

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 034**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2013 PCT/EP2013/068270**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14037390**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2013 E 13759995 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2900254**

54 Título: **Alfa-1-microglobulina para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con mitocondrias**

30 Prioridad:

**05.09.2012 DK 201270538**

**12.09.2012 DK 201270557**

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

**31.01.2017**

73 Titular/es:

**A1M PHARMA AB (100.0%)**

**Scheelevägen 22**

**223 63 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**AKERSTRÖM, BO;**

**GRAM, MAGNUS y**

**ROSENLOF, LENA**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 599 034 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

Alfa-1-microglobulina para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con mitocondrias

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se basa en el hallazgo que la alfa-1-microglobulina (A1M) desempeña un papel importante en la protección de las mitocondrias frente al daño. La A1M se une a una subunidad del complejo I, protegiendo de ese modo la estructura y función de las mitocondrias. Se han implicado las mitocondrias en varias enfermedades humanas y los hallazgos dados a conocer en el presente documento apoyan el uso de A1M en el tratamiento de enfermedades relacionadas con mitocondrias.

### 15 **Antecedentes de la invención**

Las mitocondrias son orgánulos en células eucariotas. Generan la mayoría del suministro de células de adenosín trifosfato (ATP), que se usa como fuente de energía. Por tanto, las mitocondrias son indispensables para la producción de energía, para la supervivencia de células eucariotas y para una correcta función celular. Además del suministro de energía, las mitocondrias están implicadas en otros varios procesos tales como señalización celular, diferenciación celular, muerte celular así como el control del ciclo celular y crecimiento celular. En particular, las mitocondrias son reguladores cruciales de la apoptosis celular y también desempeñan un papel principal en múltiples formas de muerte celular no apoptótica tal como, por ejemplo, necrosis.

En los últimos años se han publicado muchos artículos que describen la contribución mitocondrial a una variedad de enfermedades. Algunas enfermedades pueden provocarse por mutaciones o deleciones en el genoma mitocondrial, mientras que otras pueden provocarse por daño de la función mitocondrial. Actualmente hay tratamiento disponible que puede curar enfermedades mitocondriales.

En vista de la importancia reconocida de mantener o recuperar una función mitocondrial normal, hay una necesidad de identificar sustancias que puedan usarse para proteger la estructura y función mitocondriales o que puedan usarse para recuperar o tratar disfunciones en las mitocondrias.

La alfa-1-microglobulina (A1M) es una proteína tisular y plasmática de 26 kDa que se ha aislado y caracterizado a partir del plasma, hígado y orina de varias especies incluyendo el hombre y platija (31). En el plasma, la A1M se encuentra en forma libre así como unida de manera covalente a otras proteínas plasmáticas grandes. En seres humanos, la A1M forma complejos con IgA, albúmina y protrombina (5). La A1M libre y diversos complejos de alto peso molecular también están presentes en la matriz extracelular de todos los tejidos que se originan tanto del plasma como de la síntesis periférica (4). En los tejidos, la A1M se ubica preferencialmente en las interfaces entre sangre y tejido en los vasos sanguíneos, aire y tejido en el pulmón, y madre y feto en la placenta, especialmente en sitios de lesión (44). No se conoce la función fisiológica de la A1M, pero se ha mostrado que tiene actividad reductasa, y que une hemo libre y radicales, lo que sugiere que puede tener funciones protectoras durante situaciones con estrés oxidativo (31). La A1M se une a muchos tipos de células, en muchos casos seguido por internalización (36, 49).

### 45 **Descripción detallada de la invención**

Los presentes inventores han realizado una investigación detallada de la captación celular de A1M, y en el transcurso de ello se encontró que la proteína se ubica principalmente en las mitocondrias en células dañadas, y puede proteger la estructura y función mitocondriales.

La presente invención se refiere al uso de A1M para prevenir o tratar enfermedades relacionadas con mitocondrias. Tal como se muestra en los ejemplos, la A1M tiene un efecto beneficioso sobre las células expuestas a cantidad excesiva de estrés y forzadas a producir ATP a altas tasas. En tales situaciones, la A1M puede mantener la producción de ATP de las células a pesar del estrés ambiental. Puesto que la A1M se une a una subunidad de los complejos de la cadena respiratoria, se prevé que la A1M pueda usarse en general para prevenir o tratar enfermedades que implican empeoramiento o daño de las mitocondrias o daño de (al menos partes de) la función mitocondrial.

Las enfermedades mitocondriales resultan de fallos de las mitocondrias, que son compartimentos especializados presentes en cada célula del cuerpo excepto los glóbulos rojos. Cuando las mitocondrias fallan, se genera cada vez menos energía dentro de la célula y se producirá lesión celular o incluso muerte celular. Si se repite este proceso por todo el cuerpo se compromete gravemente la vida de la persona a la que le esté ocurriendo esto.

Las enfermedades de las mitocondrias aparecen más a menudo en órganos que demandan mucha energía tal como el cerebro, corazón, hígado, músculos esqueléticos, riñón y el sistema endocrino y respiratorio.

Los síntomas de una enfermedad mitocondrial pueden incluir pérdida del control motor, dolor y debilidad muscular,

convulsiones, problemas visuales/de audición, enfermedades cardíacas, enfermedades hepáticas, trastornos gastrointestinales, dificultades para tragar y más.

Una enfermedad mitocondrial puede ser hereditaria o puede deberse a mutaciones espontáneas, que conducen a funciones alteradas de las proteínas o moléculas de ARN que residen normalmente en las mitocondrias.

Se ha encontrado que muchas enfermedades implican una deficiencia mitocondrial tal como una deficiencia del complejo I, II, III o IV o una deficiencia enzimática como, por ejemplo, deficiencia de piruvato deshidrogenasa. Sin embargo, la imagen es compleja y muchos factores pueden estar implicados en las enfermedades.

Hasta el momento, no están disponibles tratamientos curativos. Los únicos tratamientos disponibles son aquellos que pueden aliviar los síntomas y retardar la progresión de la enfermedad.

Por consiguiente, los hallazgos de los presentes inventores y descritos en el presente documento son muy importantes ya que demuestran el efecto beneficioso de la A1M sobre las mitocondrias con respecto tanto a mantener la estructura mitocondrial como a la capacidad de restaurar un defecto mitocondrial inducido.

La invención se refiere a la A1M para su uso en el tratamiento de una enfermedad mitocondrial. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedades en el sistema neurológico, el cerebro, corazón, hígado, músculos esqueléticos, riñón y el sistema endocrino y respiratorio. Muchas enfermedades pueden tener un defecto mitocondrial y por consiguiente, más enfermedades que las mencionadas en el presente documento también pueden ser relevantes para su tratamiento o prevención usando A1M.

La muerte celular, ya sea accidental, inducida por estrés o apoptótica, frecuentemente implica activación de la degradación celular y programas de reciclaje (7). Por tanto, la muerte celular es un proceso dependiente de energía que necesita funciones mitocondriales conservadas e intactas. Se sugiere que la eliminación autofagocítica de mitocondrias (mitofagia) desempeña un papel fundamental durante la muerte celular programada (23). Por tanto, hay una necesidad de mitocondrias funcionales durante la muerte celular programada, y aún no se entiende cómo se logra eso.

El complejo I, II, III y IV son complejos de proteínas incrustados en la membrana interna de la mitocondria. Se conocen como la cadena respiratoria y funcionan acoplando la transferencia de electrones entre un donador de electrones (tal como NADH) y un aceptor de electrones (tal como O<sub>2</sub>) con la transferencia de iones H<sup>+</sup>. El gradiente de protones electroquímico resultante a través de la membrana interna se usa para generar energía química en forma de adenosín trifosfato (ATP) mediante oxidación de glucosa, piruvato y NADH, que se producen todos en el citosol de la célula. Este proceso de respiración celular, también conocido como respiración aeróbica, depende de la presencia de oxígeno. Cuando el oxígeno es limitado, los productos glicolíticos se metabolizarán mediante fermentación anaeróbica, un proceso que es independiente de las mitocondrias. La producción de ATP a partir de glucosa es aproximadamente 13 veces mayor durante la respiración aeróbica en comparación con la fermentación.

Los presentes inventores han mostrado que la proteína A1M de bajo peso molecular del tejido y plasma humano se une a mitocondrias y más específicamente al complejo I mitocondrial. Además, se mostró que la proteína puede proteger las mitocondrias de la hinchazón inducida por hemo y la pérdida de la capacidad de producción de ATP. Basándose en estos hallazgos, se ha sugerido que A1M puede participar en el mecanismo de mantenimiento celular. La A1M puede ejercer esta protección mediante varios mecanismos diferentes, que actualmente no se conocen. Independientemente del mecanismo de acción, los estudios notificados en el presente documento indican claramente que la A1M tiene efectos beneficiosos para las mitocondrias y, por consiguiente, la A1M es una posible sustancia farmacológica para el tratamiento o la prevención de enfermedades mitocondriales. Además, la A1M puede usarse para la prevención y/o el tratamiento de efectos secundarios mitocondriales en pacientes sujetos a tratamiento con fármacos que provocan tales efectos secundarios. Los ejemplos incluyen tratamiento con estatinas, etc. Además, la A1M puede usarse en cosméticos, por ejemplo para tratar modificaciones de la piel relacionadas con la edad, o puede usarse en la prevención y/o el tratamiento de efectos mitocondriales no deseados provocados por sustancias o condiciones en el ambiente.

Tal como se mencionó anteriormente, la A1M se une a una subunidad del complejo I. Esto podría indicar que la A1M es especialmente adecuada para su uso en el tratamiento de enfermedades mitocondriales en las que hay un defecto en la cadena respiratoria. Más específicamente, podría indicar que la A1M es especialmente adecuada para su uso en el tratamiento de deficiencia del complejo I o enfermedades relacionadas con el complejo I.

Tal como se notifica en los ejemplos en el presente documento, se usó la inducción de apoptosis celular para imitar situaciones caracterizadas por lesiones celulares inducidas por estrés que provocan daño a la membrana plasmática y destrucción de la barrera externa de la célula. La A1M exógena se unió de manera intracelular con alta afinidad en cuanto las células pudieron internalizar yoduro de propidio (PI), lo que sugiere que el mecanismo de captación es una fuga pasiva de A1M del compartimento extracelular. Por tanto, la unión de A1M a las mitocondrias también debe producirse en células necróticas con membranas plasmáticas rotas. Está quedando cada vez más claro que muchas formas de muerte celular necrótica *in vivo* realmente pueden describirse como una serie regulada de

acontecimientos de disgregación celular dependiente de ATP, es decir, necrosis programada siguiendo rutas específicas denominadas necroptosis (7, 46). Por tanto, un posible papel para la A1M es participar en la conservación de la función mitocondrial tanto en células apoptóticas como necroptóticas y posiblemente otros tipos de células necróticas durante la muerte celular no autofágica, con el fin de determinar la disponibilidad de ATP para los procesos de degradación celular dependiente de energía.

No se conoce el mecanismo de protección de la estructura y función mitocondriales. A la A1M se le ha atribuido una función antioxidante basada en su reductasa, y propiedades de unión de hemo y radicales (2, 53). Por tanto, puede especularse que estas propiedades están implicadas en los efectos protectores. Alternativamente, puesto que la A1M parece ser un componente endógeno de al menos uno de los complejos de proteínas grandes (complejo I) puede tener un efecto estructuralmente estabilizante sobre el complejo. Durante la apoptosis, la necroptosis y otras formas de muerte celular, la unión adicional de A1M exógena puede ser necesaria para mantener la estructura y función físicoquímicas del complejo de proteínas respiratorio. Otra posibilidad es que la unión de A1M al complejo I pueda tener efectos beneficiosos sobre otros componentes de la membrana interna mitocondrial, tal como proteínas de poros o lípidos de membrana.

Se investigaron las interacciones entre A1M y mitocondrias y se observó una unión específica en varios tipos celulares diferentes, es decir, células sanguíneas humanas de origen linfocítico, mielocítico y leucocítico, queratinocitos humanos, y mitocondrias de hígado de ratón aisladas. Tomados juntos, los resultados sugieren que las interacciones y los efectos protectores estudiados en este caso pueden generalizarse a todos los tipos de células.

Tal como se notifica en el presente documento, se encontró que la A1M interacciona con cuatro proteínas diferentes: la subunidad NDUFB1 en la parte hidrófoba del complejo NADH deshidrogenasa (45), N-acetilglucosamina cinasa (18), la proteína de unión a ARNnp LSm5 (40), y un antígeno canceroso, NY-CO-3 (42). Ninguna de las cuatro proteínas era un falso positivo, es decir, que interacciona con la proteína de fusión cebo de unión a ADN o con cualquier proteína fusionada a ella. Por tanto, se consideraron los candidatos como proteínas de interacción con A1M verdaderas en el sistema de doble híbrido de levadura. Considerando que ocho de los once clones aislados mediante el sistema de doble híbrido de levadura eran la misma subunidad del complejo I, se consideró esta proteína como la más interesante de las proteínas y por tanto se eligió como diana de investigaciones adicionales. Se confirmó también la unión a mitocondrias mediante enfoques metodológicos alternativos y pudo atribuirse un papel funcional de la asociación como compatible con la función antioxidante de la A1M. Sin embargo, puede especularse sobre las implicaciones fisiológicas de la unión de A1M a N-acetilglucosamina cinasa, la proteína de unión a ARNnp LSm5 y NY-CO-3. Estas proteínas se ubican en el citosol, núcleo y membrana plasmática, respectivamente, y el papel de la unión a estas proteínas puede ser ubicar la A1M internalizada en otros compartimentos celulares además de las mitocondrias. Otra posibilidad es que la unión a estas tres proteínas refleje otras funciones de A1M no relacionadas con antioxidación y eliminación de radicales.

