu
20 25 30

Arg Thr Tyr Ala Asp Gln Pro Ile Asp Ala Asp Val Thr Val Ile Gly

ES 2 560 097 T3

	35					40						45			
Ser	Gly 50	Pro	Gly	Gly	Tyr	Val 55	Ala	Ala	Ile	Lys	Ala 60	Ala	Gln	Leu	Gly
Phe	Lys	Thr	Val	Cys	Ile 70	Glu	Lys	Asn	Glu	Thr 75	Leu	Gly	Gly	Thr	Cys 80
Leu	Asn	Val	Gly	Cys 85	Ile	Pro	Ser	Lys	Ala 90	Leu	Leu	Asn	Asn	Ser	His 95
Tyr	Tyr	His	Met 100	Ala	His	Gly	Lys	Asp 105	Phe	Ala	Ser	Arg	Gly 110	Ile	Glu
Met	Ser	Glu 115	Val	Arg	Leu	Asn	Leu 120	Asp	Lys	Met	Met	Glu 125	Gln	Lys	Ser
Thr	Ala 130	Val	Lys	Ala	Leu	Thr 135	Gly	Gly	Ile	Ala	His 140	Leu	Phe	Lys	Gln
Asn 145	Lys	Val	Val	His	Val 150	Asn	Gly	Tyr	Gly	Lys 155	Ile	Thr	Gly	Lys	Asn 160
Gln	Val	Thr	Ala	Thr 165	Lys	Ala	Asp	Gly	Gly 170	Thr	Gln	Val	Ile	Asp 175	Thr
Lys	Asn	Ile	Leu 180	Ile	Ala	Thr	Gly	Ser 185	Glu	Val	Thr	Pro	Phe 190	Pro	Gly
Ile	Thr	Ile 195	Asp	Glu	Asp	Thr	Ile 200	Val	Ser	Ser	Thr	Gly 205	Ala	Leu	Ser
Leu	Lys 210	Lys	Val	Pro	Glu	Lys 215	Met	Val	Val	Ile	Gly 220	Ala	Gly	Val	Ile
Gly 225	Val	Glu	Leu	Gly	Ser 230	Val	Trp	Gln	Arg	Leu 235	Gly	Ala	Asp	Val	Thr 240
Ala	Val	Glu	Phe	Leu 245	Gly	His	Val	Gly	Gly 250	Val	Gly	Ile	Asp	Met 255	Glu
Ile	Ser	Lys	Asn 260	Phe	Gln	Arg	Ile	Leu 265	Gln	Lys	Gln	Gly	Phe 270	Lys	Phe
Lys	Leu	Asn 275	Thr	Lys	Val	Thr	Gly 280	Ala	Thr	Lys	Lys	Ser 285	Asp	Gly	Lys
Ile	Asp	Val	Ser	Ile	Glu	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Lys	Ala	Glu	Val	Ile

290		295		300											
Thr 305	Cys	Asp	Val	Leu	Leu 310	Val	Cys	Ile	Gly	Arg 315	Arg	Pro	Phe	Thr	Lys 320
Asn	Leu	Gly	Leu	Glu 325	Glu	Leu	Gly	Ile	Glu 330	Leu	Asp	Pro	Arg	Gly 335	Arg
Ile	Pro	Val	Asn 340	Thr	Arg	Phe	Gln	Thr 345	Lys	Ile	Pro	Asn	Ile 350	Tyr	Ala
Ile	Gly	Asp 355	Val	Val	Ala	Gly	Pro 360	Met	Leu	Ala	His	Lys 365	Ala	Glu	Asp
Glu	Gly 370	Ile	Ile	Cys	Val	Glu 375	Gly	Met	Ala	Gly	Gly 380	Ala	Val	His	Ile
Asp 385	Tyr	Asn	Cys	Val	Pro 390	Ser	Val	Ile	Tyr	Thr 395	His	Pro	Glu	Val	Ala 400
Trp	Val	Gly	Lys	Ser 405	Glu	Glu	Gln	Leu	Lys 410	Glu	Glu	Gly	Ile	Glu 415	Tyr
Lys	Val	Gly	Lys 420	Phe	Pro	Phe	Ala	Ala 425	Asn	Ser	Arg	Ala	Lys 430	Thr	Asn
Ala	Asp	Thr 435	Asp	Gly	Met	Val	Lys 440	Ile	Leu	Gly	Gln	Lys 445	Ser	Thr	Asp
Arg	Val 450	Leu	Gly	Ala	His	Ile 455	Leu	Gly	Pro	Gly	Ala 460	Gly	Glu	Met	Val
Asn 465	Glu	Ala	Ala	Leu	Ala 470	Leu	Glu	Tyr	Gly	Ala 475	Ser	Cys	Glu	Asp	Ile 480
Ala	Arg	Val	Cys	His 485	Ala	His	Pro	Thr	Leu 490	Ser	Glu	Ala	Phe	Arg 495	Glu
Ala	Asn	Leu	Ala 500	Ala	Ser	Phe	Gly	Lys 505	Ser	Ile	Asn	Phe			

- <210> 17
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> desconocido

- <220>
- <223> fuente desconocida

- <400> 17

Gly	Leu	Phe	Arg	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	Trp	Arg	Leu
1				5				10						15	
Leu	Leu	Arg	Ala												
			20												

5
 <210> 18
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 18

Val Arg Leu Pro Pro Pro Val Arg Leu Pro Pro Pro Val Arg Leu Pro
 1 5 10 15

Pro Pro

15
 <210> 19
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> *Caiman crocodilus*
 <400> 19

Met Gly Leu Gly Leu His Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Leu Gln Gly
 1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 20 25

20
 <210> 20
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> fuente desconocida
 <400> 20

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
 1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 20 25

35
 <210> 21
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> desconocido
 <220>
 <223> fuente desconocida
 <400> 21

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
 20

45

ES 2 560 097 T3

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

5

<400> 22

Thr Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Arg Gln
1 5 10 15

Arg

10 <210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> herpesvirus felino 1

15 <400> 23

Arg Arg Arg Arg Asn Arg Thr Arg Arg Asn Arg Arg Arg Val Arg
1 5 10 15

20 <210> 24
<211> 19
<212> PRT
<213> virus del mosaico del bromo

25 <400> 24

Lys Met Thr Arg Ala Gln Arg Arg Ala Ala Ala Arg Arg Asn Arg Trp
1 5 10 15

Thr Ala Arg

30 <210> 25
<211> 13
<212> PRT
<213> virus linfotrópico humano de tipo III

<400> 25

Thr Arg Arg Gln Arg Thr Arg Arg Ala Arg Arg Asn Arg
1 5 10

35

40 <210> 26
<211> 22
<212> PRT
<213> *Cabassous unicinctus*

<400> 26

Lys Leu Thr Arg Ala Gln Arg Arg Ala Ala Ala Arg Lys Asn Lys Arg
1 5 10 15

Asn Lys Arg Asn Thr Arg
20

45

ES 2 560 097 T3

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> fago P22 de enterobacterias

5

<400> 27

Asn Ala Lys Thr Arg Arg His Glu Arg Arg Arg Lys Leu Ala Ile Glu
1 5 10 15

Arg

10

<210> 28
<211> 18
<212> PRT
<213> desconocido

15

<220>
<223> fuente desconocida

<400> 28

Thr Ala Lys Thr Arg Tyr Lys Ala Arg Arg Ala Glu Leu Ile Ala Glu
1 5 10 15

Arg Arg

20

<210> 29
<211> 16
<212> PRT
<213> *saccharomyces cerevisiae*

25

<400> 29

Thr Arg Arg Asn Lys Arg Asn Arg Ile Gln Glu Gln Leu Asn Arg Lys
1 5 10 15

30

<210> 30
<211> 26
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35

<400> 30

Lys Arg Arg Ile Arg Arg Glu Arg Asn Lys Met Ala Ala Ala Lys Ser
1 5 10 15

Arg Asn Arg Arg Arg Glu Leu Thr Asp Arg
20 25

40

<210> 31
<211> 28
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45

<400> 31

Arg Ile Lys Ala Glu Arg Lys Arg Met Arg Asn Arg Ile Ala Ala Ser
1 5 10 15

Lys Ser Arg Lys Arg Lys Leu Glu Arg Ile Ala Arg
20 25

5 <210> 32
<211> 22
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 32

Lys Arg Ala Arg Asn Thr Glu Ala Ala Arg Arg Ser Arg Ala Arg Lys
1 5 10 15

Leu Gln Arg Met Lys Gln
20

10
15 <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> construcción sintética
<400> 33

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

25 <210> 34
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> construcción sintética
<400> 34

Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
20

35 <210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> *Acidithiobacillus ferrooxidans*

40 <400> 35

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
1 5 10

45 <210> 36
<211> 21
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

5

<400> 36

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
 20

10

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

15

<400> 37

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

20

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> construcción sintética

<400> 38

Arg
 1 5 10

30

<210> 39

<211> 35

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<400> 39

Met Gln Ser Trp Ser Arg Val Tyr Cys Ser Leu Ala Lys Arg Gly His
 1 5 10 15

Phe Asn Arg Ile Ser His Gly Leu Gln Gly Leu Ser Ala Val Pro Leu
 20 25 30

Arg Thr Tyr
 35

40

<210> 40

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 40

Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Val Ser Ala Ala Leu Arg Arg Ser
 1 5 10 15

Phe Ser Thr Ser Ala Gln Asn Asn Ala
 20 25

5
 <210> 41
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 41

Gln Ser Trp Ser Arg Val Tyr Cys Ser Leu Ala Lys Arg Gly His Phe
 1 5 10 15

Asn Arg Ile Ser His Gly Leu Gln Gly Leu Ser Ala Val Pro Leu Arg
 20 25 30

Thr Tyr

10
 15
 20
 <210> 42
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 42

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro

1 5 10

25
 30
 <210> 43
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 43

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15

35
 <210> 44
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 44

Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His
 1 5 10 15

Ser Lys

40

ES 2 560 097 T3

<210> 45
 <211> 1599
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 45

```

atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat      60
atgtcggatc cgcagagctg gagtcgtgtg tactgctcct tggccaagag aggccatttc      120
aatcgaatat ctcattggcct acagggactt tctgcagtgc ctctgagaac ttacgcagat      180
cagccgattg atgtgatgt aacagttata ggttctggtc ctggaggata tgttgctgct      240
attaaagctg cccagttagg cttcaagaca gtctgcattg agaaaaatga aacacttggg      300
ggaacatgct tgaatggttg ttgtattcct tctaaggctt tattgaacaa ctctcattat      360
taccatatgg cccatggaac agattttgca tctagaggaa ttgaaatgtc cgaagtctgc      420
ttgaatttag acaagatgat ggagcagaag agtactgcag taaaagcttt aacaggtgga      480
attgcccact tattcaaaaca gaataagggt gttcatgtca atggatatgg aaagataact      540
ggcaaaaatc aagtcaactg tacgaaagct gatggcggca ctcaggttat tgatacaaag      600
aacattctta tagccacggg ttcagaagtt actccttttc ctggaatcac gatagatgaa      660
gatacaatag tgcatctac aggtgcttta tcttataaaa aagttccaga aaagatggtt      720
gttattggtg caggagtaat aggtgtagaa ttgggttcag tttggcaaag acttggtgca      780
gatgtgacag cagttgaatt tttaggctat gtagggtggag ttggaattga tatggagata      840
tctaaaaact ttcaacgcat ccttcaaaaa caggggttta aatttaaatt gaatacaaag      900

gttactggtg ctaccaagaa gtcagatgga aaaattgatg tttctattga agctgcttct      960
ggtggtaaag ctgaagttat cacttgtgat gtactcttgg tttgcattgg cgcagcagcc      1020
tttactaaga atttgggact agaagagctg ggaattgaac tagatcctag aggtagaatt      1080
ccagtcaata ccagatttca aactaaaatt ccaaatatct atgccattgg tgatgtagtt      1140
gctggtccaa tgctggctca caaagcagag gatgaaggca ttatctgtgt tgaaggaatg      1200
gctggtggtg ctgtgcacat tgactacaat tgtgtgccat cagtgattha cacacacct      1260
gaagttgctt gggttggcaa atcagaagag cagttgaaag aagagggat tgaagtacaaa      1320
gttgggaaat tcccatttgc tgctaacagc agagctaaga caaatgctga cacagatggc      1380
atggtgaaga tccttgggca gaaatcgaca gacagagtac tgggagcaca tattcttggg      1440
ccaggtgctg gagaaatggt aaatgaagct gctcttgcct tggaaatagg agcatcctgt      1500
gaagatatag ctagagtctg tcatgcacat ccgaccttat cagaagcttt tagagaagca      1560
aatcttgcct cgtcatttgg caaatcaatc aacttttga      1599
    
```

10 <210> 46
 <211> 532
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 46

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10
 Arg Gly Ser His Met Ser Asp Pro Gln Ser Trp Ser Arg Val Tyr Cys
 20 30
 Ser Leu Ala Lys Arg Gly His Phe Asn Arg Ile Ser His Gly Leu Gln
 35 40 45
 Gly Leu Ser Ala Val Pro Leu Arg Thr Tyr Ala Asp Gln Pro Ile Asp
 50 55 60
 Ala Asp Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Val Ala Ala
 65 70 75 80
 Ile Lys Ala Ala Gln Leu Gly Phe Lys Thr Val Cys Ile Glu Lys Asn
 85 90 95
 Glu Thr Leu Gly Gly Thr Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys
 100 105 110
 Ala Leu Leu Asn Asn Ser His Tyr Tyr His Met Ala His Gly Thr Asp
 115 120 125

Phe Ala Ser Arg Gly Ile Glu Met Ser Glu Val Arg Leu Asn Leu Asp
 130 135 140
 Lys Met Met Glu Gln Lys Ser Thr Ala Val Lys Ala Leu Thr Gly Gly
 145 150 155 160
 Ile Ala His Leu Phe Lys Gln Asn Lys Val Val His Val Asn Gly Tyr
 165 170 175
 Gly Lys Ile Thr Gly Lys Asn Gln Val Thr Ala Thr Lys Ala Asp Gly
 180 185 190
 Gly Thr Gln Val Ile Asp Thr Lys Asn Ile Leu Ile Ala Thr Gly Ser
 195 200 205
 Glu Val Thr Pro Phe Pro Gly Ile Thr Ile Asp Glu Asp Thr Ile Val
 210 215 220
 Ser Ser Thr Gly Ala Leu Ser Leu Lys Lys Val Pro Glu Lys Met Val
 225 230 235 240
 Val Ile Gly Ala Gly Val Ile Gly Val Glu Leu Gly Ser Val Trp Gln
 245 250 255
 Arg Leu Gly Ala Asp Val Thr Ala Val Glu Phe Leu Gly His Val Gly
 260 265 270
 Gly Val Gly Ile Asp Met Glu Ile Ser Lys Asn Phe Gln Arg Ile Leu
 275 280 285
 Gln Lys Gln Gly Phe Lys Phe Lys Leu Asn Thr Lys Val Thr Gly Ala
 290 295 300
 Thr Lys Lys Ser Asp Gly Lys Ile Asp Val Ser Ile Glu Ala Ala Ser
 305 310 315 320
 Gly Gly Lys Ala Glu Val Ile Thr Cys Asp Val Leu Leu Val Cys Ile
 325 330 335
 Gly Arg Arg Pro Phe Thr Lys Asn Leu Gly Leu Glu Glu Leu Gly Ile
 340 345 350
 Glu Leu Asp Pro Arg Gly Arg Ile Pro Val Asn Thr Arg Phe Gln Thr
 355 360 365
 Lys Ile Pro Asn Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Val Val Ala Gly Pro Met
 370 375 380

Leu Ala His Lys Ala Glu Asp Glu Gly Ile Ile Cys Val Glu Gly Met
 385 390 395 400
 Ala Gly Gly Ala Val His Ile Asp Tyr Asn Cys Val Pro Ser Val Ile
 405 410 415
 Tyr Thr His Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Lys Ser Glu Glu Gln Leu
 420 425 430
 Lys Glu Glu Gly Ile Glu Tyr Lys Val Gly Lys Phe Pro Phe Ala Ala
 435 440 445
 Asn Ser Arg Ala Lys Thr Asn Ala Asp Thr Asp Gly Met Val Lys Ile
 450 455 460
 Leu Gly Gln Lys Ser Thr Asp Arg Val Leu Gly Ala His Ile Leu Gly
 465 470 475 480
 Pro Gly Ala Gly Glu Met Val Asn Glu Ala Ala Leu Ala Leu Glu Tyr
 485 490 495
 Gly Ala Ser Cys Glu Asp Ile Ala Arg Val Cys His Ala His Pro Thr
 500 505 510
 Leu Ser Glu Ala Phe Arg Glu Ala Asn Leu Ala Ala Ser Phe Gly Lys
 515 520 525
 Ser Ile Asn Phe
 530

- 5 <210> 47
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> construcción sintética
- <400> 47
 cgggatccgg gagcactagt gatt 24
- 15 <210> 48
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> construcción sintética
- <400> 48
 cccctcgagt cattttgatc gtattgc 27
- 25 <210> 49
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 49

Met Pro Ala Arg Ala Leu Leu Pro Arg Arg Met Gly His Arg Thr Leu
1 5 10 15

Ala Ser Thr Pro Ala Leu Trp Ala Ser Ile Pro Cys Pro Arg Ser
20 25 30

<210> 50

<211> 55

5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 50

Met Tyr Arg Tyr Leu Ala Lys Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ala Gly Pro
1 5 10 15

Ala Ala Leu Gly Ser Ala Ala Asn His Ser Ala Ala Leu Leu Gly Arg
20 25 30

Gly Arg Gly Gln Pro Ala Ala Ala Ser Gln Pro Gly Leu Ala Leu Ala
35 40 45

Ala Arg Arg His Tyr Ser Glu
50 55

10

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno mitocondrial en un sujeto, comprendiendo dicha proteína de fusión, un dominio de transducción de proteínas (PTD) fusionado a un componente funcional de una enzima mitocondrial y una secuencia de direccionamiento mitocondrial (MTS),
 5 en el que dicha MTS está situada entre dicho PTD y dicho componente funcional y en el que dicha MTS es una MTS de otra enzima mitocondrial codificada por un gen nuclear, en el que dicha enzima es una enzima mitocondrial de un complejo enzimático multicomponente mitocondrial, y
 10 en el que dicho dominio de transducción de proteínas es un péptido TAT, en el que dicho tratamiento comprende la administración de dicha proteína de fusión a dicho sujeto y es un tratamiento prolongado continuo para una enfermedad crónica o comprende una única o unas pocas administraciones temporales para el tratamiento de un trastorno agudo.
2. La proteína de fusión para su uso según la reivindicación 1, en la que la porción de dicha proteína de fusión que es C-terminal a dicha MTS consiste en dicho componente funcional de una enzima.
- 15 3. La proteína de fusión para su uso según la reivindicación 2, en la que no están presentes residuos heterólogos en la enzima en la porción C-terminal a la MTS y la escisión de dicha MTS genera una enzima con la secuencia nativa, que se puede integrar fácilmente en un complejo enzimático multicomponente conformacionalmente sensible.
4. La proteína de fusión para su uso de la reivindicación 1 o 2, en la que dicha enzima es la lipoamida deshidrogenasa (LAD).
- 20 5. La proteína de fusión para su uso de la reivindicación 1 o 2, en la que dicha enzima se selecciona del grupo que consiste en la subunidad alfa de la 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (cetoácido deshidrogenasa E1 α de cadena ramificada), la subunidad beta de la 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (cetoácido deshidrogenasa E1 α de cadena ramificada), la acil-CoA deshidrogenasa, específica de cadena media, la acil-CoA deshidrogenasa, específica de cadena muy larga, la subunidad alfa de la enzima trifuncional (3-hidroxiacil-Co-A deshidrogenasa de cadena larga o LCHAD) (HADHA), la subunidad beta de la enzima trifuncional (hidroxiacil-CoA deshidrogenasa/3-cetoacil-CoA Tiolasa/Enoil-CoA hidratasa (HADHB)), la subunidad beta del componente E1 de la piruvato deshidrogenasa y la subunidad alfa del componente E1 de la piruvato deshidrogenasa.
- 25 6. La proteína de fusión para su uso de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho complejo enzimático multicomponente se selecciona de entre el grupo que consiste en complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDHC), complejo [alfa]-cetoglutarato deshidrogenasa (KGDHC) y complejo ceto-ácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKDHC).
- 30 7. La proteína de fusión para su uso de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho complejo enzimático multicomponente se selecciona de entre el grupo que consiste en complejo I (NADH-ubiquinona oxidorreductasa), complejo II (succinatoubiquinona oxidorreductasa), complejo III (ubiquinol-ferricitocromo c oxidorreductasa), complejo IV (citocromo c oxidorreductasa) y complejo V (F1F0 ATPasa).
- 35 8. La proteína de fusión para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho trastorno mitocondrial está causado por una mutación sin sentido en dicha enzima.
9. La proteína de fusión para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho trastorno mitocondrial se selecciona del grupo que consiste en deficiencia de LAD y deficiencia de complejo I aislada.
 40
10. La proteína de fusión para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho trastorno mitocondrial es una enfermedad neurodegenerativa.
11. La proteína de fusión para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho trastorno mitocondrial se selecciona del grupo que consiste en encefalopatía e insuficiencia hepática que se acompaña de acidosis láctica severa, hiperamonemia y coagulopatía, enfermedad de Alpers, síndrome de Barth, defectos de la beta-oxidación, deficiencia de acil-carnitina, deficiencia de carnitina, deficiencia de la co-enzima Q10, deficiencia del complejo I, deficiencia del complejo II, deficiencia del complejo III, deficiencia del complejo IV, deficiencia del complejo V, deficiencia de COX, CPEO, KSS, LCHAD, enfermedad o síndrome de Leigh, LHON, LIC (miocardiopatía infantil mortal), enfermedad de Luft, MELAS, MERRF, citopatía mitocondrial, miopatía mitocondrial, MNGIE, NARP y deficiencia de piruvato deshidrogenasa.
 45 50
12. La proteína de fusión para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho trastorno mitocondrial se selecciona del grupo que consiste en deficiencia de la ornitina transcarbamilasa (hiperamonemia) (OTCD), deficiencia de carnitina O-palmitoiltransferasa II (CPT2), deficiencia de fumarasa, deficiencia de citocromo c oxidasa asociada con el síndrome de Leigh, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (MSUD), deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD), deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (LCAD), deficiencia de proteína trifuncional, oftalmoplejía externa progresiva
 55

con deleciones de ADN mitocondrial (POLG), DGUOK, TK2, deficiencia de piruvato descarboxilasa, MMC-Miopatía y miocardiopatía materna; Ataxia, Retinitis pigmentosa, FICP-Miocardiopatía infantil mortal plus, una miocardiopatía asociada a MELAS; MELAS-Encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de pseudoictus; LDYT-neuropatía óptica y distonía hereditaria de Leber; MHCM-Miocardiopatía hipertrófica de herencia materna; DM-Diabetes mellitus; DMDF- Diabetes mellitus + sordera; CIPO-pseudoobstrucción crónica intestinal con miopatía y oftalmoplejía; DEAF-Sordera de herencia materna; PEM-Encefalopatía progresiva; SNHL-Pérdida de la audición neurosensorial; Encefalomiopatía; DEMCHO-demencia y corea; AMDF-Ataxia, mioclonos; ESOC-Epilepsia, atrofia óptica; FBSN-Necrosis estriatal bilateral familiar; FSGS-Glomeruloesclerosis focal y segmentaria; LIMM-Miopatía mitocondrial infantil mortal; MDM-Miopatía y diabetes mellitus; MEPR-Epilepsia mioclónica y retraso psicomotor; 5
10 MERME MERRF/MELAS-enfermedad solapante; MHCM-Miocardiopatía hipertrófica de herencia materna; MICM-Miocardiopatía de herencia materna; MILS-Síndrome de Leigh de herencia materna; Encefalomiocardiopatía mitocondrial; Trastorno multisistémico mitocondrial (miopatía, encefalopatía, ceguera, pérdida de audición, neuropatía periférica); NAION-Neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica; PEM-Encefalopatía progresiva; 15
PME-Epilepsia mioclónica progresiva; RTT-Síndrome de Rett; SIDS-Síndrome de la muerte súbita del lactante y MIDD-Diabetes y sordera de herencia materna.