La A1M es un miembro de la familia de las proteínas lipocalinas. Las lipocalinas constituyen un grupo funcionalmente diverso de aproximadamente 50 proteínas de bacterias, plantas y animales, que tienen una similitud de secuencia de aminoácidos habitualmente de alrededor del 20-25% y comparten determinadas características comunes estructurales que indican un origen evolutivo común (11, 12, 51). De manera interesante, dos lipocalinas encontradas en plantas y algas verdes, violaxantina desepoxidasa (VDE) y zeaxantina epoxidasa (ZDE), se ubican en las membranas de los tilacoides de cloroplastos, los orgánulos fotosintéticos que producen ATP de plantas, en los que se asocian con el sistema captador de luz II y participan en el sistema de fotoprotección de xantofila (revisado en (14)). Hay un paralelismo obvio entre el ciclo de protección de violaxantina y los resultados en este documento: la presencia de un sistema de protección basado en lipocalinas en los orgánulos de conversión de energía tanto de plantas como de animales. Hipotetizando que las mitocondrias y cloroplastos tienen un especie primitiva procariota o eucariota común (véanse (15, 30, 50)), puede especularse que estos dos sistemas de lipocalinas están relacionados evolutivamente.

Cuando se somete una célula a una lesión fatal se degradará en último instancia y sus componentes se reciclarán. Esto es habitualmente un proceso que consume energía y altamente complejo que es necesario controlar de manera meticulosa con el fin de proteger el ambiente circundante, es decir, tejido y células vecinas, frente a un daño adicional. La conservación y el mantenimiento de la maquinaria de energía mitocondrial durante este proceso son vitales. Se muestra que la A1M de glicoproteína de plasma y tejido puede tener un papel fundamental en el mantenimiento de la producción de energía mitocondrial y ayudar simultáneamente a la cadena respiratoria y evitar de ese modo reacciones destructivas no deseadas con tejido sano. Por tanto, estos hallazgos sugieren un mecanismo novedoso de mantenimiento de la homeostasis mitocondrial.

En el presente contexto el término "alfa-1-microglobulina" pretende cubrir la alfa-1-microglobulina tal como se identifica en SEQ ID NO: 1 (A1M humana) así como SEQ ID NO: 2 (A1M recombinante humana) así como homólogos, fragmentos o variantes de las mismas que tienen actividades terapéuticas similares. En un aspecto preferido, la alfa-1-microglobulina es según SEQ ID NO: 1 ó 2 tal como se identifica en el presente documento. En la lista de secuencias se proporciona la lista de secuencias de la secuencia de aminoácidos de A1M humana y A1M recombinante humana (SEQ ID NO 1 y 2, respectivamente) y las correspondientes secuencias de nucleótidos (SEQ

ID NO 3 y 4, respectivamente).

Tal como se mencionó anteriormente también pueden usarse homólogos de A1M según la descripción en el presente documento. En teoría puede usarse A1M de todas las especies incluyendo la más primitiva encontrada hasta ahora, que es de pez (platija). La A1M también está disponible en forma aislada de ser humano, rata, ratón, conejo, cobaya, vaca y platija.

Considerando los homólogos, variantes y fragmentos de A1M, se han identificado los siguientes como partes importantes de la proteína:

Y22 (tirosina, pos. 22, pares de bases 64-66)

C34 (cisteína, posición 34, pares de bases 100-102)

K69 (lisina, pos. 69, pares de bases 205-207)

K92 (lisina, pos. 92, pares de bases 274-276)

K118 (lisina, pos. 118, pares de bases 352-354)

K130 (lisina, pos. 130, pares de bases 388-390)

Y132 (tirosina, pos. 132, pares de bases 394-396)

L180 (leucina, pos. 180, pares de bases 538-540)

I181 (isoleucina, pos. 181, pares de bases 541-543)

P182 (prolina, pos. 182, pares de bases 544-546)

R183 (arginina, pos. 183, pares de bases 547-549)

(La numeración de aminoácidos y nucleótidos a lo largo de todo el documento se refiere a SEQ ID 1 y 3; si es otra A1M de otra especie, se emplean análogos de A1M o secuencias recombinantes de los mismos, un experto en la técnica sabrá cómo identificar los aminoácidos del/de los sitio(s) activo(s) o sitio(s) responsable(s) de la actividad enzimática).

En particular se ha observado que el efecto protector celular de A1M depende del grupo tiolilo libre de la cadena lateral C34 y se regula por los residuos K92, K118 y K130. Por tanto, se cree que los análogos de A1M que contienen estas partes de la proteína y/o configurados de manera similar tienen efectos similares a los de la A1M y por tanto, están abarcados por la presente invención.

La A1M humana está sustituida con oligosacáridos en tres posiciones, dos de tipo complejo sialilados, probablemente de hidratos de carbono diantenarios unidos a Asn17 y Asn96 y un oligosacárido más sencillo unido a Thr5. El contenido en hidratos de carbonos de proteínas A1M de diferentes especies varía mucho, aunque, oscilando de nada de glicosilación en absoluto en *Xenopus leavis* pasando por un espectro de diferentes patrones de glicosilación. Sin embargo, un sitio de glicosilación, correspondiente a Asn96 en el hombre, se conserva en mamíferos, lo que sugiere que este hidrato de carbono específico puede ser funcionalmente importante.

La A1M es de color amarillo pardo cuando se purifica a partir de plasma u orina. El color está provocado por compuestos heterogéneos unidos de manera covalente a diversos grupos laterales de aminoácidos ubicados principalmente en la entrada en la bolsa. Estas modificaciones representan probablemente los productos de degradación oxidados de oxidantes orgánicos atrapados de manera covalente por A1M *in vivo*, por ejemplo radicales hemo, quinurenina y tirosilo.

La A1M también es heterogénea en carga y tamaño y las moléculas de A1M de color más altamente marrón están cargadas más negativamente. La probable explicación para la heterogeneidad es que diferentes grupos laterales se modifican en un grado variable con diferentes radicales, y que las modificaciones alteran la carga neta de la proteína. Se han ubicado las sustancias coloreadas unidas de manera covalente en Cys34 y Lys92, Lys118 y Lys130, la última con masas moleculares de entre 100 y 300 Da. Se encontró el metabolito de triptófano quinurenina unido de manera covalente a residuos lisilo en A1M de orina de pacientes en hemodiálisis y parece ser la fuente del color marrón de la proteína en este caso. Fragmentos oxidados del radical sintético ABTS (ácido 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) estaban unidos a las cadenas laterales de Y22 e Y132.

C34 es el centro reactivo de A1M. Se vuelve muy electronegativo, lo que significa que tiene un alto potencial para donar electrones, por la proximidad de las cadenas laterales cargadas positivamente de K69, K92, K118 y K130, que

inducen una desprotonización del grupo tiol de C34. Los datos preliminares muestran que C34 es uno de los grupos más electronegativos conocidos.

5 Teóricamente, los aminoácidos que caracterizan las propiedades enzimáticas y no enzimáticas únicas de A1M (C34, Y22, K92, K118, K130, Y132, L180, I181, P182, R183), que se describirán en más detalle a continuación, pueden disponerse en una configuración tridimensional similar en otro entramado, por ejemplo una proteína con el mismo plegamiento global (otra lipocalina) o una molécula orgánica o inorgánica completamente artificial tal como un polímero de plástico, una nanopartícula o un polímero metálico.

10 Por consiguiente, se prefieren homólogos, fragmentos o variantes que comprenden una estructura que incluye el centro reactivo y sus alrededores tal como se describió anteriormente.

15 Pueden realizarse modificaciones y cambios en la estructura de los polipéptidos de esta descripción y aún dan como resultado una molécula que tiene características similares a las del polipéptido (por ejemplo, una sustitución de aminoácidos conservativa). Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una secuencia sin pérdida apreciable de actividad. Debido a que son la capacidad interactiva y la naturaleza de un polipéptido las que definen la actividad funcional biológica del polipéptido, pueden hacerse determinadas sustituciones de secuencia de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos y aún así obtener un polipéptido con propiedades similares.

20 Al hacer tales cambios, puede considerarse el índice hidropático de aminoácidos. La importancia del índice hidropático de aminoácidos a la hora de conferir una función biológica interactiva a un polipéptido se entiende en general en la técnica. Se sabe que pueden sustituirse determinados aminoácidos por otros aminoácidos que tienen una puntuación o índice hidropático similar y aún dar como resultado un polipéptido con actividad biológica similar. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en sus características de hidrofobicidad y carga. Los índices son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

30 Se cree que el carácter hidropático relativo del aminoácido determina la estructura secundaria del polipéptido resultante, que a su vez define la interacción del polipéptido con otras moléculas, tales como enzimas, sustratos, receptores, anticuerpos, antígenos y similares. Se conoce en la técnica que un aminoácido puede sustituirse por otro aminoácido que tiene un índice hidropático similar y obtener aún un polipéptido funcionalmente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de  $\pm 2$ , se prefieren particularmente los que están dentro de  $\pm 1$  e incluso se prefieren más particularmente los que están dentro de  $\pm 0,5$ . La sustitución de aminoácidos similares también puede realizarse basándose en hidrofiliidad, particularmente cuando se pretende que el péptido o polipéptido equivalente biológicamente funcional creado de ese modo sea para su uso en realizaciones inmunológicas. Se han asignando los siguientes valores de hidrofiliidad a residuos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0  $\pm$  1); glutamato (+3,0  $\pm$  1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); prolina (-0,5  $\pm$  1); treonina (-0,4); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tiene un valor de hidrofiliidad similar y obtener aún un polipéptido biológicamente equivalente y, en particular, uno inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de  $\pm 2$ , se prefieren particularmente los que están dentro de  $\pm 1$  e incluso se prefieren más particularmente los que están dentro de  $\pm 0,5$ .

50 Tal como se resumió anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan en general en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Los expertos en la técnica conocen bien las sustituciones a modo de ejemplo que toman en consideración una o más de las características anteriores e incluyen, pero no se limitan a (residuo original: sustitución a modo de ejemplo): (Ala: Gly, Ser), (Arg: Lys), (Asn: Gln, His), (Asp: Glu, Cys, Ser), (Gln: Asn), (Glu: Asp), (Gly: Ala), (His: Asn, Gln), (Ile: Leu, Val), (Leu: Ile, Val), (Lys: Arg), (Met: Leu, Tyr), (Ser: Thr), (Thr: Ser), (Trp: Tyr), (Tyr: Trp, Phe) y (Val: Lle, Leu). Por tanto las realizaciones de esta divulgación contemplan equivalentes funcionales o biológicos de un polipéptido tal como se expuso anteriormente. En particular, las realizaciones de los polipéptidos pueden incluir variantes que tienen aproximadamente el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% y el 95% de identidad de secuencia con el polipéptido de interés.

60 En el presente contexto, la homología entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de ácido nucleico se describe por el parámetro "identidad". Las alineaciones de secuencias y el cálculo de puntuaciones de homología pueden realizarse usando una alineación de Smith-Waterman completa, útil para alineaciones tanto de proteína como de ADN. Las matrices de puntuación por defecto BLOSUM50 y la matriz de identidad se usan para las alineaciones de proteína y ADN respectivamente. La penalización para el primer residuo en un hueco es de -12 para proteínas y de -16 para ADN, mientras que la penalización para residuos adicionales en un hueco es de -2 para proteínas y -4 para ADN. La alineación puede realizarse con el paquete FASTA versión v20u6.

Múltiples alineaciones de secuencias de proteínas pueden realizarse usando "ClustalW". Múltiples alineaciones de secuencias de ADN pueden realizarse usando la alineación de proteína como molde, reemplazando los aminoácidos con el correspondiente codón de la secuencia de ADN.

5 Alternativamente puede usarse un software diferente para alinear secuencias de aminoácidos y secuencias de ADN. La alineación de dos secuencias de aminoácidos se determina por ejemplo usando el programa Needle del paquete EMBOSS (<http://emboss.org>) versión 2.8.0. El programa Needle implementa el algoritmo de alineación global descrito. La matriz de sustitución usada es BLOSUM62, la penalización por apertura de hueco es de 10 y la penalización por extensión de hueco es de 0,5.

10 El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos; por ejemplo SEQ ID NO: 1 y una secuencia de aminoácidos diferente (por ejemplo SEQ ID NO: 2) se calcula como el número de coincidencias exactas en una alineación de las dos secuencias, dividido entre la longitud de la "SEQ ID NO: 1" o la longitud de la "SEQ ID NO: 2", cualquiera que sea la más corta. El resultado se expresa en la identidad en porcentaje.

15 Una coincidencia exacta se produce cuando las dos secuencias tienen residuos de aminoácido idénticos en las mismas posiciones de la superposición.

20 Si es relevante, el grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse mediante el método Wilbur-Lipman usando el software LASER-GENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineación múltiples: penalización de hueco de 10 y penalización por longitud de hueco de 10.

25 Los parámetros de alineación por pares son Ktuple=3, penalización de hueco=3, y ventanas=20. En una realización particular, el porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido con, o con respecto a, aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se determina i) alineando las dos secuencias de aminoácidos usando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización por apertura de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,5; ii) contando el número de coincidencias exactas en la alineación; iii) dividiendo el número de coincidencias exactas entre la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos, y iv) convirtiendo el resultado de la división de iii) en porcentaje. El porcentaje de identidad con respecto a, o con, otras secuencias de la invención se calcula de manera análoga.