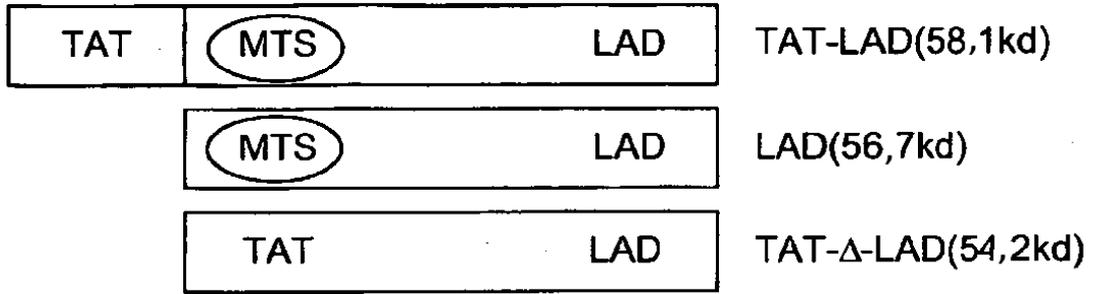


FIG. 1A



FIG. 1B

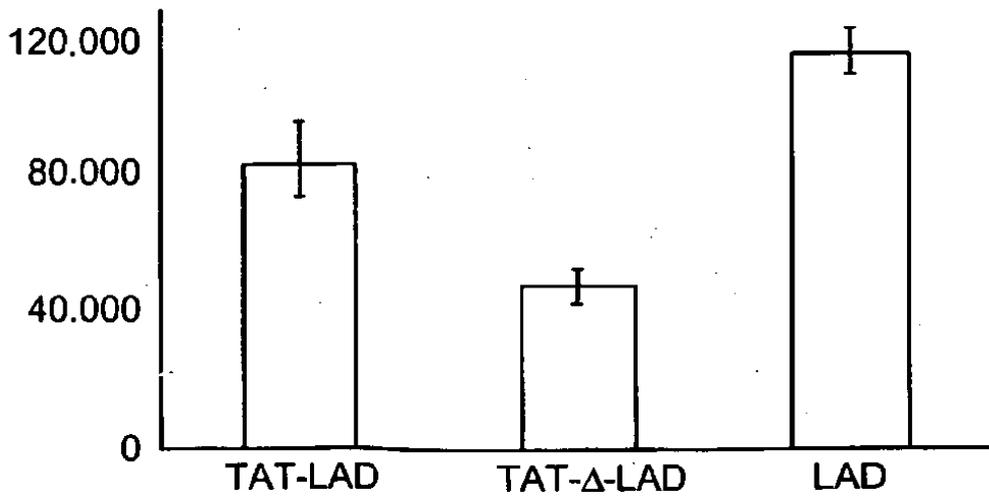


FIG. 1C

FIG. 2A

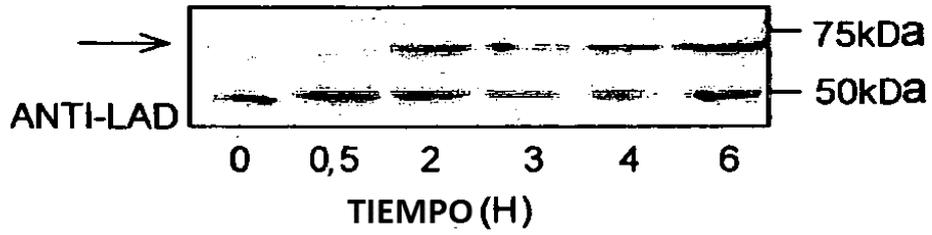


FIG. 2B

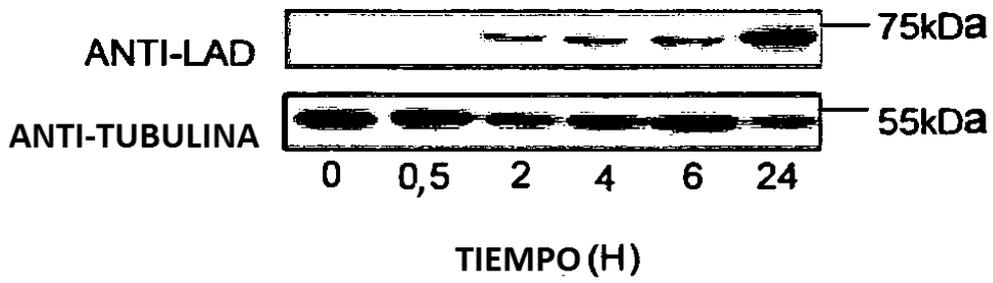
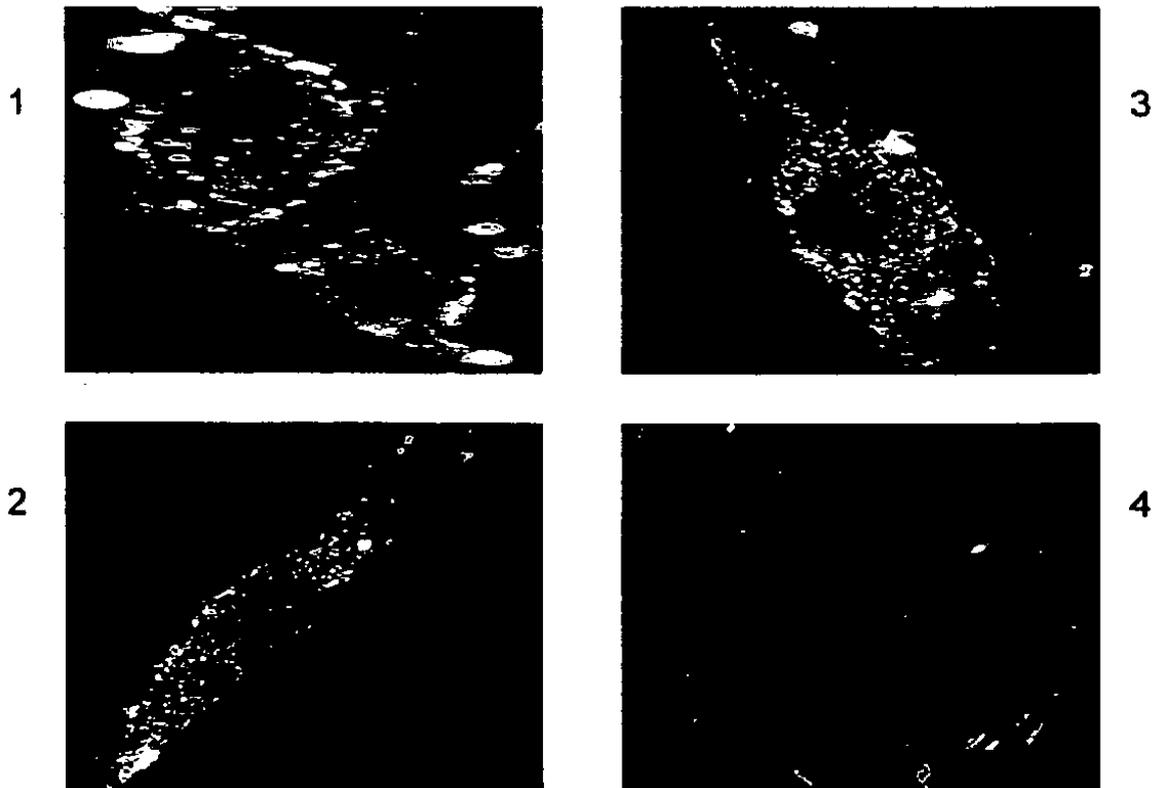
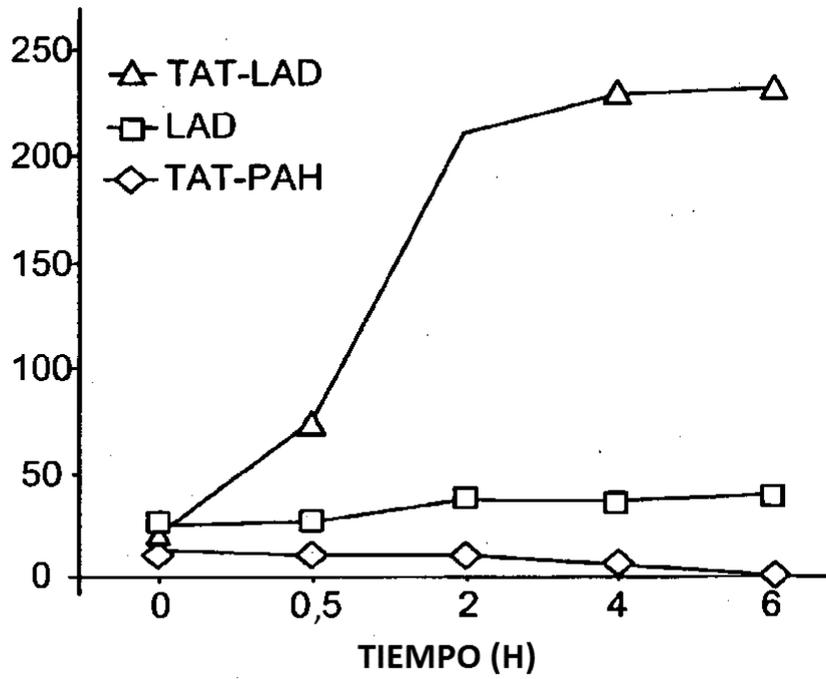