35 A modo de ejemplo, una secuencia de polipéptido puede ser idéntica a la secuencia de referencia, es decir ser idéntica al 100%, o puede incluir hasta un determinado número entero de alteraciones de aminoácido en comparación con la secuencia de referencia de modo que el % de identidad es menos del 100%. Tales alteraciones se seleccionan de: al menos una delección, sustitución (incluyendo sustitución conservativa y no conservativa) o inserción de aminoácido, y en las que dichas alteraciones pueden producirse en las posiciones amino o carboxilo-terminales de la secuencia de polipéptido de referencia o en cualquier sitio entre las posiciones terminales de las mismas, intercaladas o bien individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia, o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

45 Las variantes de aminoácidos conservativas también pueden comprender residuos de aminoácido que no se producen de manera natural. Los aminoácidos que no se producen de manera natural incluyen, sin limitación, trans-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, cis-4-hidroxioprolina, trans-4-hidroxioprolina, N-metil-glicina, alo-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitro-glutamina, homoglutamina, ácido pipercolico, ácido tiazolidincarboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, terc-leucina, norvalina, 2-azafenil-alanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. Se conocen en la técnica varios métodos para incorporar residuos de aminoácido que no se producen de manera natural en proteínas. Por ejemplo, puede emplearse un sistema *in vitro* en el que se suprimen mutaciones sin sentido usando ARNt supresores químicamente aminoacilados. Se conocen en la técnica métodos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt. Se llevan a cabo transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido en un sistema libre de células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas disponibles comercialmente y otros reactivos. Se purifican proteínas mediante cromatografía. En un segundo método, la traducción se lleva a cabo en *Xenopus oocytes* mediante microinyección de ARNm mutado y ARNt supresores químicamente aminoacilados. Dentro de un tercer método, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que va a reemplazarse (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del/de los aminoácido(s) que no se produce(n) de manera natural deseado(s) (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido que no se produce de manera natural se incorpora en la proteína en lugar de su homólogo natural. Los residuos de aminoácido que se producen de manera natural pueden convertirse en especies que no se producen de manera natural mediante modificación química *in vitro*. La modificación química puede combinarse con mutagénesis dirigida a un sitio para expandir adicionalmente el rango de sustituciones. Las estructuras químicas alternativas que proporcionan una estructura tridimensional suficiente para soportar las propiedades antioxidantes de A1M pueden proporcionarse mediante otras tecnologías por ejemplo armazones artificiales, sustituciones de aminoácidos y similares. Además, las estructuras que imitan los sitios activos de A1M tal como se listan anteriormente y se representan en las figuras 3 y 6 se contemplan como que tienen la misma función que A1M.

*A1M para su uso en enfermedades relacionadas con mitocondrias específicas*

Más específicamente, la invención se refiere a A1M para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con mitocondrias seleccionada de lo siguiente:

- 5 • enfermedad de Alpers (poliodistrofia infantil progresiva)
- síndrome de Barth (cardiomiopatía infantil letal)
- 10 • defectos de la beta-oxidación
- cardiomiopatía
- deficiencia de carnitina-acilcarnitina
- 15 • deficiencia de carnitina
- síndromes de deficiencia de creatina (síndromes de deficiencia de creatina cerebral (CCDS) incluye: deficiencia de guanidinoacetato metiltransferasa (deficiencia de GAMT), deficiencia de L-arginina:glicina amidinotransferasa (deficiencia de AGAT) y deficiencia de transportador de creatina relacionada con SLC6A8 (deficiencia de SLC6A8).
- 20 • deficiencia de la coenzima Q10
- deficiencia del complejo I (deficiencia de NADH deshidrogenasa (NADH-CoQ reductasa))
- 25 • deficiencia del complejo II (deficiencia de succinato deshidrogenasa)
- deficiencia del complejo III (deficiencia de ubiquinona-citocromo c oxidorreductasa)
- 30 • deficiencia del complejo IV/deficiencia de COX (la deficiencia de citocromo c oxidasa se provoca por un defecto en el complejo IV de la cadena respiratoria)
- deficiencia del complejo V (deficiencia de ATP sintasa)
- 35 • deficiencia de COX
- CPEO (síndrome de oftalmoplejía externa progresiva crónica)
- deficiencia de CPT I
- 40 • deficiencia de CPT II
- ataxia de Friedreich (FRDA o FA)
- 45 • encefalomiopatía
- aciduria glutárica tipo II
- KSS (síndrome de Kearns-Sayre)
- 50 • acidosis láctica
- LCAD (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga)
- 55 • LCHAD
- enfermedad o síndrome de Leigh (encefalomielopatía necrotizante subaguda)
- LHON (neuropatía óptica hereditaria de Leber)
- 60 • enfermedad de Luft
- MCAD (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media)
- 65 • MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a accidente cerebrovascular)



- MERRF (epilepsia mioclónica y enfermedad de fibras rojas rasgadas)
- MIRAS (síndrome atáxico mitocondrial recesivo)
- 5 • citopatía mitocondrial
- depleción de ADN mitocondrial
- encefalopatía mitocondrial incluye: encefalomiopatía, encefalomielopatía
- 10 • miopatía mitocondrial
- MNGIE (trastorno mioneurogastrointestinal y encefalopatía)
- 15 • NARP (neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa)
- síndrome de Pearson
- deficiencia de piruvato carboxilasa
- 20 • deficiencia de piruvato deshidrogenasa
- mutaciones de POLG
- 25 • deficiencias de la cadena respiratoria
- SCAD (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta)
- SCHAD
- 30 • VLCAD (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga)

35 Con referencia a la información de la página web de *United Mitochondrion Disease Foundation*, algunas de las enfermedades mencionadas anteriormente se discuten en más detalle a continuación:

40 *Deficiencia del complejo 1:* En el interior de la mitocondria hay un grupo de proteínas que llevan electrones a lo largo de cuatro reacciones en cadena (complejos I-IV), que dan como resultado la producción de energía. Esta cadena se conoce como la cadena de transporte de electrones. Un quinto grupo (complejo V) genera la ATP. Juntas, la cadena de transporte de electrones y la ATP sintasa forman la cadena respiratoria y el proceso completo se conoce como fosforilación oxidativa u OXPHOS.

45 El complejo I, la primera etapa en esta cadena, es el sitio más común para anomalías mitocondriales, representando hasta un tercio de las deficiencias de la cadena respiratoria. Presentándose a menudo en el nacimiento o en la infancia temprana, la deficiencia del complejo I es habitualmente un trastorno neurodegenerativo progresivo y es responsable de una variedad de síntomas clínicos, particularmente en órganos y tejidos que requieren altos niveles de energía, tales como cerebro, corazón, hígado y músculos esqueléticos. Se han asociado varios trastornos mitocondriales específicos con deficiencia del complejo I incluyendo: neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), MELAS, MERRF y síndrome de Leigh (LS).

50 Hay tres formas principales de deficiencia del complejo I:

- 55 i) Trastorno multisistémico infantil fatal - caracterizado por falta de tono muscular, retraso en el desarrollo, enfermedad cardíaca, acidosis láctica e insuficiencia respiratoria.
- ii) Miopatía (enfermedad muscular) - comienza en la infancia o en la edad adulta, y caracterizada por debilidad o intolerancia al ejercicio.
- 60 iii) Encefalomiopatía mitocondrial (enfermedad cerebral y muscular) - comienza en la infancia o en la edad adulta e implica combinaciones de síntomas variables que pueden incluir: parálisis muscular del ojo, retinopatía pigmentaria (cambios de color de la retina con pérdida de visión), pérdida de audición, neuropatía sensorial (daño en el nervio que implica los órganos sensoriales), convulsiones, demencia, ataxia (coordinación muscular anómala) y movimientos involuntarios. Esta forma de deficiencia del complejo I puede provocar síndrome de Leigh y MELAS.

65 La mayor parte de los casos de deficiencia del complejo I resultan de herencia recesiva autosómica (combinación de genes nucleares defectuosos tanto de la madre como del padre). Con menos frecuencia, el trastorno se hereda de la madre o es esporádico y el defecto genético está en el ADN mitocondrial.

5 Tratamiento: Como con todas las enfermedades mitocondriales, actualmente no hay cura para la deficiencia del complejo I. Una variedad de tratamientos, que pueden o no ser eficaces, puede incluir terapias metabólicas tales como: riboflavina, tiamina, biotina, coenzima Q10, carnitina y la dieta cetogénica. Las terapias para la forma multisistémica infantil no han sido satisfactorias.

La evolución clínica y el pronóstico para los pacientes con deficiencia del complejo I son sumamente variables y pueden depender del defecto genético específico, la edad de aparición, los órganos implicados y otros factores.

10 *Deficiencia del complejo III*: Los síntomas incluyen cuatro formas principales:

i) Encefalomiopatía infantil fatal, acidosis láctica congénita, hipotensión, postura distrófica, convulsiones y coma. Fibras rojas rasgadas comunes.

15 ii) Encefalomiopatías de inicio tardío (de la infancia a la vida adulta): diversas combinaciones de debilidad, baja estatura, ataxia, demencia, pérdida de audición, neuropatía sensorial, retinopatía pigmentaria y signos piramidales. Fibras rojas rasgadas comunes. Posible acidosis láctica.

20 iii) Miopatía, con intolerancia al ejercicio que evoluciona a debilidad fija. Fibras rojas rasgadas comunes. Posible acidosis láctica.

iv) Cardiomiopatía histiocitoide infantil.

25 *Deficiencia del complejo IV/Deficiencia de COX*: Los síntomas incluyen dos formas principales:

1. Encefalomiopatía: Normalmente normal durante los primeros 6 a 12 meses de vida y luego muestra regresión de desarrollo, ataxia, acidosis láctica, atrofia óptica, oftalmoplejía, nistagmo, distonía, signos piramidales y problemas respiratorios. Convulsiones frecuentes. Puede provocar síndrome de Leigh.

30 2. Miopatía: Dos variantes principales:

1. Miopatía infantil fatal: puede comenzar poco después del nacimiento e ir acompañada de hipotensión, debilidad, acidosis láctica, fibras rojas rasgadas, insuficiencia respiratoria y problemas renales.

35 2. Miopatía infantil benigna: puede comenzar poco después del nacimiento e ir acompañada de hipotensión, debilidad, acidosis láctica, fibras rojas rasgadas, problemas respiratorios, pero (si el niño sobrevive) ir seguida de una mejoría espontánea.

40 KSS (síndrome de Kearns-Sayre): El KSS es una enfermedad mitocondrial multisistémica lentamente progresiva que a menudo comienza con la caída de los párpados (ptosis). Otros músculos del ojo eventualmente llegan a estar implicados, dando como resultado parálisis del movimiento del ojo. La degeneración de la retina habitualmente provoca dificultad para ver en ambientes con poca luz.

45 El KSS se caracteriza por tres características principales:

- aparición típica antes de los 20 años de edad aunque puede producirse en la lactancia o en la edad adulta
- parálisis de músculos del ojo específicos (denominada oftalmoplejía externa progresiva crónica - CPEO)
- degeneración de la retina que provoca acumulación anómala de material pigmentado (coloreado) (retinopatía pigmentaria).

Además, uno o más de los siguientes estados está presente:

- 55 • bloqueo de señales eléctricos en el corazón (defectos de la conducción cardíaca)
- proteína del líquido cefalorraquídeo elevada
- 60 • incoordinación de movimientos (ataxia).

Los pacientes con KSS también pueden tener problemas tales como sordera, demencia, disfunción renal y debilidad muscular. Anomalías endocrinas incluyendo retardo del crecimiento, baja estatura o diabetes también pueden ser evidentes.

65 El KSS es un trastorno raro. Se provoca habitualmente por una delección (pérdida) grande simple de material

genético dentro del ADN de las mitocondrias (ADNmt), en vez de en el ADN del núcleo celular. Estas deleciones, de las que hay más de 150 especies, surgen normalmente de manera espontánea. Con menos frecuencia, la mutación se transmite por la madre.

5 Como con todas las enfermedades mitocondriales, no hay cura para el KSS.

Los tratamientos se basan en los tipos de síntomas y órganos implicados, y pueden incluir: coenzima Q10, insulina para diabetes, fármacos cardíacos y un marcapasos cardíaco que puede salvar vidas. Puede considerarse la intervención quirúrgica para la caída de los párpados, pero debe llevarse a cabo por especialistas en centros quirúrgicos oftálmicos.

El KSS es lentamente progresivo y el pronóstico varía dependiendo de la gravedad. La muerte es común en la tercera o cuarta década y puede deberse a fallos orgánicos.

15 *Enfermedad o síndrome de Leigh* (encefalomielopatía necrotizante subaguda): Síntomas: convulsiones, hipotensión, fatiga, nistagmo, escasos reflejos, dificultades para comer y tragar, problemas respiratorios, escasa función motora y ataxia.

20 Causas: deficiencia de piruvato deshidrogenasa, deficiencia del complejo I, deficiencia del complejo II, deficiencia del complejo IV/COX, NARP.

La enfermedad de Leigh es un trastorno neurometabólico progresivo con una aparición general en la lactancia o la niñez, a menudo tras una infección viral, pero también puede producirse en adolescentes y adultos. Se caracteriza en MRI por lesiones necrotizantes visibles (tejido muerto o que está muriendo) en el cerebro, particularmente en el mesencéfalo y troncoencéfalo.

El niño a menudo parece normal en el nacimiento, pero normalmente comienza a presentar síntomas en el plazo de pocos meses a dos años de edad, aunque el tiempo puede ser mucho más temprano o más tarde. Los síntomas iniciales pueden incluir la pérdida de habilidades básicas tales como succión, control de la cabeza, andar y hablar. Esto puede ir acompañado de otros problemas tales como irritabilidad, pérdida de apetito, vómitos y convulsiones. Puede haber periodos de fuerte descenso o restablecimiento temporal de algunas funciones. Eventualmente, el niño también puede tener complicaciones cardíacas, renales, de la visión y respiratorias.