FIG. 2C



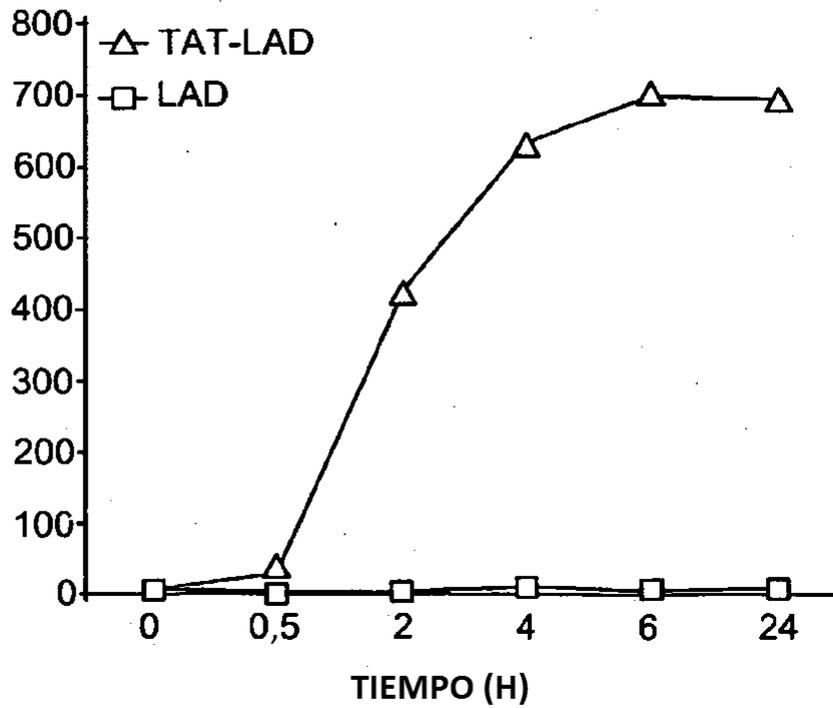
ACTIVIDAD DE LAD
(NMOL/MIN/MG)

FIG. 2D



ACTIVIDAD DE LAD
(NMOL/MIN/MG)

FIG. 2E



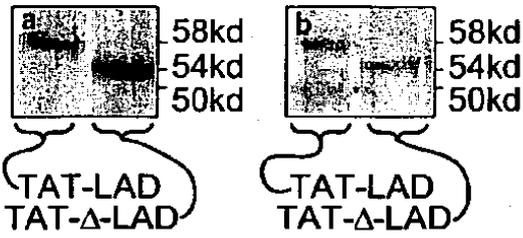


FIG. 3A

FIG. 3B

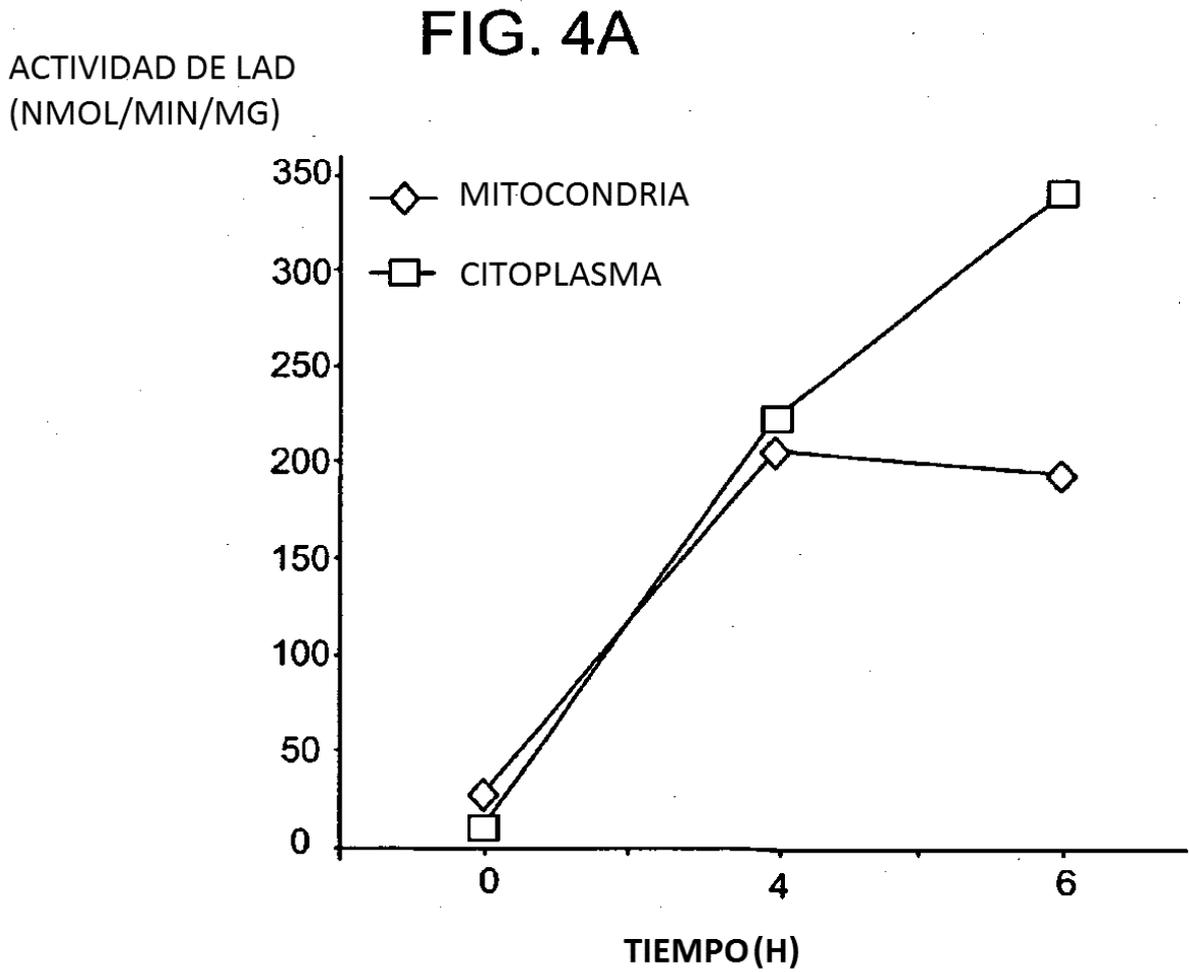
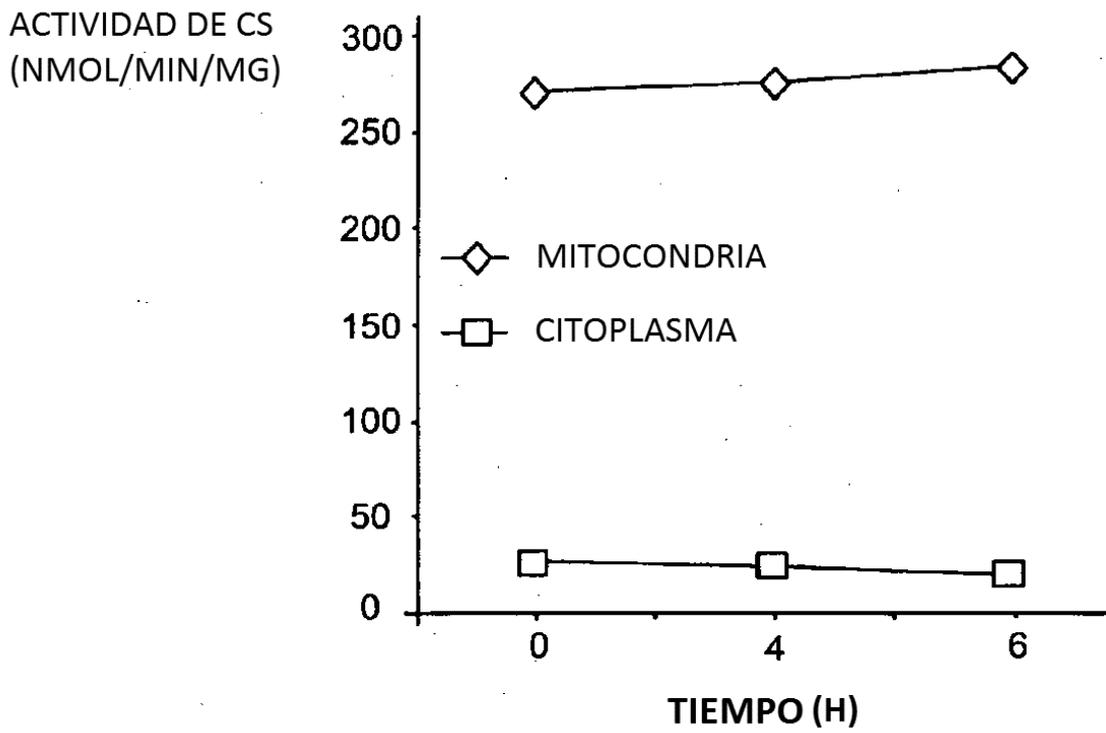


FIG. 4B



COCIENTE
LAD/CS

FIG. 4C

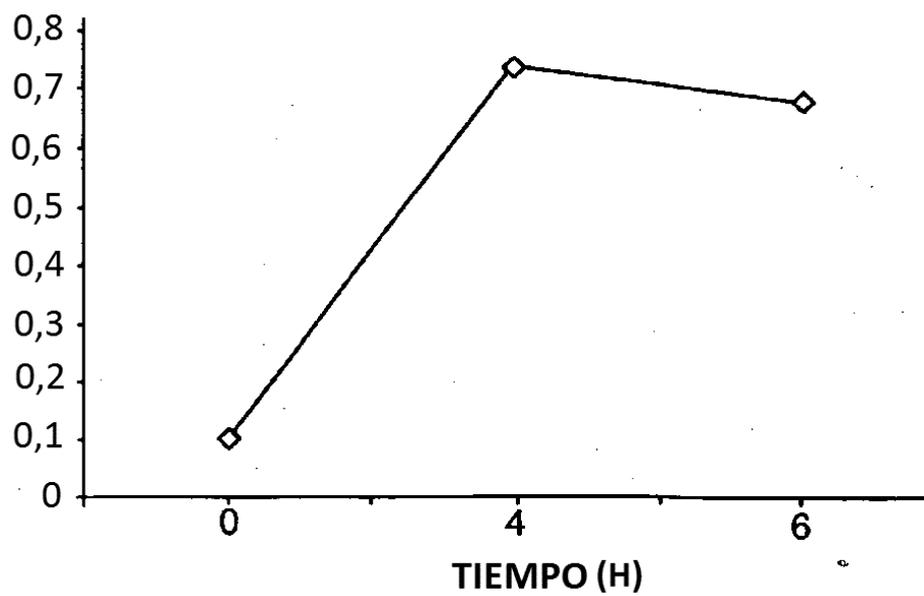
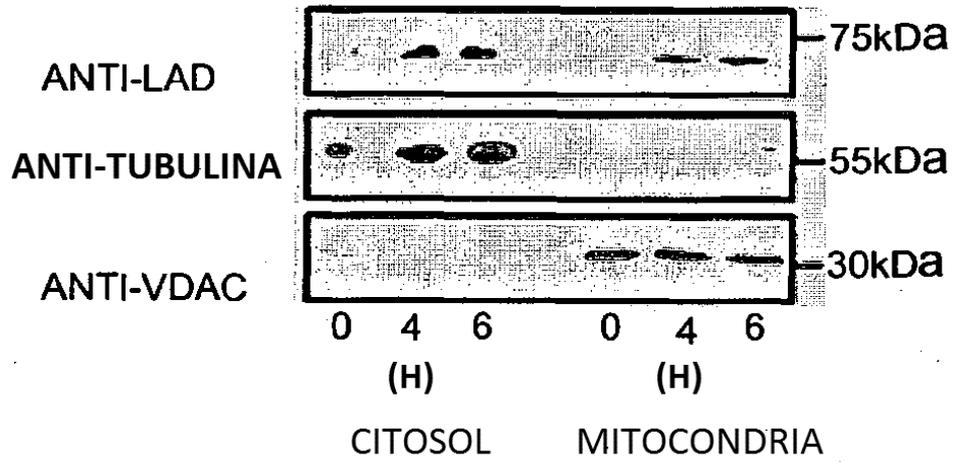