Hay más de un defecto que provoca la enfermedad de Leigh. Esto incluye una deficiencia en piruvato deshidrogenasa (PDHC), y defectos de la enzima de la cadena respiratoria - complejos I, II, IV y V. Dependiendo del defecto, el modo de herencia puede ser dominante ligado a cromosoma X (defecto del cromosoma X y la enfermedad se produce habitualmente en hombres solo), recesivo autosómico (heredado de genes tanto de la madre como del padre) y materno (de la madre solo). También puede haber casos espontáneos que no son heredados en absoluto.

No hay cura para la enfermedad de Leigh. Los tratamientos implican en general variaciones de terapias con vitaminas y complementos, a menudo en una combinación "cóctel" y son sólo parcialmente eficaces. Diversos sitios de recursos incluyen el posible uso de: tiamina, coenzima Q10, riboflavina, biotina, creatina, succinato e idebenona. También están probándose fármacos experimentales, tales como dicloroacetato (DCA) en algunas clínicas. En algunos casos, puede ordenarse una dieta especial y debe monitorizarse por parte de un dietista con conocimientos de trastornos metabólicos.

El pronóstico para la enfermedad de Leigh es malo. Dependiendo del defecto, los individuos normalmente viven desde pocos años hasta la mitad de la adolescencia. Los diagnosticados con síndrome similar a Leigh o quien no presenta síntomas hasta la edad adulta tiende a vivir más.

55 *MELAS* (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a accidente cerebrovascular): Síntomas: baja estatura, convulsiones, episodios similares a accidente cerebrovascular con déficits neurológicos focalizados, dolores de cabeza recurrentes, regresión cognitiva, progresión de la enfermedad, fibras rojas rasgadas.

Causa: Mutaciones puntuales de ADN mitocondrial: A3243G (la más común). MELAS - Miopatía mitocondrial (debilidad muscular), encefalopatía (enfermedad cerebral y del sistema nervioso central), acidosis láctica (acumulación de un producto de residuo celular) y episodios similares a accidente cerebrovascular (parálisis parcial, pérdida parcial de la visión u otras anomalías neurológicas).

MELAS es un trastorno neurodegenerativo progresivo con aparición típica entre las edades de 2 y 15, aunque puede producirse en la lactancia o hasta en la edad adulta. Los síntomas iniciales pueden incluir episodios similares a accidente cerebrovascular, convulsiones, migrañas y vómitos recurrentes.

65 Habitualmente, el paciente parece normal durante la lactancia, aunque la baja estatura es común. Menos comunes son los síntomas en la lactancia temprana que pueden incluir retraso en el desarrollo, dificultades de aprendizaje o

trastorno por déficit de atención. La intolerancia al ejercicio, debilidad de las extremidades, pérdida de audición y diabetes también pueden preceder a la aparición de los episodios similares a accidente cerebrovascular.

5 Los episodios similares a accidente cerebrovascular, a menudo acompañados de convulsiones, son el síntoma distintivo de MELAS y provocan parálisis parcial, pérdida de la visión y defectos neurológicos focales. Los defectos acumulativos graduales de estos episodios a menudo dan como resultado combinaciones variables de pérdida de habilidades motoras (habla, movimiento y alimentación), sensación alterada (pérdida de la visión y pérdida de las sensaciones corporales) y empeoramiento mental (demencia). Los pacientes con MELAS también pueden padecer  
10 síntomas adicionales incluyendo: debilidad muscular, disfunción de nervios periféricos, diabetes, pérdida de audición, problemas cardíacos y renales y anomalías digestivas. El ácido láctico habitualmente se acumula a altos niveles en la sangre, el líquido cefalorraquídeo o ambos.

15 MELAS se hereda de la madre debido a un defecto en el ADN dentro de las mitocondrias. Hay al menos 17 mutaciones diferentes que pueden provocar MELAS. De lejos la más prevalente es la mutación A3243G, que es responsable de aproximadamente el 80% de los casos.

20 No hay cura o tratamiento específico para MELAS. Aunque ensayos clínicos no han demostrado su eficacia, los tratamientos generales pueden incluir terapias metabólicas tales como: CoQ10, creatina, filoquinona y otras vitaminas y complementos. Pueden requerirse fármacos tales como medicamentos contra las convulsiones e insulina para el tratamiento de síntomas adicionales. Algunos pacientes con disfunción muscular pueden beneficiarse de ejercicio supervisado moderado. En determinados casos, otras terapias que pueden recomendarse incluyen dicloroacetato (DCA) y menadiona, aunque estos no se usan de manera rutinaria debido a su potencial para tener efectos secundarios perjudiciales.

25 El pronóstico para MELAS es malo. Normalmente, la edad de muerte es de entre 10 y 35 años, aunque algunos pacientes pueden vivir más. La muerte puede venir como resultado de pérdida de masa corporal general debido a demencia progresiva y debilidad muscular, o complicaciones a partir de otros órganos afectados tales como corazón o riñones.

30 MERRF es un síndrome multisistémico progresivo que habitualmente comienza en la infancia, pero la aparición puede producirse en la edad adulta. La tasa de progresión varía ampliamente. La aparición y el grado de los síntomas pueden diferir entre hermanos afectados.

35 Las características clásicas de MERRF incluyen:

- mioclonía (espasmos musculares breves, repentinos, de contracción) – el síntoma más característico
- convulsiones epilépticas
- 40 • ataxia (coordinación alterada)
- fibras rojas rasgadas (una anomalía microscópica característica observada en la biopsia muscular de pacientes con MERRF y otros trastornos mitocondriales). Los síntomas adicionales pueden incluir: pérdida de audición, acidosis láctica (nivel de ácido láctico elevado en la sangre), baja estatura, intolerancia al ejercicio, demencia, defectos  
45 cardíacos, anomalías oculares y empeoramiento de la habla.

Aunque unos pocos casos de MERRF son esporádicos, la mayoría de los casos se heredan de la madre debido a una mutación dentro de las mitocondrias. La mutación de MERRF más común es A8344G, que representa más del 80% de los casos (artículo de GeneReview). Se ha notificado que otras cuatro mutaciones de ADN mitocondrial provocan MERRF. Aunque una madre transmitirá su mutación de MERRF a todos sus hijos, algunos puede que  
50 nunca presenten síntomas.

55 Como con todos los trastornos mitocondriales, no hay cura para MERRF. Las terapias pueden incluir la coenzima Q10, L-carnitina y diversas vitaminas, a menudo en una combinación "coctel". El tratamiento de las convulsiones habitualmente requiere fármacos anticonvulsivos. También pueden ser necesarios medicamentos para el control de otros síntomas.

60 El pronóstico para MERRF varía ampliamente dependiendo de la edad de aparición, el tipo y la gravedad de síntomas, los órganos implicados y otros factores.

*Depleción de ADN mitocondrial:* Los síntomas incluyen tres formas principales:

1. Miopatía congénita: Debilidad neonatal, hipotensión que requiere ventilación asistida, posible disfunción renal. Acidosis láctica grave. Fibras rojas rasgadas prominentes. La muerte debido a insuficiencia respiratoria  
65 habitualmente se produce antes de un año de edad.

2. Miopatía infantil: Tras el desarrollo temprano normal hasta un año de edad, aparece debilidad y empeora rápidamente, provocando insuficiencia respiratoria y muerte normalmente en el plazo de pocos años.

5 3. Hepatopatía: Hígado aumentado y fallo renal intratable, miopatía. Acidosis láctica grave. La muerte es normal en el plazo del primer año.

10 La invención se refiere al uso de alfa-1-microglobulina en el tratamiento de una enfermedad relacionada con mitocondrias. La enfermedad puede ser una cualquiera de las enfermedades especificadas en el presente documento o bien como una única enfermedad o bien en cualquier combinación de enfermedades especificadas en el presente documento. Por ejemplo, la invención se refiere al uso de alfa-1-microglobulina en el tratamiento de una de las enfermedades mencionadas en el presente documento o en el tratamiento de una selección de las enfermedades mencionadas en el presente documento sin tener en cuenta si se ha mencionado explícitamente la selección específica. Por tanto, la selección de enfermedades o trastornos puede seleccionarse al azar. La enfermedad puede ser o estar provocada por un defecto mitocondrial o una irregularidad en la función mitocondrial.

15 En particular la invención se refiere al uso de alfa-1-microglobulina en el tratamiento o la profilaxis de trastornos de la cadena respiratoria. Más específicamente los trastornos de la cadena respiratoria implican los defectos del complejo I, II, III, IV o V.

20 Más específicamente, la invención se refiere al uso de alfa-1-microglobulina en el tratamiento o la profilaxis de disfunciones mitocondriales en niños o jóvenes adultos. Los ejemplos incluyen enfermedad de Alpers, síndrome de Barth, ataxia de Fridreich, KSS, enfermedad o síndrome de Leigh, LHON, MELAS, MERRF, MIRAS y NARP

25 Más específicamente, la invención se refiere al uso de alfa-1-microglobulina en el tratamiento o la profilaxis de disfunciones mitocondriales en mujeres.

La invención también se refiere al uso de alfa-1-microglobulina en el tratamiento o la profilaxis de daño o disfunción de retina o enfermedades oculares asociadas con defecto(s) o disfunción(es) mitocondrial(es).

30 *Administración terapéutica:* La vía y/o el modo de administración de A1M puede variar dependiendo del resultado deseado. Un experto en la técnica es consciente de que las vías o modos de administración, así como regímenes, pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica deseada. Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral, entérica, mucosa/tópica incluyendo intravenosa, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intracerebral, oral, peroral, dérmica, mediante inhalación, etc.

35 La A1M puede formularse en una composición farmacéutica diseñada para el uso particular. Un experto en la técnica sabrá cómo encontrar orientación para diseñar diversas composiciones farmacéuticas, véase por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> ed. 1990, Mack Publishing.

40 Para la administración ocular puede administrarse A1M en una composición líquida o en un dispositivo médico incluyendo lentes de contacto u otros insertos oftálmicos. Las composiciones líquidas incluyen disoluciones, dispersiones, emulsiones y suspensiones y pueden presentarse en forma de colirios o bien en forma de dosis única o bien en forma de múltiples dosis, o puede presentarse como polvos secos para la reconstitución con un líquido antes de su aplicación. La composición también puede presentarse como lociones, cremas, pomadas o geles oculares. Pueden incluirse excipientes farmacéuticamente aceptables tales como disolventes (por ejemplo agua, aceites incluyendo aceites naturales o vegetales como por ejemplo aceite de ricino), un agente de aumento de la viscosidad como goma gellan, goma xantana, poli(alcoholes vinílicos), derivados de celulosa por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, etc.), conservantes como parabenos o cloruro de benzalconio, agentes de ajuste del pH (por ejemplo ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, tampones como fosfato o citrato), agentes de aumento de la estabilidad, agentes de ajuste de la tonicidad (por ejemplo cloruro de sodio), etc.

55 Para la administración oral puede formularse A1M en composiciones sólidas, semisólidas o líquidas. Las composiciones pueden estar en forma farmacéutica unitaria o en forma farmacéutica de múltiples unidades. Las composiciones incluyen polvos, comprimidos, cápsulas, sobres, películas, obleas, geles, cremas, pomadas, disoluciones, dispersiones, emulsiones, suspensiones, pulverizaciones, etc. La composición incluye uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Tales excipientes (y excipientes para otros tipos de composiciones) se conocen bien por un experto en la técnica (véase por ejemplo "Remington's Pharmaceutical Science" editado por Gennaro *et al.* (Mack Publishing Company), en "Handbook of Pharmaceutical Excipients" editado por Rowe *et al.* (PhP Press) y en monografías oficiales (por ejemplo Ph.Eur. o USP) relacionadas con excipientes relevantes para tipos de formulación específica y para métodos para preparar una formulación específica.

60 La A1M se administra preferiblemente en forma de una composición farmacéutica. Debido a la naturaleza de polipéptido de A1M las composiciones pueden diseñarse preferiblemente para su uso parenteral, pero A1M también puede aplicarse localmente por ejemplo en la piel en relación con cicatrización de heridas, en articulaciones, o en las cavidades cerebrales. Puede formularse A1M en un líquido, por ejemplo en una disolución, una dispersión, una emulsión, una suspensión, etc., o puede estar en una formulación adecuada para la administración a la piel tal

como, por ejemplo, una loción, una crema, una pomada, una suspensión, una emulsión, una pasta, un polvo, un parche, un emplasto, un vendaje, un jabón, un champú, loción de protección solar, etc. Además, puede incluirse A1M en dispositivos o equipos médicos, por ejemplo como recubrimiento liberable en catéteres, etc.

5 Alternativa y adicionalmente, pueden incluirse portadores específicos para seleccionar como diana el principio activo a una parte específica del cuerpo. Por ejemplo un complejo de anticuerpo-A1M en el que el anticuerpo se dirige a la ubicación de elección ("direccionamiento") por su especificidad para un determinado epítipo; una célula madre o una célula recombinante con tales propiedades de direccionamiento, por ejemplo receptores de integrina específicos para un tejido y con la capacidad artificial o natural para secretar grandes cantidades de A1M. El tratamiento sería más eficiente ya que el fármaco se concentraría en un sitio particular, sangrado, etc., y se requeriría menos A1M.

10 Para uso parenteral los disolventes adecuados incluyen agua, aceites vegetales, propilenglicol y disolventes orgánicos aprobados en general para tales fines. En general, un experto en la técnica puede encontrar orientación en "Remington's Pharmaceutical Science" editado por Gennaro *et al.* (Mack Publishing Company), en "Handbook of Pharmaceutical Excipients" editado por Rowe *et al.* (PhP Press) y en monografías oficiales (por ejemplo, Ph.Eur. o USP) en relación con excipientes relevantes para los tipos de formulación específica y con métodos para preparar una formulación específica.

15 La invención se ilustra en las siguientes figuras y ejemplos.

## 20 Leyenda de las figuras

Figura 1. Unión de A1M a células intactas y apoptóticas. A. Se cultivaron células HCQ.4 en plásticos recubiertos con anticuerpo de hámster anti-CD3 de ratón (4 µg/ml) durante 18 horas. Para el análisis de la unión de A1M, se incubaron  $1 \times 10^6$  células con A1M 1 mg/ml, se lavaron, se incubaron con anticuerpos de ratón anti-A1M, se lavaron y finalmente se incubaron con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC (GAM-FITC). Se analizaron 10000 células para determinar la unión de A1M (pico abierto). Se estableció la referencia mediante células incubadas con BSA en la primera etapa (pico sombreado). Se comparó la unión a células apoptóticas (histograma de la derecha) con células sin tratar (histograma de la izquierda). B. Se correlacionó la unión de A1M con la captación de PI mediante cultivo de células HCQ.4 en presencia de etanol al 5% o DMSO al 10% durante 15 horas. Para el análisis de citometría de flujo, se incubó A1M con células, seguido por anticuerpos de ratón anti-A1M y anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC. Antes del análisis, se tiñeron también las células mediante PI para detectar células muertas. C. Se analizó la unión de A1M a células apoptóticas de la línea de células pre-B 70Z/3 mediante citometría de flujo. Se indujo la apoptosis de las células mediante el fármaco de benzamida, declopramida (3-CPA), durante 15 horas y se analizaron para determinar la unión de A1M mediante incubación de A1M biotinilada, seguido por SAPE. Se estableció la referencia mediante células incubadas con SAPE sólo (pico sombreado). D. Células K562 incubadas con A1M 20 µM y 0,25 mg/ml durante 2 h y sometidas a tinción con anticuerpos de ratón anti-A1M seguido por fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Alexa Fluor® 594; rojo). Se montaron las células usando el reactivo ProLong Gold AntiFade con DAPI e inspección visual y se realizó el registro. La imagen es representativa para tres experimentos separados. El tamaño de la barra es 10 µM. E. Se determinó la especificidad de la unión de A1M mediante un ensayo de unión a células competitivo. Se compararon las células HCQ.4, en las que se indujo apoptosis mediante reticulación con anticuerpo anti-CD3 durante 18 horas (histograma de la derecha), con células HCQ.4 sin tratar (histograma de la izquierda). Se mezclaron  $1 \times 10^6$  células/muestra con 1 µg/ml de <sup>125</sup>I-A1M (1), <sup>125</sup>I-A1M más adición de 2,5 mg/ml de A1M sin marcar (2), ovoalbúmina (3), BSA (4) o AGP (5). Se incubaron las células durante 30 minutos a 4°C, se centrifugaron en un gradiente de sacarosa para separar la proteína no unida, entonces se congelaron los tubos y se separó el sedimento celular y se contaron en un contador γ. Se presentan los resultados como valores medios de un triplicado a partir de un experimento ± EEM. Se realizó la comparación estadística entre grupos usando la prueba de la t de Student. \*\*\*P < 0,001.

50 Figura 2. Estudios de tiempos de la unión de A1M a células apoptóticas. A. Se indujo apoptosis en células HCQ.4 mediante cultivo sobre plásticos recubiertos con anticuerpo anti-CD3. Se tomaron muestras en diferentes puntos de tiempo tras la inducción (0, 1, 2, 4, 8 y 16 horas). Se tiñeron las células con A1M conjugada con FITC (0,1 mg/ml) y PI. Se analizaron 10000 células. B. Se analizó la unión de A1M a células pre-B, inducidas a apoptosis mediante incubación con la benzamida 3-CPA, mediante citometría de flujo y se correlacionó con la unión de anexina V y la captación de 7AAD. Se incubaron las células 70Z/3 apoptóticas con A1M biotinilada (0,025 mg/ml) seguido por SAPE, anexina V y 7AAD. Se analizaron 10000 células y se separaron en células negativas para 7AAD (diagrama de la izquierda) y células positivas para 7AAD (diagrama de la derecha) respectivamente.

60 Figura 3. Unión de A1M a mitocondrias analizada mediante microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión. A. Se lavaron células K562 incubadas con medio sólo (izquierda) o A1M 0,25 mg/ml (derecha) durante 2 h y se incubaron con Mito-Tracker (rojo) durante 15 minutos, y se lavaron en medio fresco. Tras el lavado, entonces se tiñeron las células con anticuerpo de ratón monoclonal anti-A1M (BN 11.3) a 5 µg/ml seguido por fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Alexa Fluor® 488; verde). Se montaron las células usando el reactivo ProLong Gold AntiFade con DAPI (azul) e inspección visual y se realizó el registro usando

microscopía confocal. La imagen es representativa de tres experimentos separados. La barra de escala indica 5  $\mu\text{m}$ . B. Una visión general de queratinocitos primarios humanos incubados durante 20 horas a TA con A1M 10  $\mu\text{M}$ . Se destacan las estructuras mitocondriales con flechas y se muestran en aumento mayor en (C). Se realizó el inmunomarcado de secciones delgadas de queratinocitos primarios humanos con anticuerpo anti-A1M marcado con oro y se mostró que se correlaciona con mitocondrias. Esto se destaca con puntas de flecha (C). Se prepararon las muestras y se observaron tal como se describe en materiales y métodos. La barra de escala en (B) indica 2  $\mu\text{m}$  y en (C) 0,1  $\mu\text{m}$ .

Figura 4. Unión de A1M a mitocondrias analizada por la unión de  $^{125}\text{I}$ -A1M. A. Se investigó la especificidad de la unión de A1M a mitocondrias mezclando aproximadamente 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de  $^{125}\text{I}$ -A1M con 0,5 mg de mitocondrias purificadas en presencia o ausencia de 1,0 mg/ml de proteína sin marcar (A1M o AGP) en PBS + BSA al 4%. Se incubaron las mezclas a 4°C durante 30 minutos, se centrifugaron en un gradiente de sacarosa para separar la proteína no unida, entonces se congelaron los tubos y se separó el sedimento celular y se contaron en un contador  $\gamma$ . Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de tres determinaciones. Se realizó la comparación estadística entre los grupos usando la prueba de la t de Student. \*\*\*P < 0,001. B. Se investigó adicionalmente la especificidad de la unión de A1M a mitocondrias usando BN-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western. Se separaron cinco  $\mu\text{g}$  de proteínas de membrana mitocondrial de 2 individuos separados en un gel Bis-Tris al 4-16% para BN-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Tras el bloqueo, se incubaron las membranas con anticuerpos frente a la subunidad NDUFV1 del complejo I, núcleo I del complejo III, A1M de ratón, o se tiñeron con Coomassie. C. Se investigó también la asociación del complejo I mediante inmunoprecipitación de mitocondrias recién preparadas con anticuerpos frente al complejo I. Tras la inmunoprecipitación, se separaron las proteínas unidas y eluidas en SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a membrana de PVDF. Tras el bloqueo, se incubaron las membranas con anticuerpos frente a A1M de ratón. Banda izquierda, material de partida mitocondrial (SM) y banda derecha, material unido y eluido (IP).

Figura 5. Se investigó la especificidad de la unión de A1M a mitocondrias usando BN-PAGE, SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western. Se suspendieron las mitocondrias recién aisladas en PBS, se sedimentaron mediante centrifugación y se disolvieron hasta una concentración de 5 mg/ml en tampón MB2. Se solubilizaron las proteínas de membrana mitocondrial mediante incubación con 0,5-4,0 g de digitonina/g de proteína durante 5 min sobre hielo. Se centrifugaron las muestras, se recogió el sobrenadante y se añadió SBG hasta una concentración final del 4,5%. A. Entonces se separaron cinco  $\mu\text{g}$  de proteínas de membrana mitocondrial de 2 individuos separados (S1 y S2) sobre un gel Bis-Tris al 4-16% para BN-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Tras el bloqueo, se incubaron las membranas con anticuerpos frente a la subunidad NDUFV1 (izquierda) del complejo I, A1M (medio) y núcleo I de la subunidad del complejo III. B. Se separaron proteínas mitocondriales aisladas (15  $\mu\text{g/}$ banda) tratadas con tripsina (0-100 U de tripsina) en SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a una membrana de PVDF. Tras el bloqueo, se incubó la membrana con anticuerpos frente a A1M.

Figura 6. A1M protege la estructura mitocondrial. Se incubaron queratinocitos primarios humanos durante 20 horas a TA con medio de cultivo sólo (A), hemo 20  $\mu\text{M}$  (B) o hemo 20  $\mu\text{M}$  + A1M 0,25 mg/ml (C). Se destacan las estructuras mitocondriales con flechas y se representan en detalle (imágenes ampliadas). Se prepararon las muestras y se observaron tal como se describe en materiales y métodos. La barra de escala indica 2  $\mu\text{m}$  (visión general) y 0,5  $\mu\text{m}$  (imagen ampliada).

Figura 7. Se incubaron queratinocitos primarios humanos durante 20 horas a TA con medio de cultivo sólo (A),  $\text{H}_2\text{O}_2$  250  $\mu\text{M}$  (B) o  $\text{H}_2\text{O}_2$  250  $\mu\text{M}$  + A1M 0,25 mg/ml (C). Se destacan las estructuras mitocondriales con flechas y se representan en detalle (imágenes ampliadas). Se prepararon las muestras y se observaron tal como se describe en materiales y métodos. La barra de escala indica 2  $\mu\text{m}$  (visión general) y 0,5  $\mu\text{m}$  (imagen ampliada).

Figura 8. A1M protege la función mitocondrial. Se investigó el efecto de A1M sobre la función mitocondrial midiendo la producción de ATP de mitocondrias purificadas expuestas a hemo o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se incubaron las mitocondrias con hemo 1-20  $\mu\text{M}$ , con o sin A1M 0,25 mg/ml (A) o  $\text{H}_2\text{O}_2$  20-250  $\mu\text{M}$  con o sin A1M 0,25 mg/ml (B) durante 30 minutos. Se recogieron las mitocondrias mediante centrifugación y se midió la producción de ATP usando un kit de ensayo de luminiscencia. Se normalizaron los niveles de ATP con la correspondiente proteína de muestra. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de tres determinaciones. Se realizó una comparación estadística entre grupos usando la prueba de la t de Student. \*P < 0,05.

Figura 9. Lista de secuencias de A1M

Figura 10. Cuantificación de PCR en tiempo real de ARNr mitocondrial (A) y A1M celular, ARNm de HO1 y SOD (B) durante el cultivo de retina en condiciones moderadas y de estrés. Cada valor de  $\Delta\Delta t$  corresponde a la cantidad de ARN en condiciones de estrés en relación con la cantidad de ARN en condiciones moderadas, determinada mediante PCR en tiempo real y normalizada con respecto a gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Cada barra es la media de mediciones duplicadas de cultivos por triplicado.

## Parte experimental

## Ejemplo 1

## Materiales y métodos

5

*Proteínas y anticuerpos*

Se aisló A1M plasmática monomérica humana mediante cromatografía de afinidad con anticuerpo anti-A1M y cromatografía en gel Sephacryl S-300, tal como se describió anteriormente (48). Se purificó A1M humana recombinante, que contenía His-tag N-terminal, a partir del medio de cultivo de células de insectos infectadas con baculovirus (48) o expresadas en *E. coli* y se purificaron y replegaron tal como se describe (20) con la adición de una etapa de purificación de cromatografía de intercambio iónico (32). Se adquirieron  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida (AGP) de suero humano y ovoalbúmina de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU.) y la albúmina de suero bovino (BSA) era de Roche Diagnostics Scandinavia AB (Bromma, Suecia). Se adquirió hemina (cloruro de ferriprotoporfirina IX) de Porphyrin Products, Inc. (Logan, UT) y se preparó una disolución madre 10 mM fresca disolviendo en dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era de Acros Organics (Geel, Bélgica). Se produjeron anticuerpos monoclonales de ratón frente a A1M humana (BN11.3) tal como se describe (29). Se prepararon anticuerpos policlonales de conejo anti-A1M de ratón (Sven; fracción de IgG) inmunizando un conejo con A1M de ratón marcada con His expresada en células de insectos infectadas con baculovirus (41). Se proporcionó gentilmente el anticuerpo de hámster anti-CD3 de ratón 145.2C11 por el Dr. Rikard Holmdahl, Lund University. Se adquirieron anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (GAM-FITC) y estreptavidina conjugada con ficoeritrina (SAPE) de DAKO A/S (Glostrup, Dinamarca), la 7-aminoactinomicina D (7 AAD) era de Sigma-Aldrich Co. y la anexina V-FITC era de Trevigen Inc. (Gaithersburg, MD, EE.UU.).

25 *Cultivo celular*

Se emplearon una línea celular de hibridoma de células T CD4<sup>+</sup> de ratón (HCQ.4), una línea de células pre-B murina (70Z/3), una línea celular eritroide humana (K562) y queratinocitos primarios humanos (Cambrex Biologics, Karlskoga, Suecia) para estudios sobre la unión de A1M a células y mitocondrias. Se cultivaron las células tal como se describió anteriormente (25, 28, 37) y se procesaron y analizaron tal como se describe a continuación.

30

*Inducción de apoptosis*

Se indujo apoptosis en el hibridoma de células T mediante tres tratamientos diferentes: se incubaron células sobre plásticos recubiertos con anticuerpo anti-CD3 (4  $\mu$ g/ml) (43) o se incubaron en medio complementado con o bien etanol al 5% o bien el 10% de DMSO (24). Se incubaron las células en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C durante diversos tiempos. Se detectó apoptosis como fragmentación de AND mediante electroforesis en gel de agarosa (descrito a continuación) y se midió la viabilidad celular mediante exclusión con azul tripano. En la línea de células pre-B 70Z/3, se indujo apoptosis mediante el fármaco de benzamida declopramida (3-CPA, Oxigene Inc.) tal como se describe en (25).