FIG. 4D



ACTIVIDAD DE LAD
(NMOL/MIN/MG)

FIG. 4E

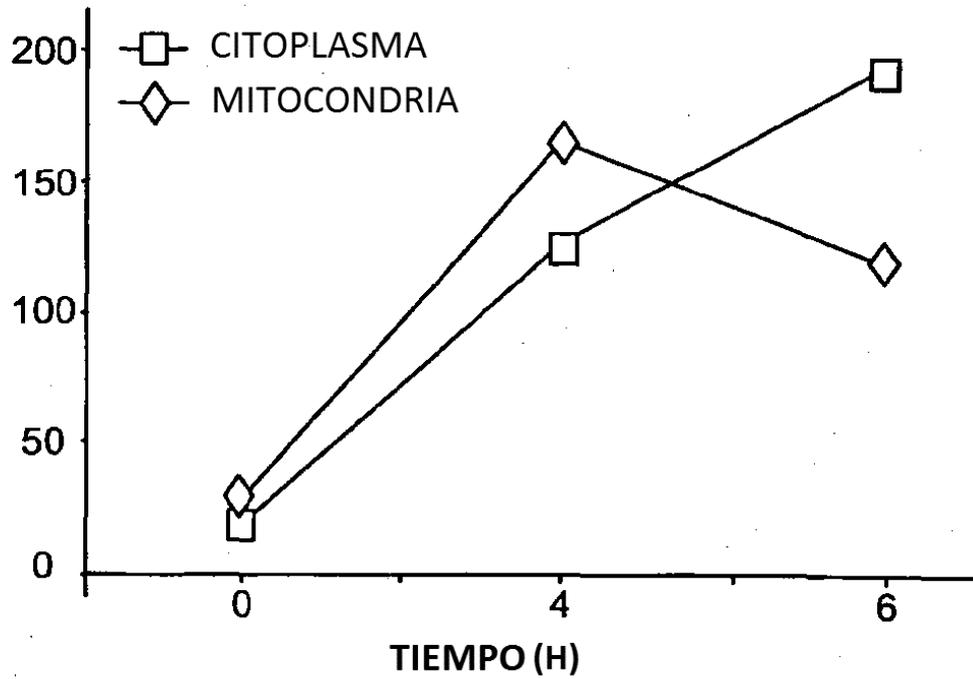
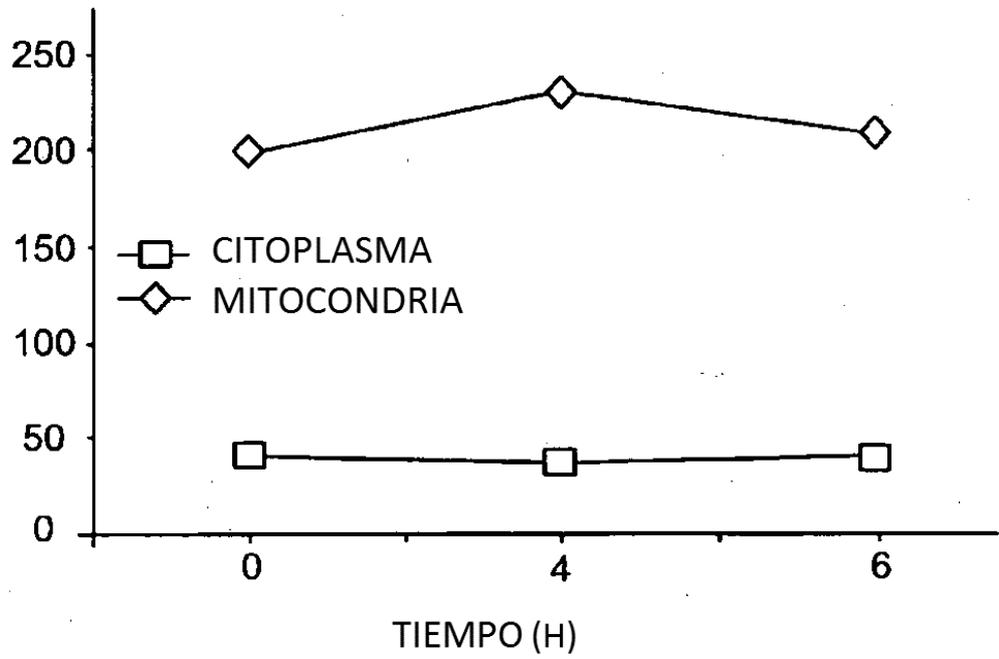


FIG. 4F

ACTIVIDAD DE CS
(NMOL/MIN/MG)



COCIENTE
LAD/CS

FIG. 4G

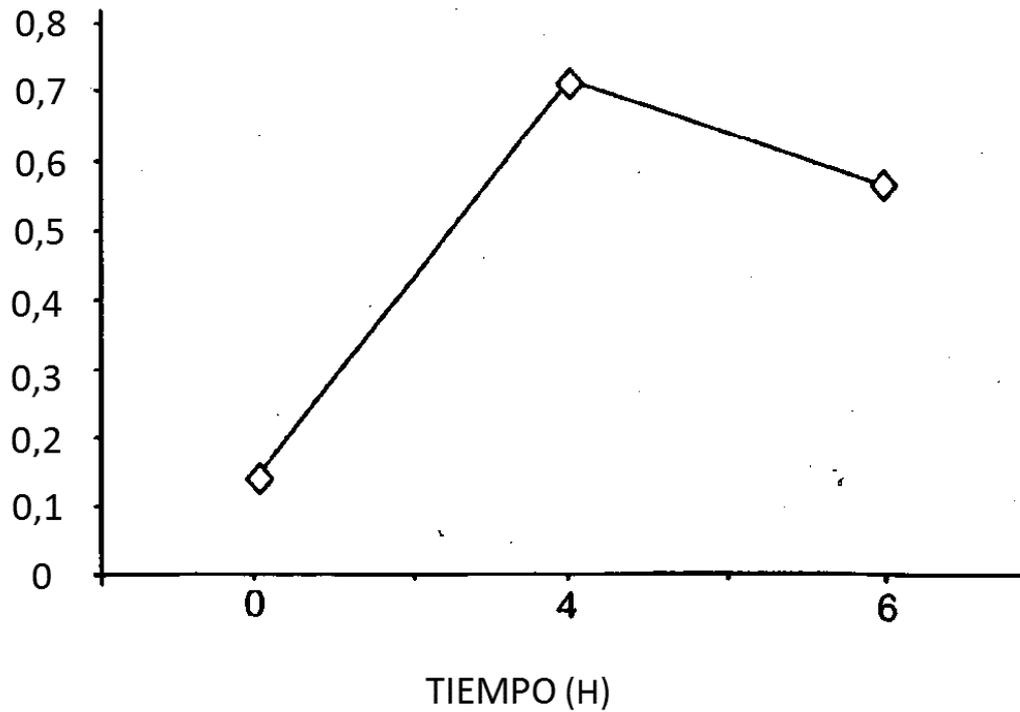


FIG. 4H

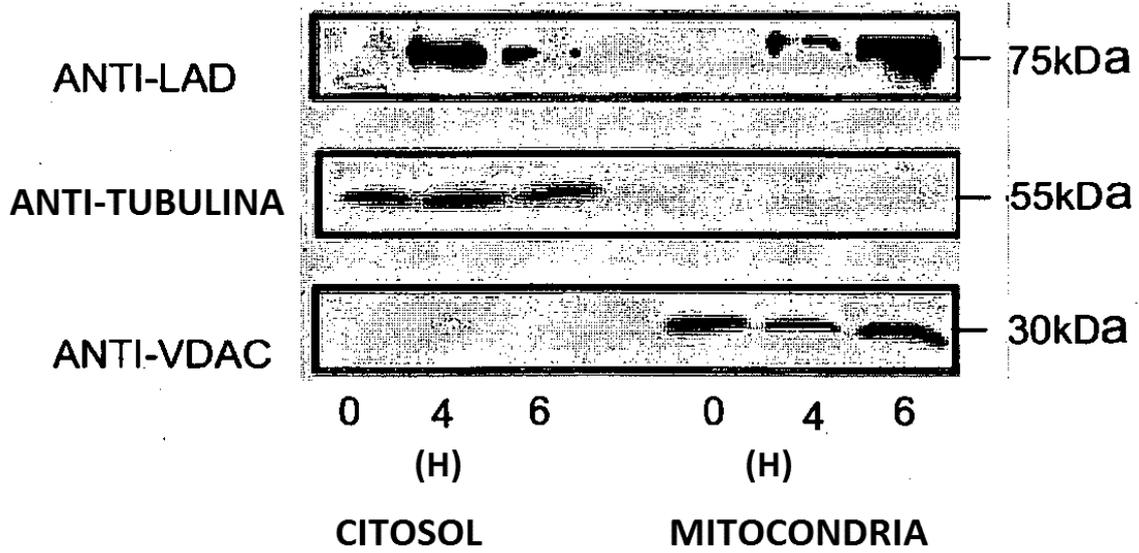
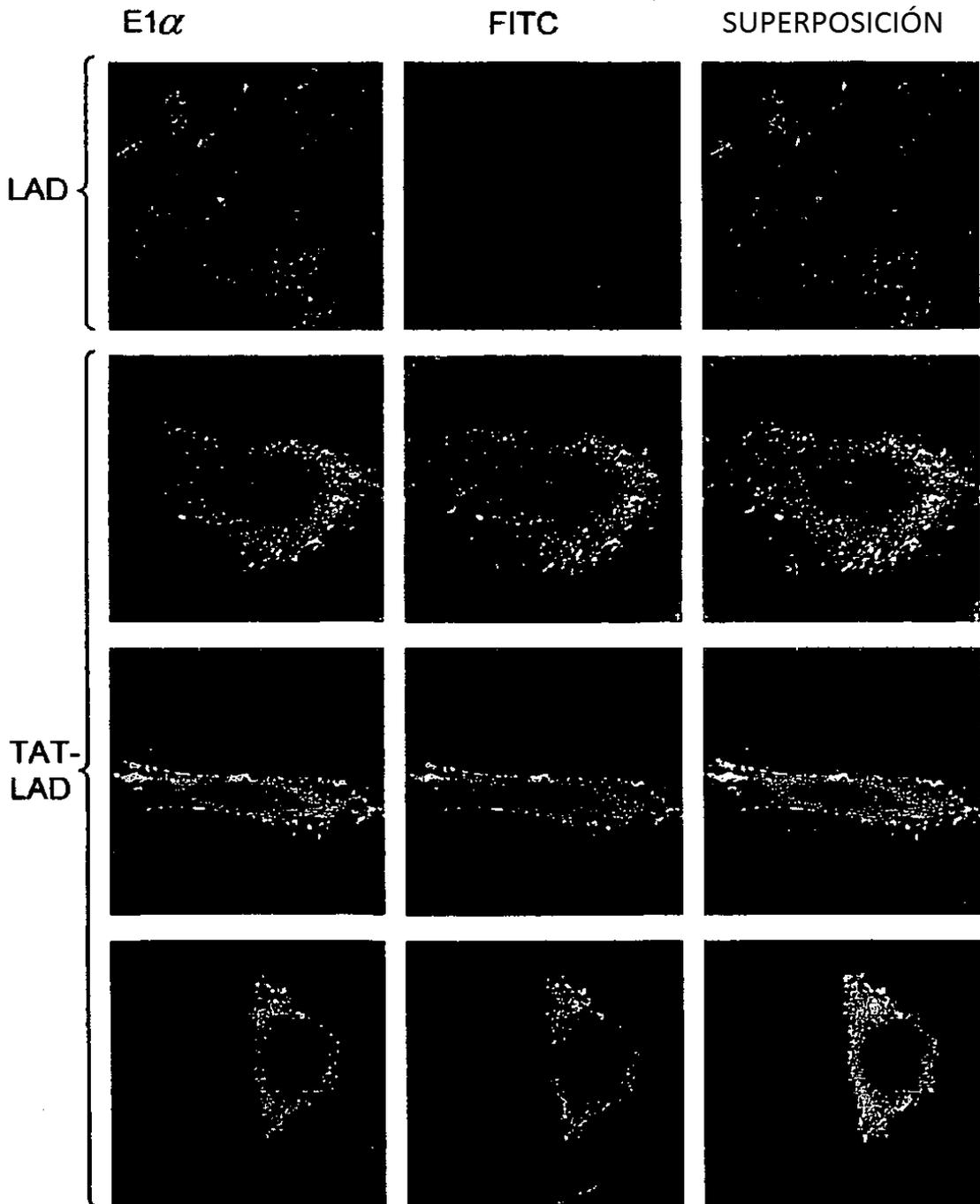
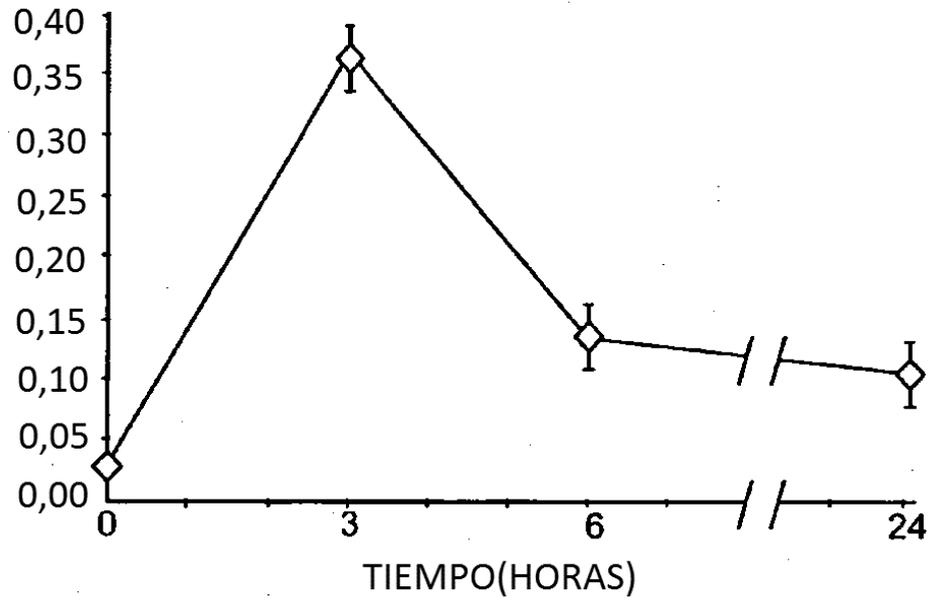