40

*Electroforesis en agarosa*

Para detectar la fragmentación de ADN, se lisaron aproximadamente 1x10<sup>6</sup> células, se trataron con proteinasa K y ARNasa A y se analizaron mediante electroforesis en agarosa.

45

*Marcaje de A1M*

Para el análisis de unión de A1M a células, se biotiniló A1M, se conjugó con FITC o se radiomarcó con <sup>125</sup>I. Se biotiniló A1M con biotina-N-hidroxisuccinimida de brazo largo (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.) (9) y se diluyó hasta una concentración de 0,2 mg/ml. Se conjugó A1M con FITC tal como se describió anteriormente (13) mediante FITC adsorbido en Celite (Calbiochem Corp, San Diego, CA, EE.UU.). Se marcó A1M con <sup>125</sup>I usando el método de cloramina T (16). La radioactividad específica obtenida fue de alrededor de 0,1-0,2 MBq/ $\mu$ g.

55 *Citometría de flujo*

Se analizó la unión de A1M a células mediante citometría de flujo. Se analizaron aproximadamente 1x10<sup>6</sup> células para determinar la unión de A1M en una de tres maneras diferentes: 1. Se incubaron las células con 1 mg/ml de plasma o A1M de célula de insecto recombinante, seguido por 10  $\mu$ g/ml de anticuerpo de ratón monoclonal anti-A1M (BN 11.3) y GAM-FITC (diluido 20 veces). 2. Se incubaron las células con A1M biotinilada 10  $\mu$ g/ml seguido por SAPE (diluido según las recomendaciones del fabricante). 3. Se incubaron las células con A1M conjugada con FITC 0,1 mg/ml. Se realizaron todas las incubaciones en PBS + 1 mg/ml de BSA durante 10 minutos a TA. Entre las incubaciones, se lavaron las células 2-3 veces en PBS. Para detectar la fuga de células, se incubaron las células con yoduro de propidio (PI; Invitrogen Inc.) o 7AAD (según instrucciones del fabricante). Para detectar células 70Z/3 apoptóticas, también se incubaron las células con anexina V conjugada con FITC en un tampón que contenía Ca<sup>2+</sup>

65



(según las instrucciones del fabricante). Se realizaron todos los análisis usando un equipo Becton Dickinson FACSorter y el paquete de software Cell Quest.

#### *Fluorescencia y microscopía confocal*

5 Se lavaron células K562 y se resuspendieron en medio de cultivo hasta  $0,5 - 4,0 \times 10^6$  células/ml y se incubaron con o sin A1M tal como se indica en las leyendas de las figuras. Entonces o bien se incubaron las células con Mito-Tracker (Invitrogen Inc.) durante 15 minutos a 37°C y se lavaron en medio fresco (figura 3A) o bien se lavaron directamente en medio fresco (figura 1C). Tras el lavado, se realizó la tinción de las células resuspendiendo en medio de Na helado (KCl 5,4 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM;  $\text{MgSO}_4$  0,8 mM; D-glucosa 5,6 mM; NaCl 127 mM; Hepes 10 mM;  $\text{CaCl}_2$  1,8 mM; pH 7,3), fijación con BD CellFIX al 1% sobre hielo durante 15 min y a TA durante 45 min. Se lavaron las células en disolución de bloqueo (medio de Na; BSA al 1%; suero de cabra al 5%) seguido por permeabilización en Triton-X al 0,02% y bloqueo en BSA al 1%, suero de cabra al 5%, Tween-20 al 0,2% durante 1 hora a TA. Entonces se tiñeron las células a 4°C durante la noche con anticuerpo de ratón monoclonal anti-A1M (BN 11.3) a 5 µg/ml. Después, se aplicaron fragmentos  $\text{F(ab')}_2$  de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Alexa Fluor® 594; Invitrogen Inc.), durante 1 h a TA. Se montaron las células usando el reactivo ProLong Gold AntiFade con DAPI. Para la microscopía de fluorescencia, se realizaron inspección visual y el registro de imágenes usando un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE300 equipado con una cámara CCD refrigerada Hamamatsu C4742-95, usando un objetivo Plan Apochromat 100 x. Para la microscopía confocal, se realizaron análisis de células y marcadores fluorescentes usando un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TE300) y un microscopio de barrido láser confocal (Zeiss LSM 510 Meta). Se equipó el microscopio de epifluorescencia con las combinaciones de filtro apropiadas para visualizar selectivamente los fluoróforos usados. Se realizaron análisis usando una lente Plan Apochromat 100 x y se recogieron los datos de imágenes con una cámara CCD Hamamatsu C4742-95. Para analizar el marcaje y comarcaje intracelular en estructuras subcelulares, se registró el barrido confocal de secciones ópticas a través de las células. Para excitación de los fluoróforos, se usó la línea de láser de 405 nm para DAPI (láser de diodo 405-30), se usó la línea de láser de 488 nm para Alexa Fluor 488 (láser de argón) y la línea de láser de 561 nm para Mito-Tracker (DPSS 561-10). Se detectaron las longitudes de onda de emisión de fluoróforo individual usando los siguientes filtros: paso banda de 420-480 nm para DAPI, paso banda de 505-550 nm para Alexa Fluor 488 y paso largo de 575 nm para Mitotracker. Se ajustó el agujero para detección de Alexa Fluor 488 (excitación de 488 nm) para corresponder a 1 (una) unidad Airy, y entonces se ajustaron los agujeros para los demás canales de detección para proporcionar secciones ópticas del mismo espesor, es decir para garantizar las comparaciones de los correspondientes volúmenes focales. Se optimizaron la potencia del láser y los ajustes de detección (ganancia y compensación) para los canales individuales, proporcionando un rango de detección de desde pixeles altamente saturados de estructuras mayores hasta pixeles no saturados de estructuras pequeñas. Se escanearon secuencialmente los diferentes fluoróforos, es decir con ajustes óptimos para un fluoróforo en cada canal, a un tamaño de marco de  $512 \times 512$  ó  $1024 \times 1024$ . Para determinar la morfología celular, se obtuvieron imágenes de contraste por interferencia diferencial (DIC) usando el láser de 405 nm como luz transmitida. Se determinó la relación espacial entre la fluorescencia Alexa Fluor 488 (verde) y la fluorescencia Mito-Tracker (roja) a través de la fusión de las secciones ópticas de los canales barridos individualmente (amarillo cuando presentan una ubicación conjunta), confirmado a través de análisis de imágenes fusionadas usando el software LSM Zen ("Profile", datos no mostrados).

#### *Sistema de doble híbrido de levadura*

45 Se usó un sistema de doble híbrido de levadura basado en GAL4 para buscar proteínas celulares que interactúan con A1M. Se amplificó el ADN que codifica para la parte de A1M (aminoácidos 1-183) del gen A1M-bikunina (AMBP) mediante PCR usando un constructo pCR-Script como molde. Se secuenció completamente el fragmento y se ligó en el vector de doble híbrido de levadura, vector fagémido pBD-GAL4 Cam (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). Entonces se transformó el vector recombinante en la cepa huésped de la levadura *S. cerevisiae* YRG-2 (Stratagene). Se realizaron el crecimiento y el mantenimiento de las cepas de la levadura y ensayos de doble híbrido usando protocolos convencionales tal como se recomienda por Stratagene y <http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/units/biochem/gietz/>. Se transformaron aproximadamente  $7,5 \times 10^8$  YRG-2 que portaban el plásmido cebo, pBD-GAL4-A1M, con 15-20 µg de una biblioteca de ADNc MATCHMAKER de leucocitos humanos (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.). Se analizaron los aproximadamente  $2 \times 10^6$  transformantes resultantes mediante ensayo de prototrofia de histidina y ensayo de elevación de colonias β-gal. Se aislaron los plásmidos de biblioteca recombinante de los transformantes  $\text{His}^+ \text{LacZ}^+$  y se sometieron a prueba de nuevo en ensayos de doble híbrido directos junto con el plásmido cebo de A1M así como con los plásmidos cebo que codifican para proteínas no relacionadas. Los plásmidos que dan como resultado la activación de los genes indicadores junto con el plásmido cebo que codifica para A1M, pero no con los plásmidos cebo que codifican para proteínas no relacionadas, se consideraban positivos verdaderos. Se determinó la secuencia de ADN de los insertos usando los cebadores de vector pAD5': 5'-tccagattacgctagctgggtggtcatatg-3' y pAD3': 5'-gtgaactgcggggttttcagatctacga-3'. Se secuenció completamente uno de los insertos por Innovagen AB (Lund, Suecia).

65 *Preparación de mitocondrias a partir de tejido de hígado de ratón*

Se recogió tejido de hígado de ratón en tampón de aislamiento helado (sacarosa 320 mM, Trizma Base 10 mM, EGTA 2 mM) y se homogeneizó posteriormente en 2 ml de tampón de homogeneización (tampón de aislamiento complementado con BSA al 1%). Se prepararon mitocondrias a partir de homogeneizados mediante centrifugación secuencial incluyendo purificación por densidad en Percoll al 19%. Se determinó la concentración de proteínas de preparaciones mitocondriales usando Nanodrop y se usaron mitocondrias aisladas sin congelación.

#### *Ensayo de unión a células y a mitocondrias competitivo.*

Se investigó la especificidad de la unión de A1M a células y mitocondrias mediante un ensayo de unión a células competitivo tal como se describe (3, 49). Se indujo apoptosis en células HCQ.4 mediante reticulación de anticuerpo anti-CD3 durante 15-18 horas. Se recogieron las células y se compararon con células normales en el ensayo de unión. Se calculó una constante de afinidad para la unión usando una representación de Scatchard de los datos.

#### *Inmunocaptura del complejo I*

Se realizó inmunoprecipitación del complejo I sobre mitocondrias recién preparadas usando el kit de inmunocaptura del complejo I (MitoSciences). Tras la inmunoprecipitación, se eluyeron las proteínas unidas usando tampón SDS y posteriormente se analizaron usando SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western.

#### *Aislamiento de los complejos y supercomplejos de cadena respiratoria*

Se suspendieron los sedimentos mitocondriales no congelados, recién aislados, en PBS complementado con inhibidor de mini proteasa completo. Se sedimentaron mitocondrias durante 5 min a 5000 xg y posteriormente se disolvieron hasta una concentración de 5 mg/ml en tampón MB2 (ácido aminocaproico 1,75 M, Bis-Tris 7,5 mM pH 7,0, + EGTA 2 mM pH 8,0). Se solubilizaron proteínas de membrana mitocondrial mediante incubación con digitonina al 0,5% durante 5 min sobre hielo. Se centrifugaron las muestras durante 30 min a 13000 xg, se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteína como antes. Finalmente, se añadió SBG (ácido aminocaproico 750 mM, Serva Blue G al 5%) hasta una concentración final del 4,5%.

#### *Blue native PAGE, SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western*

Se separaron cinco  $\mu$ g de proteínas de membrana mitocondrial en un gel Bis-Tris al 4-16% para BN-PAGE (Invitrogen Inc.) o bien se tiñeron con azul brillante de Coomassie o bien se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore, Bedford, MA, EE.UU.) usando el equipo Iblot (Invitrogen Inc.). Se separaron las proteínas inmunoprecipitadas del complejo I en un SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a una membrana de PVDF. Tras el bloqueo durante la noche a 4°C se incubaron las membranas con anticuerpos frente a la subunidad NDUFV1 del complejo I (Sigma) o A1M de ratón. Se detectaron los anticuerpos primarios mediante incubación con el anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a HRP (DAKO) o anticuerpo de cabra anti-conejo (DAKO).

#### *Microscopia electrónica de transmisión (MET)*

Se sedimentaron mediante centrifugación queratinocitos humanos (aproximadamente 1 millón de células), incubados durante 20 horas a TA con hemo 20  $\mu$ M, con o sin A1M 10  $\mu$ M, y se fijaron posteriormente durante 1 hora a TA y luego durante la noche a 4°C en glutaraldehído al 2,5% en cacodilato de sodio 0,15 M, pH 7,4 (tampón cacodilato). Entonces se lavaron las muestras con tampón cacodilato y se fijaron posteriormente durante 1 hora a TA en tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato, se deshidrataron en una serie graduada de etanol y entonces se incrustaron en Epon 812 usando acetona como disolvente intermedio. Se seccionaron los especímenes con un cuchillo de diamante en secciones ultradelgadas de 50-70 nm de espesor en un ultramicrotomo LKB. Se tiñeron las secciones ultradelgadas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se observaron los especímenes en un microscopio electrónico JEOL JEM 1230 operado a 80 kV de voltaje de aceleración. Se registraron imágenes con una cámara CCD Gatan Multiscan 791. Se realizó el inmunomarcaje de las secciones delgadas con anticuerpo anti-A1M marcado con oro (BN11.3) tal como se describió anteriormente (39) con la modificación que se usó Aurion-BSA como agente de bloqueo. Finalmente se tiñeron las muestras con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico Jeol JEM 1230, operado a 80 kV de voltaje de aceleración. Se registraron las imágenes con una cámara de dispositivo acoplado a carga Gatan Multiscan 791.

#### *Ensayo de ATP*

Se midió la producción de ATP celular usando un kit de ensayo de luminiscencia (Promega, Madison, WI), basado en la actividad dependiente de ATP de luciferasa. Se normalizaron los niveles de ATP con el correspondiente contenido en proteína de la muestra.

#### *Análisis estadístico*

Se realizó el análisis estadístico usando el software Origin 8. Se usó la prueba de la t de Student para la evaluación estadística y se consideró significativa cuando  $P < 0,05$ .

## Resultados

*Unión específica de A1M a células dañadas*

5 Se analizó la unión de A1M a células apoptóticas y sanas mediante citometría de flujo y se comparó con células sin tratar. En primer lugar, se indujo apoptosis en hibridomas de células T murinas (HCQ.4) mediante reticulación de la molécula de CD3 con anticuerpos anti-CD3 de ratón inmobilizados (figura 1A, E), o mediante incubación con etanol al 5% o DMSO al 10% (figura 1B). Estos tratamientos dieron como resultado la fragmentación de ADN y captación de azul tripano tras 15-18 horas (no mostrado). Una unión débil de A1M pudo detectarse para células sin tratar (figura 1A, panel izquierdo). Una unión más fuerte adicional pudo detectarse para células reticuladas con anticuerpo anti-CD3 (figura 1A, panel derecho) o tratadas con etanol o DMSO (figura 1B). La unión pudo correlacionarse con la captación de PI, es decir sólo células que podían incorporar PI presentaron la unión más fuerte de A1M (figura 1B). La citometría de flujo de una línea de células pre-B murina, inducida a apoptosis usando el fármaco 3-CPA, e incubada con A1M seguido por anticuerpo anti-A1M, mostró resultados similares (figura 1C), indicando que la unión a células apoptóticas no se limita a células T.

Con el fin de caracterizar adicionalmente la unión de A1M a células dañadas, se estudió la unión usando microscopía de fluorescencia de la línea celular eritroide humana K562 (figura 1D) y la línea celular promielocítica HL 60 (no mostrada) inducidas a apoptosis mediante adición de hemo, e incubadas con A1M seguido por anticuerpo anti-A1M. Tal como se ilustra en la figura, pudieron observarse dos tipos diferentes de tinción, una tinción granular débil en la superficie celular de la mayoría de las células y una tinción más pronunciada, intracelular y uniforme en un subconjunto (aproximadamente el 6%) de las células. Se obtuvieron resultados similares con las células HL 60 (no mostrado). Estos resultados indican que la unión fuerte de A1M a células apoptóticas es principalmente intracelular, lo que se confirmó mediante microscopía confocal (véase más adelante; figura 3A).

Para investigar la especificidad de la unión, se realizó un ensayo de unión a células competitivo sobre células HCQ.4, inducidas a apoptosis mediante reticulación de CD3 y se comparó con células normales sin tratar. Se añadieron A1M marcada con  $^{125}\text{I}$  y un exceso de A1M sin marcar, ovoalbúmina, BSA o AGP a las células (figura 1E). Se unió más A1M a células apoptóticas (figura 1E, izquierda) en comparación con células sin tratar (derecha). El exceso de A1M sin tratar bloqueó la unión de A1M a  $^{125}\text{I}$  al mismo nivel basal para células apoptóticas que para células sin tratar. Se encontró que la reducción es significativa ( $p < 0,001$ ). Ninguna de las proteínas control sin marcar pudo reducir de manera significativa la unión de  $^{125}\text{I}$ -A1M a células sin tratar, indicando de ese modo una unión específica de A1M. Con respecto a las células apoptóticas, hubo una reducción pequeña, significativa, mediante las proteínas control ( $p < 0,05$ ). Esta pequeña reducción puede ser debido a un aumento de la unión de referencia no específica a estructuras intracelulares expuestas. Por consiguiente, los resultados indican una unión más fuerte específica de A1M a células apoptóticas. A partir de una representación de Scatchard pudo determinarse una constante de afinidad para la unión de A1M a células HCQ.4 apoptóticas a  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . La viabilidad de estas células fue del 25% según la exclusión con azul tripano (no mostrado).

Tal como se mencionó anteriormente, las células de unión de A1M internalizaron PI (figura 1B). Esto indica que la unión de A1M se produjo tarde en el proceso apoptótico después de que las membranas celulares han iniciado la fuga. Para confirmar este resultado, se realizaron estudios de tiempos sobre la unión de A1M a células HCQ.4, inducidas a apoptosis mediante reticulación con anticuerpo anti-CD3. La citometría de flujo de muestras tomadas en diversos puntos de tiempo tras la inducción muestra que la captación de PI precede a la unión de A1M (figura 2A). No se observó la clara correlación de unión en células negativas para la captación de PI. Se obtuvo el mismo resultado cuando se tiñeron por triplicado las células pre-B murinas con A1M, anexina V (marcador para apoptosis) y 7AAD (tinte marcador para la permeabilidad de membrana celular) (figura 2B). Sólo células positivas para 7AAD mostraron una fuerte unión de A1M, mientras que las células positivas para anexina V, pero no para 7AAD, no se unieron a A1M.

*Identificación de proteínas de unión a A1M intracelular*

Para buscar proteínas celulares que interaccionan con A1M, se usó el sistema de doble híbrido de levadura. Se usó ADNc que codifica para A1M como cebo para buscar proteínas que interaccionan con A1M en una biblioteca de leucocitos humanos. Se analizaron aproximadamente  $2 \times 10^6$  transformantes para determinar la activación del gen indicador. Un total de 168 colonias sobrevivieron sobre placas que carecían de histidina y 13 de ellas también eran positivas para  $\beta$ -galactosidasa. Se aislaron los plásmidos de biblioteca recombinante His<sup>+</sup>LacZ<sup>+</sup> y se sometieron a prueba en ensayos de doble híbrido directos con plásmidos cebo que codifican sólo para la proteína cebo así como la proteína fusionada a proteínas no relacionadas. Se mostró que once plásmidos recombinantes codificaban para proteínas que interaccionaban con A1M, pero no con la proteína cebo u otras proteínas no relacionadas fusionadas con la misma. La secuenciación de ADN de los insertos reveló que siete de ellos eran una forma truncada de la subunidad SDAP (NDUFAB1) en el complejo I mitocondrial, uno era la secuencia completa de la misma subunidad, uno era una proteína de unión a ARNnp, uno era N-acetilglucosamina cinasa y uno era un antígeno de cáncer de colon. Todos los insertos estaban en el marco en el vector presa (tabla I).

Tabla 1. Proteínas que interactúan con A1M encontradas en el sistema de doble híbrido de levadura.

Proteína	N.º de colonias	N.º de registro Genebank	N.º de bases*
NADH deshidrogenasa 8 kDa, subunidad SDAP (NDUFAB1)	7	NM_005003	142-670
NADH deshidrogenasa 8 kDa, subunidad SDAP (NDUFAB1)	1	NM_005003	18-670
Proteína similar a Sm asociada a ARNnp U6 (LSM5)	1	AF182291	14-735
N-acetilglucosamina cinasa (NAGK)	1	AJ242910	7-1187
Antígeno 3 de cáncer de colon definido serológicamente, NY-CO-3 (SDCCAG3)	1	AK001296	0-1441

\* Según la numeración de bases del n.º de registro Genebank asignado en esta tabla.

#### Unión de A1M al complejo I mitocondrial

5 Los resultados de los experimentos de doble híbrido de levadura sugieren por tanto que una subunidad del complejo I mitocondrial es una proteína intracelular de unión a A1M principal. Por tanto se investigó la unión a mitocondrias, y al complejo I en particular, en detalle usando varios métodos independientes: microscopía confocal, ME, fraccionamiento subcelular y PAGE. Usando una sonda fluorescente mitocondrial (Mito-Tracker) y microscopía confocal se evaluó la ubicación subcelular de la A1M intracelular en células K562 con o sin adición de A1M exógena (figura 3A). Al analizar células sin A1M añadida de manera exógena se observó una tinción intracelular no específica muy débil (no mostrado). Sin embargo, con la adición de A1M exógena se observó una tinción específica de mitocondrias, intensa. También se estudió la ubicación subcelular de la A1M unida mediante ME de transmisión (MET) usando cultivos de queratinocitos humanos primarios (figura 3B-C). La MET de queratinocitos, que contienen A1M añadida de manera exógena e incubados con anticuerpo anti-A1M marcado con oro, mostró una ubicación altamente específica de A1M en las mitocondrias (figura 3C).

20 Se realizó la confirmación de la unión mitocondrial y verificación de especificidad usando mitocondrias purificadas de hígado de ratón (figura 4A). Se incubó A1M marcada con  $^{125}\text{I}$  con las mitocondrias, con o sin un exceso de A1M sin marcar o la proteína de control AGP. El exceso de A1M sin marcar bloqueó la unión  $^{125}\text{I}$ -A1M de manera significativa en las dos concentraciones mayores, mientras que AGP en la concentración más alta no tuvo efecto sobre la unión. El análisis de Scatchard de los datos de unión produjo una constante de afinidad de la unión a  $1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ .

25 Para investigar si se encuentra A1M endógena en mitocondrias asociadas con el complejo I, se purificaron mitocondrias de ratón sin congelación, se solubilizaron, se separaron en condiciones no desnaturizantes y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos frente a subunidades del complejo I y III (denominadas NDUFV1 y núcleo I, respectivamente) y frente a A1M de ratón (figura 4B). Los resultados muestran que A1M migra conjuntamente con la banda que contiene el complejo I principal y una banda muy compleja que contiene tanto el complejo I como III, mientras que no se observó migración conjunta entre A1M y la banda que contiene el complejo III principal. Tomados juntos, esto respalda una asociación específica entre A1M y una subunidad del complejo I. Sin embargo, una fracción grande de A1M migró a una posición correspondiente a aproximadamente 350-400 kDa, lo que sugiere que A1M también se asocia con otras estructuras grandes, aún no identificadas, en mitocondrias. La intensidad de transferencia de todas las bandas disminuye con concentraciones de digitonina crecientes, lo que sugiere que todas las bandas observadas en los geles resultan de interacciones proteína-proteína no covalentes (figura 5A). Se confirmó la unión entre A1M y el complejo I mediante la inmunoprecipitación con anticuerpo anti-complejo I seguido por transferencia con anticuerpo anti-A1M (figura 4C). Los resultados mostraron que se precipitaron la mayoría de las bandas positivas para A1M asociada a mitocondrias en el material de partida (figura 4C, izquierda). Además, en el inmunoprecipitado se observó una nueva banda, no detectable en el material de partida. La digestión con tripsina de mitocondrias intactas antes de SDS-PAGE e inmunotransferencia con anticuerpo anti-A1M no disminuyó la cantidad de A1M encontrada en las mitocondrias, lo que respalda una ubicación de A1M en la membrana mitocondrial interna (figura 5B).

*A1M protege la estructura y la función mitocondriales*

Planteando como hipótesis que el papel fisiológico de A1M unida a mitocondrias es conferir protección de este orgánulo, en primer lugar se empleó MET para investigar el impacto de A1M sobre la estructura de mitocondrias en células expuestas a hemo y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 6 y 7). Se realizó MET sobre queratinocitos primarios humanos cultivados. Se observaron efectos destructivos extensivos por hemo (figura 6B) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 7B), es decir formación vasta de vacuolas, desorganización estructural de fibras de queratina e hinchazón de las mitocondrias (figura 6B y 7B, ampliadas). Se contrarrestaron estos efectos mediante la adición de A1M, observándose un impacto particular sobre el hinchazón mitocondrial (figura 6C y 7C, ampliadas). Los resultados sugieren que A1M protege y conserva las estructuras celulares de otra manera dañadas y disgregadas.

A continuación se investigaron los efectos de A1M sobre la función mitocondrial midiendo la producción de ATP de mitocondrias purificadas expuestas a hemo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 8). Se observó una reducción significativa en la tasa de producción de ATP por hemo 5 y 20 μM (figura 8A). Se invirtió esta reducción por A1M, y no se observó reducción en la tasa de producción de ATP por hemo en ninguna de las concentraciones sometidas a prueba cuando estaba presente A1M 10 μM. Se obtuvieron resultados similares usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 8B). Por tanto, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redujo de manera significativa la tasa de producción de ATP, pero se invirtieron de manera significativa los efectos en presencia de A1M 10 μM.

Ejemplo 2. Condiciones de estrés en cultivos de retina inducen daño estructural y funcional de mitocondrias, respuesta de antioxidación celular y regulación por incremento de A1M celular

## Métodos

Se diseccionaron retinas de cerdo y se cultivaron en placas de Petri en condiciones moderadas y de estrés *in vitro* tal como se describe para retinas de rata (Cederlund M, Ghosh F, Arner K, Andreasson S, Åkerström B. Vitrous levels of oxidative stress biomarkers and the radical scavenger alpha-1-microglobulin/A1M in human rhegmatogenous retinal detachment. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol (2013) 251: 725-732). Tras 2 h o 48 h, se aisló ARNm y se cuantificó, se sintetizó ADNc mediante transcripción inversa y se cuantificó la cantidad de secuencias específicas mediante PCR en tiempo real. Se normalizaron las cantidades obtenidas de cada especie de ARNm en cultivos en estrés con respecto a ARNm a partir del gen de mantenimiento gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa y se expresaron en relación con los genes normalizados en condiciones de no estrés (ΔΔCt).

## Resultados

Se reguló por disminución drásticamente la expresión de ARN ribosómico específico de mitocondrias (ARNr 12S) en retinas cultivadas 48 h en condiciones de estrés en comparación con condiciones moderadas (figura 10a), lo que sugiere daño en la estructura y la función mitocondriales. Al mismo tiempo, se regularon por incremento el gen de A1M y los dos genes de antioxidación hemo oxigenasa 1 (HO1) y superóxido dismutasa (SOD) en cultivos con estrés en comparación con cultivos moderados tras tanto 2 h como 48 h (figura 10b), lo que sugiere que se activan los mecanismos de defensa celular de la retina incluyendo A1M.

## Conclusiones

El estrés retiniano durante el cultivo *in vitro* afecta de manera negativa a la estructura y la función mitocondriales de la retina y regula por incremento la defensa de la antioxidación y la expresión de A1M. Estos resultados respaldan un papel de A1M en la protección mitocondrial durante el cultivo retiniano.