FIG. 5A



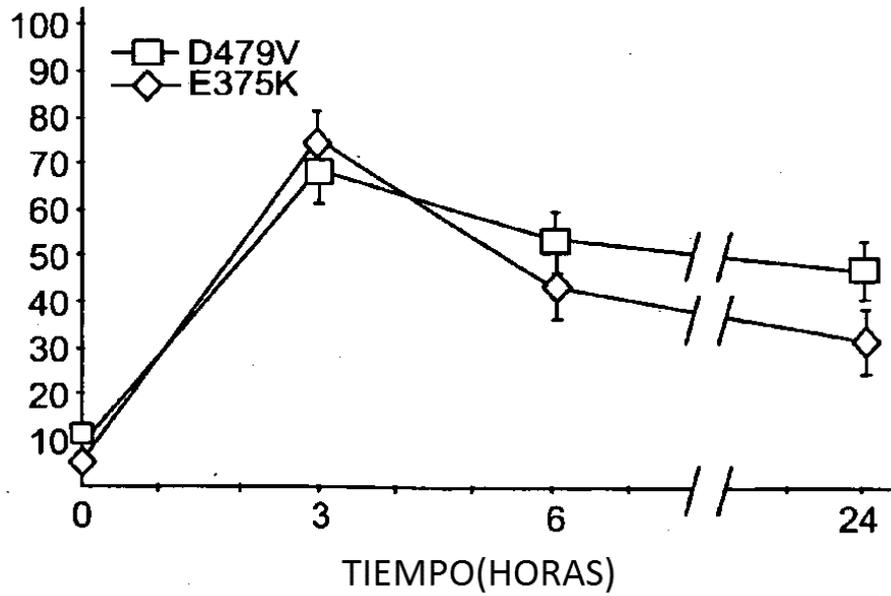
ACTIVIDAD DE PDHC
(NMOL/MIN/MG)

FIG. 5B



ACTIVIDAD DE PDHC
(% DE LO NORMAL)

FIG. 5C



% DE ACTIVIDAD
EN EL PUNTO INICIAL

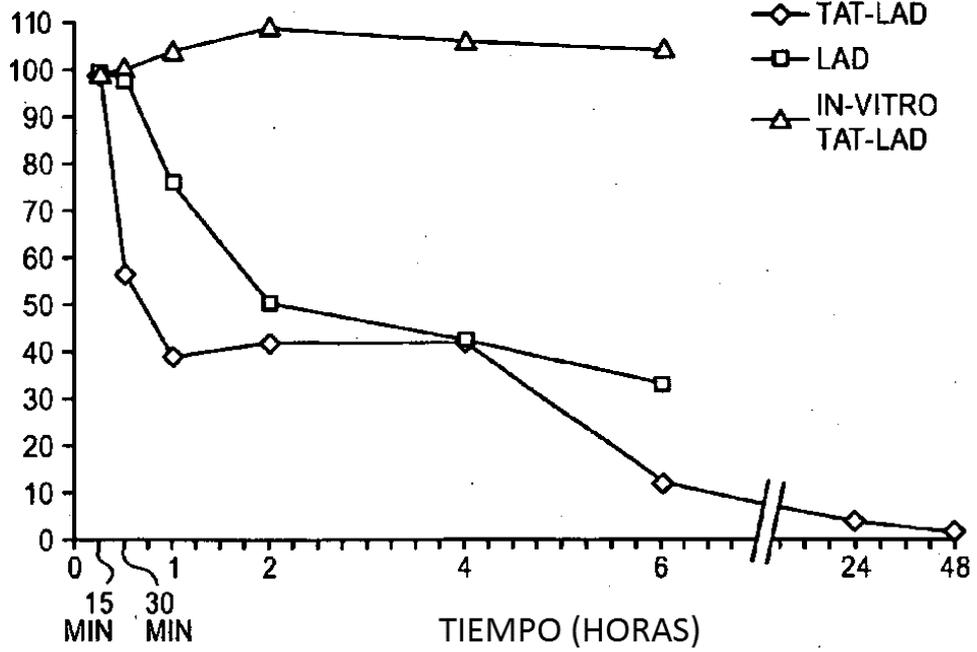


FIG. 6

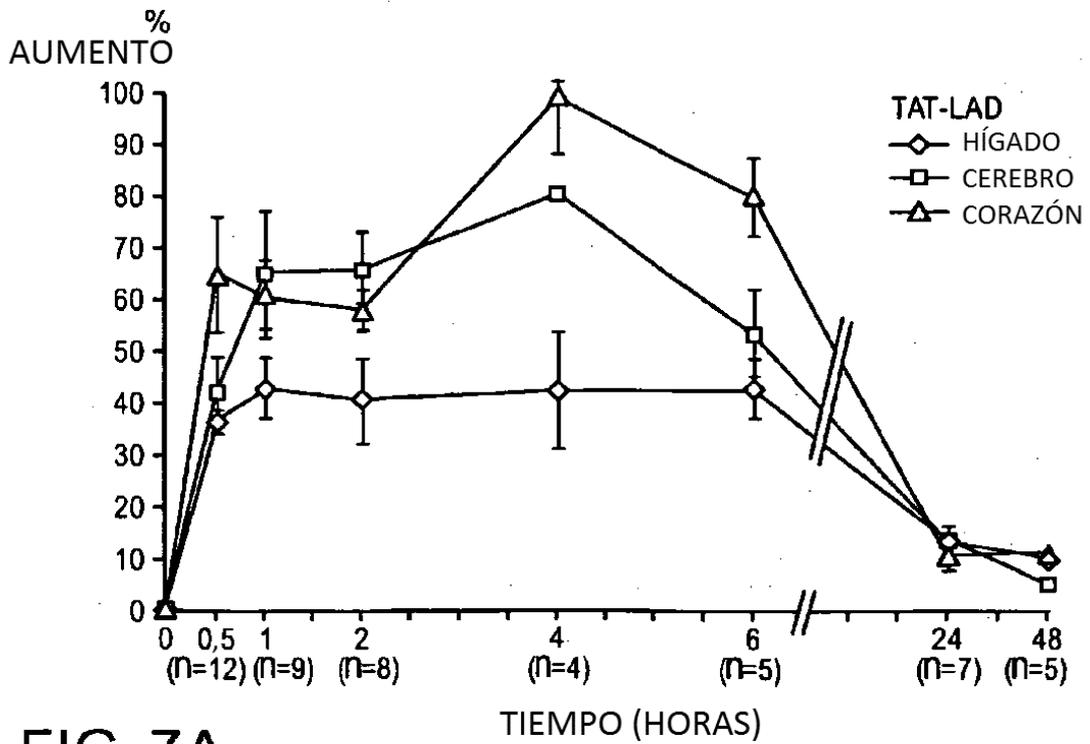


FIG. 7A

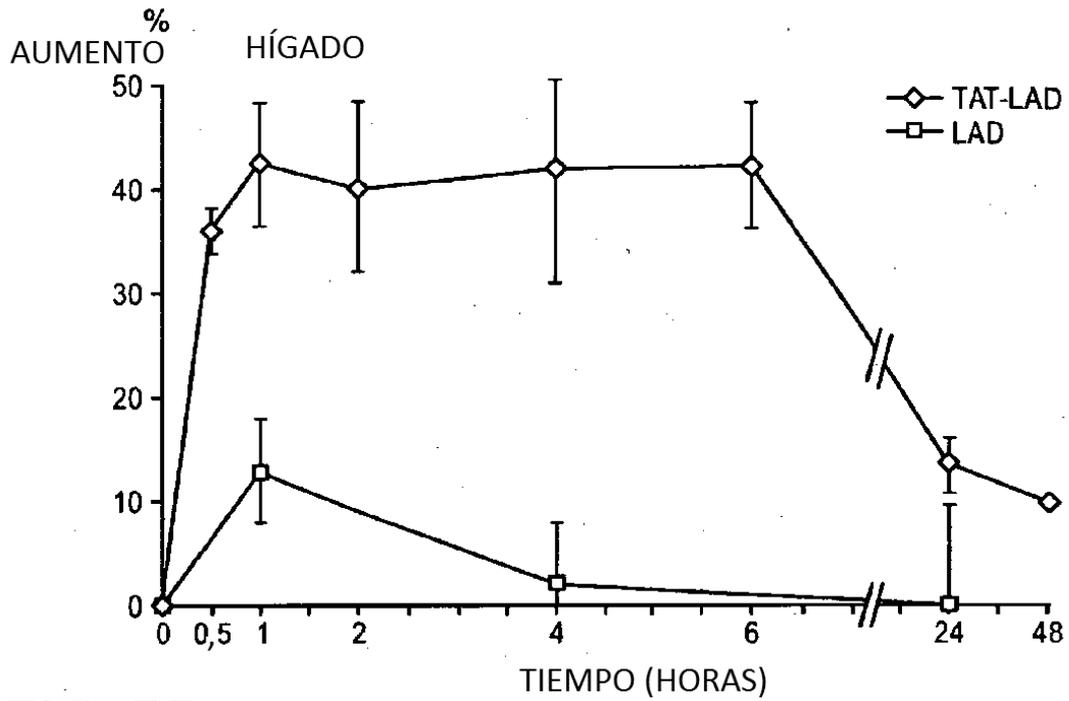


FIG. 7B

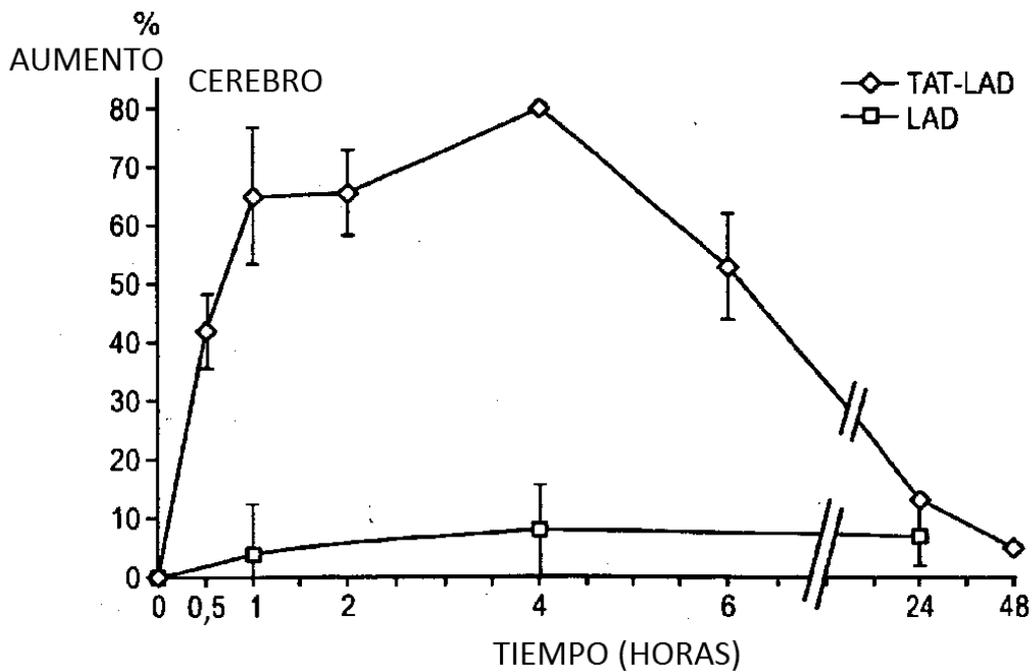


FIG. 7C

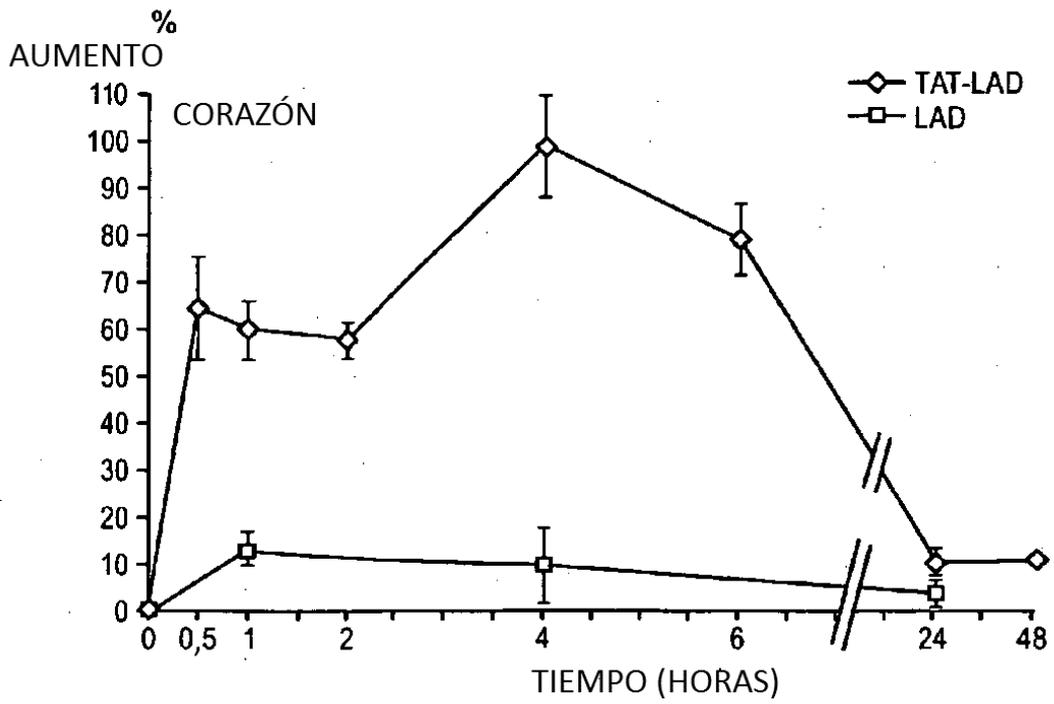


FIG. 7D

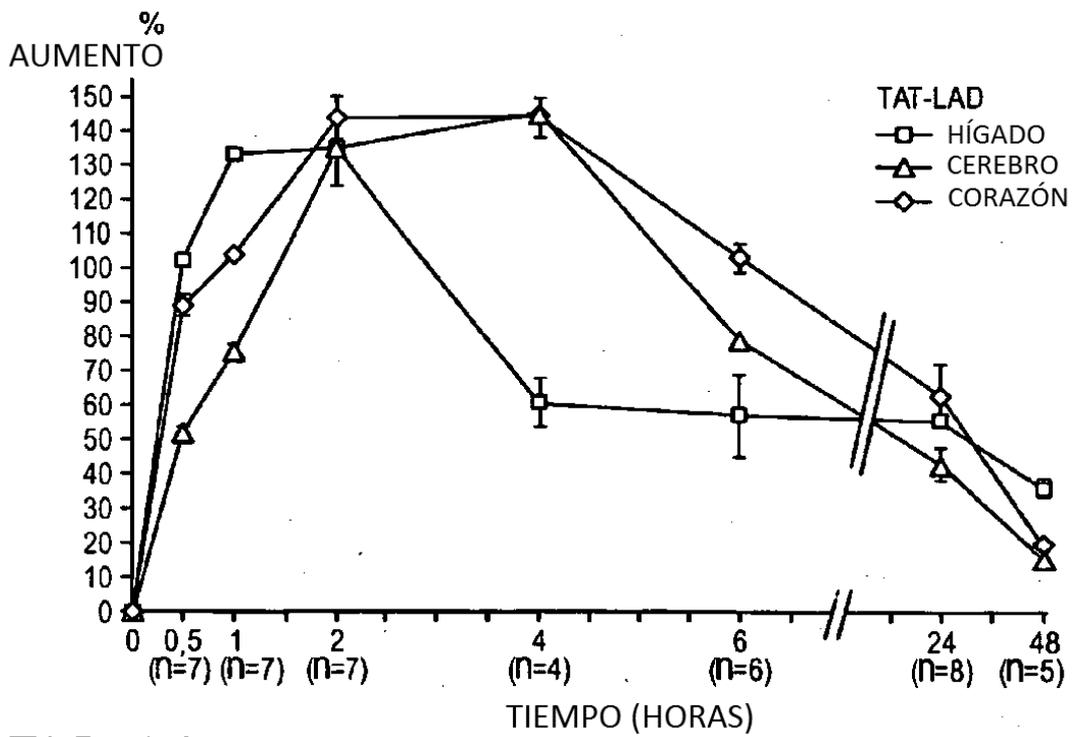


FIG. 8A

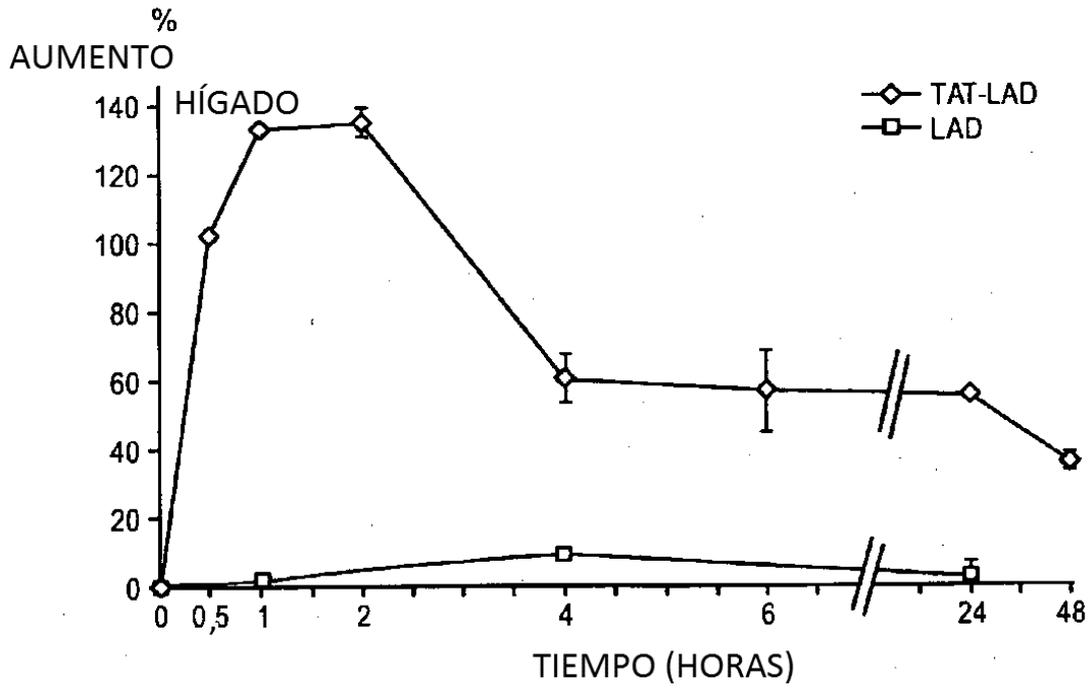


FIG. 8B

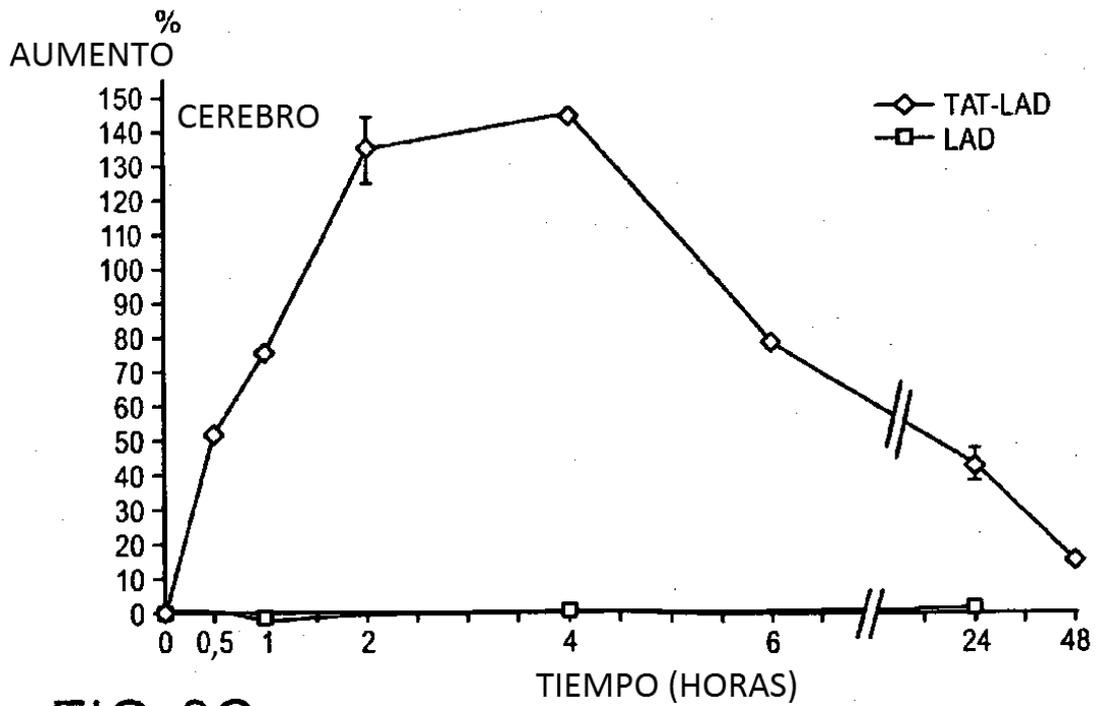


FIG. 8C

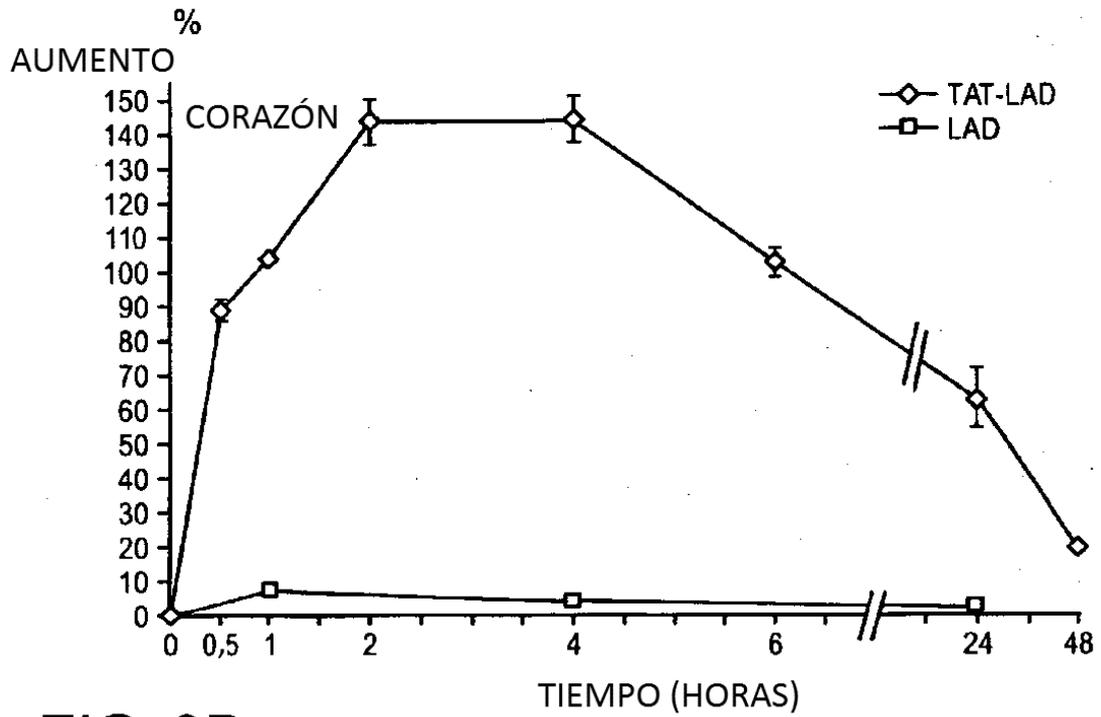


FIG. 8D

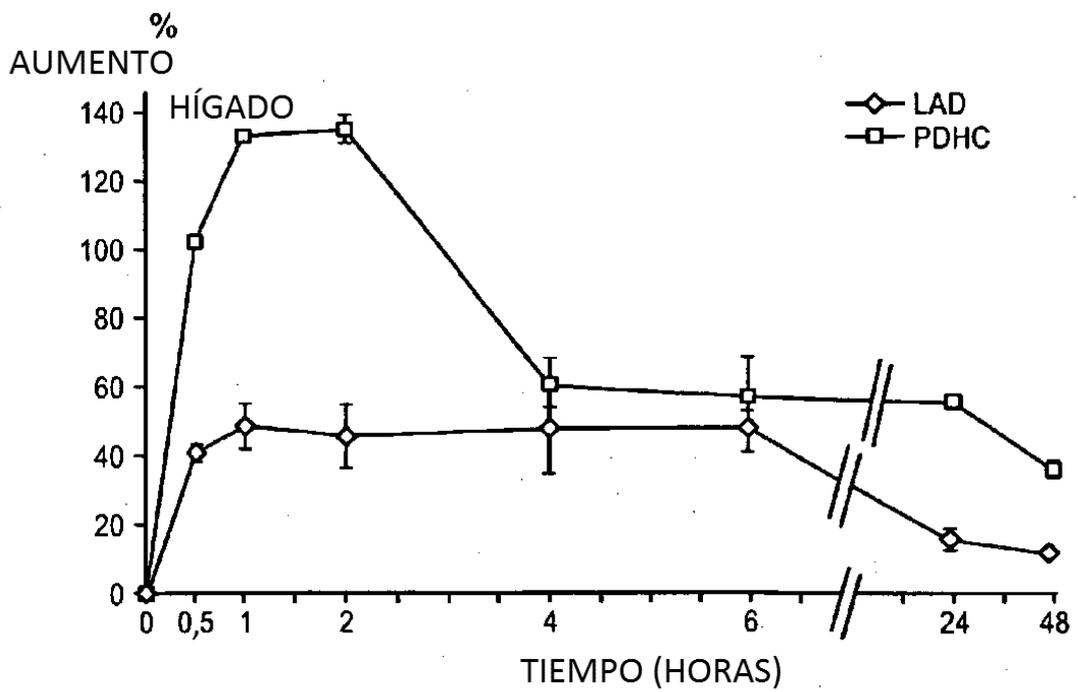


FIG. 9A

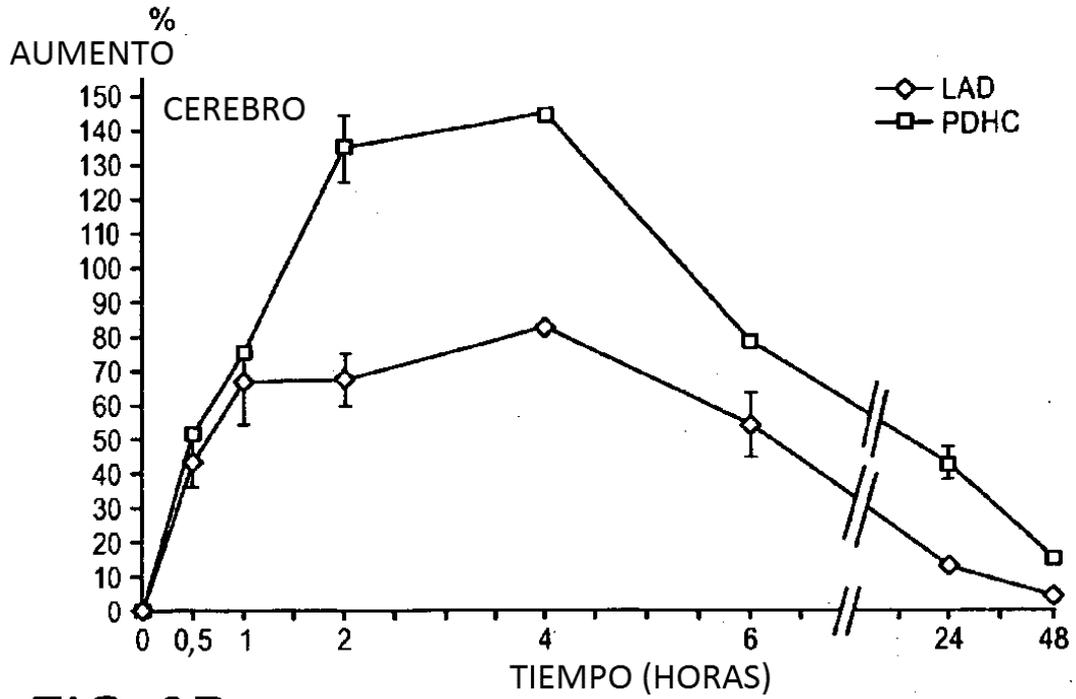


FIG. 9B

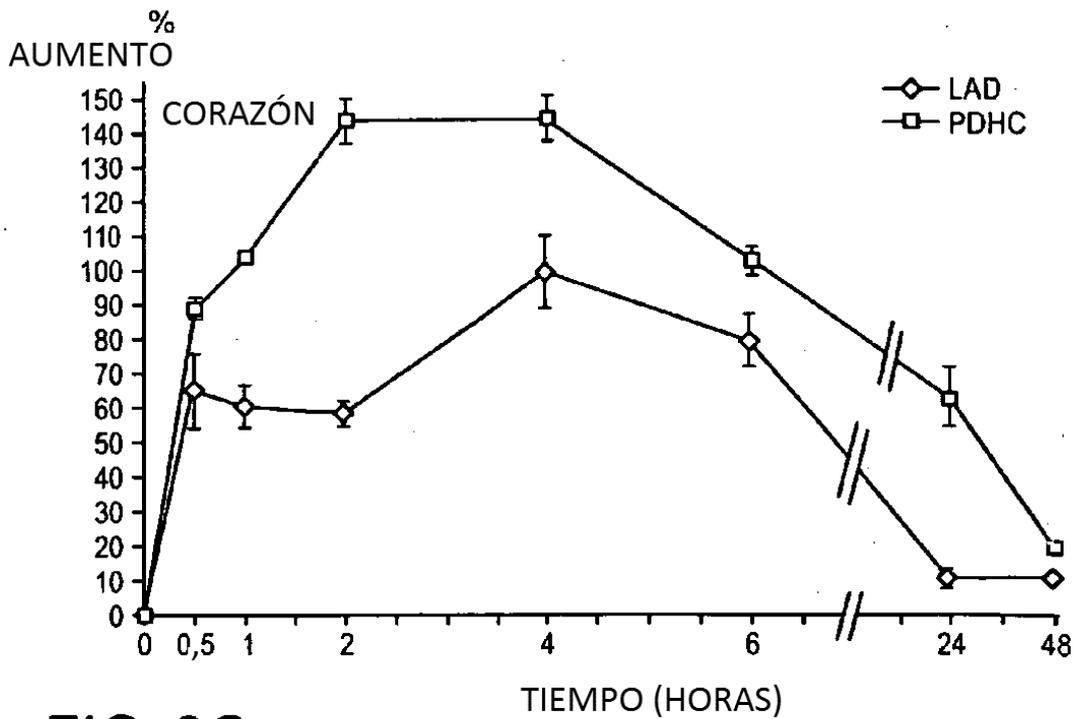


FIG. 9C

FIG. 10