## Lista de abreviaturas

Especies reactivas del oxígeno	ROS
Hemoglobina	Hb
Superóxido dismutasa	SOD
Glutación peroxidasa	GPx
α <sub>1</sub> -microglobulina	A1M
Violaxantina desepoxidasa	VDE
Zeaxantina epoxidasa	ZDE
α <sub>1</sub> -Glicoproteína ácida	AGP
Albúmina de suero bovino	BSA
Dimetilsulfóxido	DMSO
Anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína	GAM-FITC
Estreptavidina conjugada con ficoeritrina	SAPE
7-aminoactinomicina D	7 AAD

**Bibliografía**

1. Allhorn M, Berggård T, Nordberg J, Olsson ML y Åkerström B. Processing of the lipocalin  $\alpha_1$ -microglobulin by hemoglobin induces heme-binding and heme-degradation properties. *Blood* 99: 1894-901, 2002.
2. Allhorn M, Klapysa A y Åkerström B. Redox properties of the lipocalin  $\alpha_1$ -microglobulin: reduction of cytochrome c, hemoglobin, and free iron. *Free Radic Biol Med* 38: 557-67, 2005.
3. Babiker-Mohamed H, Olsson ML, Boketoft A, Lögdberg L y Åkerström B.  $\alpha_1$ -microglobulin is mitogenic to human peripheral blood lymphocytes. Regulation by both enhancing and suppressive serum factors. *Immunobiology* 180: 221-34, 1990.
4. Berggård T, Oury TD, Thogersen IB, Åkerström B y Enghild JJ.  $\alpha_1$ -microglobulin is found both in blood and in most tissues. *J Histochem Cytochem* 46: 887-94, 1998.
5. Berggård T, Thelin N, Falkenberg C, Enghild JJ y Åkerström B. Prothrombin, albumin and immunoglobulin A form covalent complexes with  $\alpha_1$ -microglobulin in human plasma. *Eur J Biochem* 245: 676-83, 1997.
6. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 45: 466-72, 2010.
7. Degterev A y Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 378-90, 2008.
8. DeMars DD, Katzmann JA, Kimlinger TK, Calore JD y Tracy RP. Simultaneous measurement of total and IgA-conjugated  $\alpha_1$ -microglobulin by a combined immunoenzyme/immunoradiometric assay technique. *Clin Chem* 35: 766-72, 1989.
9. Elbashir MI, Nilson BH, Akesson P, Björck L y Åkerström B. Antibody response in immunized rabbits measured with bacterial immunoglobulin-binding proteins. *J Immunol Methods* 135: 171-9, 1990.
10. Faivre B, Menu P, Labrude P y Vigneron C. Hemoglobin autooxidation/oxidation mechanisms and methemoglobin prevention or reduction processes in the bloodstream. Literature review and outline of autooxidation reaction. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 26: 17-26, 1998.
11. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 318 (Pt 1): 1-14, 1996.
12. Ganfornina L, Sanchez D, Greene LH y Flower DR. The lipocalin protein family. Protein sequence, structure and relationship to calycin superfamily. En: *Lipocalins*. editado por Åkerström B, Borregaard N, Flower DR y Salier JP. Georgetown, TX.: Landes Bioscience; 2006. págs. 17-27.
13. Goding JW. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. (Orlando, FL: Academic Press; 1986.
14. Goss R y Jakob T. Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynth Res* 106: 103-22, 2010.
15. Gray MW, Burger G y Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476-81, 1999.
16. Greenwood FC, Hunter WM y Glover JS. The Preparation of I-131-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. *Biochem J* 89: 114-23, 1963.
17. Halliwell B y Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. (4<sup>a</sup> ed) Oxford: Oxford University Press; 2007.
18. Hinderlich S, Berger M, Schwarzkopf M, Effertz K y Reutter W. Molecular cloning and characterization of murine and human N-acetylglucosamine kinase. *Eur J Biochem* 267: 3301-8, 2000.
19. Kastern W, Björck L y Åkerström B. Developmental and tissue-specific expression of  $\alpha_1$ -microglobulin mRNA in the rat. *J Biol Chem* 261: 15070-4, 1986.
20. Kwasek A, Osmark P, Allhorn M, Lindqvist A, Åkerström B y Wasylewski Z. Production of recombinant human  $\alpha_1$ -microglobulin and mutant forms involved in chromophore formation. *Protein Expr Purif* 53: 145-52, 2007.
21. Larsson J, Allhorn M y Åkerström B. The lipocalin  $\alpha_1$ -microglobulin binds heme in different species. *Arch Biochem Biophys* 432: 196-204, 2004.
22. Larsson J, Wingårdh K, Berggård T, Davies JR, Lögdberg L, Strand SE y Åkerström B. Distribution of iodine <sup>125</sup>-labeled  $\alpha_1$ -microglobulin in rats after intravenous injection. *J Lab Clin Med* 137: 165-75, 2001.

23. Lee J, Giordano S y Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* 441: 523-40, 2012.
- 5 24. Lennon SV, Martin SJ y Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 24: 203-14, 1991.
25. Liberg D, Lazarevic B, Pero RW y Leanderson T. N-substituted benzamides inhibit NFkappaB activation and induce apoptosis by separate mechanisms. *Br J Cancer* 81: 981-8, 1999.
- 10 26. Loschen G, Azzi A y Flohe L. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation: relationship with energy conservation. *FEBS Lett* 33: 84-7, 1973.
27. May K, Rosenlöf L, Olsson MG, Centlow M, Mörgelin M, Larsson I, Cederlund M, Rutardóttir S, Siegmund W, Schneider H, Åkerström B y Hansson SR. Perfusion of human placenta with hemoglobin introduces preeclampsia-like injuries that are prevented by  $\alpha_1$ -microglobulin. *Placenta* 32: 323-32, 2011.
- 15 28. Michaelsson E, Malmström V, Reis S, Engström A, Burkhardt H y Holmdahl R. T cell recognition of carbohydrates on type II collagen. *J Exp Med* 180: 745-9, 1994.
- 20 29. Nilson B, Åkerström B y Lögdberg L. Cross-reacting monoclonal anti- $\alpha_1$ -microglobulin antibodies produced by multi-species immunization and using protein G for the screening assay. *J Immunol Methods* 99: 39-45, 1987.
30. Nisbet EG y Sleep NH. The habitat and nature of early life. *Nature* 409: 1083-91, 2001.
- 25 31. Olsson MG, Allhorn M, Bulow L, Hansson SR, Ley D, Olsson ML, Schmidtchen A y Åkerström B. Pathological conditions involving extracellular hemoglobin: molecular mechanisms, clinical significance, and novel therapeutic opportunities for  $\alpha_1$ -microglobulin. *Antioxid Redox Signal En* *in press*, 2012.
- 30 32. Olsson MG, Allhorn M, Larsson J, Cederlund M, Lundqvist K, Schmidtchen A, Sorensen OE, Mörgelin M y Åkerström B. Up-regulation of A1M/ $\alpha_1$ -microglobulin in skin by heme and reactive oxygen species gives protection from oxidative damage. *PLoS One* 6: e27505, 2011.
- 35 33. Olsson MG, Allhorn M, Olofsson T y Åkerström B. Up-regulation of  $\alpha_1$ -microglobulin by hemoglobin and reactive oxygen species in hepatoma and blood cell lines. *Free Radic Biol Med* 42: 842-51, 2007.
34. Olsson MG, Centlow M, Rutardóttir S, Stenfors I, Larsson J, Hosseini-Maaf B, Olsson ML, Hansson SR y Åkerström B. Increased levels of cell-free hemoglobin, oxidation markers, and the antioxidative heme scavenger  $\alpha_1$ -microglobulin in preeclampsia. *Free Radic Biol Med* 48: 284-91, 2010.
- 40 35. Olsson MG, Nilsson EJ, Rutardottir S, Paczesny J, Pallon J y Åkerström B. Bystander Cell Death and Stress Response is Inhibited by the Radical Scavenger  $\alpha_1$ -Microglobulin in Irradiated Cell Cultures. *Radiat Res*, 2010.
- 45 36. Olsson MG, Olofsson T, Tapper H y Åkerström B. The lipocalin  $\alpha_1$ -microglobulin protects erythroid K562 cells against oxidative damage induced by heme and reactive oxygen species. *Free Radic Res* 42: 725-36, 2008.
37. Paige CJ, Kincade PW y Ralph P. Murine B cell leukemia line with inducible surface immunoglobulin expression. *J Immunol* 121: 641-7, 1978.
- 50 38. Poyton RO, Ball KA y Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* 20: 332-40, 2009.
39. Roth J. Post-embedding cytochemistry with gold-labelled reagents: a review. *J Microsc* 143: 125-37, 1986.
- 55 40. Salgado-Garrido J, Bragado-Nilsson E, Kandels-Lewis S y Seraphin B. Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *EMBO J* 18: 3451-62, 1999.
41. Sanchez D, Martinez S, Lindqvist A, Åkerström B y Falkenberg C. Expression of the AMBP gene transcript and its two protein products,  $\alpha_1$ -microglobulin and bikunin, in mouse embryogenesis. *Mech Dev* 117: 293-8, 2002.
- 60 42. Scanlan MJ, Chen YT, Williamson B, Gure AO, Stockert E, Gordan JD, Tureci O, Sahin U, Pfreundschuh M y Old LJ. Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int J Cancer* 76: 652-8, 1998.
- 65 43. Shi YF, Szalay MG, Paskar L, Sahai BM, Boyer M, Singh B y Green DR. Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. Morphologic aspects and DNA fragmentation. *J Immunol* 144: 3326-33, 1990.

44. Tejler L, Eriksson S, Grubb A y Astedt B. Production of protein HC by human fetal liver explants. *Biochim Biophys Acta* 542: 506-14, 1978.
- 5 45. Triepels R, Smeitink J, Loeffen J, Smeets R, Buskens C, Trijbels F y van den Heuvel L. The human nuclear-encoded acyl carrier subunit (NDUFAB1) of the mitochondrial complex I in human pathology. *J Inherit Metab Dis* 22: 163-73, 1999.
- 10 46. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T y Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 700-14, 2010.
47. Weisiger RA y Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 248: 4793-6, 1973.
- 15 48. Wester L, Johansson MU y Åkerström B. Physicochemical and biochemical characterization of human  $\alpha_1$ -microglobulin expressed in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif* 11: 95-103, 1997.
49. Wester L, Michaelsson E, Holmdahl R, Olofsson T y Åkerström B. Receptor for  $\alpha_1$ -microglobulin on T lymphocytes: inhibition of antigen-induced interleukin-2 production. *Scand J Immunol* 48: 1-7, 1998.
- 20 50. Xiong J, Fischer WM, Inoue K, Nakahara M y Bauer CE. Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. *Science* 289: 1724-30, 2000.
51. Åkerström B, Flower DR y Salier JP. Lipocalins: unity in diversity. *Biochim Biophys Acta* 1482: 1-8, 2000.
- 25 52. Åkerström B y Lögdberg L.  $\alpha_1$ -microglobulin. En: *Lipocalins*. editado por Åkerström B, Borregaard N, Flower DR y Salier J-P. Georgetown, TX, USA: Landes Bioscience; 2006. págs. 110-20.
- 30 53. Åkerström B, Maghzal GJ, Winterbourn CC y Kettle AJ. The lipocalin  $\alpha_1$ -microglobulin has radical scavenging activity. *J Biol Chem* 282: 31493-503, 2007.



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Akerstrm, Bo et al

<120> Alfa-1-microglobulina para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con mitocondrias

<130> P81204108DK00

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 183

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe  
 1 5 10 15

Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser  
 20 25 30

Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr  
 35 40 45

Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser  
 50 55 60

Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu  
 65 70 75 80

Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asn  
 85 90 95

Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala  
 100 105 110

Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr  
 115 120 125

Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln  
 130 135 140

Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile  
 145 150 155 160

Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro  
 165 170 175

Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg  
 180

ES 2 599 034 T3

<210> 2  
 <211> 201  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu  
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu  
 20 25 30

Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile  
 35 40 45

Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val  
 50 55 60

Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met  
 65 70 75 80

Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala  
 85 90 95

Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys  
 100 105 110

Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu  
 115 120 125

Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr  
 130 135 140

Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu  
 145 150 155 160

Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp  
 165 170 175

Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln  
 180 185 190

Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg  
 195 200

<210> 3  
 <211> 549  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

ggccctgtgc caacgccgcc cgacaacatc caagtgcagg aaaacttcaa tatctctcgg

60

ES 2 599 034 T3

atctatggga agtgggtacaa cctggccatc ggttccacct gccctggct gaagaagatc 120  
 atggacagga tgacagtgag cacgctggtg ctgggagagg gcgctacaga ggcggagatc 180  
 agcatgacca gcactcgttg gcggaaggt gtctgtgagg agacgtctgg agcttatgag 240  
 aaaacagata ctgatgggag gtttctctat cacaaatcca aatggaacat aaccatggag 300  
 tcctatgtgg tccacaccac ctatgatgag tatgccattt ttctgaccaa gaaattcagc 360  
 cgccatcatg gaccacccat tactgccaaag ctctacgggc gggcgccgca gctgagggaa 420  
 actctcctgc aggacttcag agtgggtgcc caggggtggtg gcacccctga ggactccatc 480  
 ttcaccatgg ctgaccgagg tgaatgtgtc cctgggggagc aggaaccaga gcccatctta 540  
 atccccgaga 549

<210> 4  
 <211> 603  
 <212> **ADN**  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcgccct 60  
 gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagt caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120  
 ggaagtggg acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180  
 aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gaggcgcta cagaggcggg gatcagcatg 240  
 accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300  
 gatactgatg ggaggtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataacccat ggagtcctat 360  
 gtggtccaca ccacctatga tgagtatgcc attttctga ccaagaaatt cagccgccat 420  
 catggacca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag gaaactctc 480  
 ctgcaggact tcagagtggg tggccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540  
 atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600  
 aga 603

<210> 5  
 <211> 19  
 <212> **ARN**  
 <213> **Secuencia artificial**

<220>  
 <223> **para silenciar la expresión de alfa-1-microglobulina**

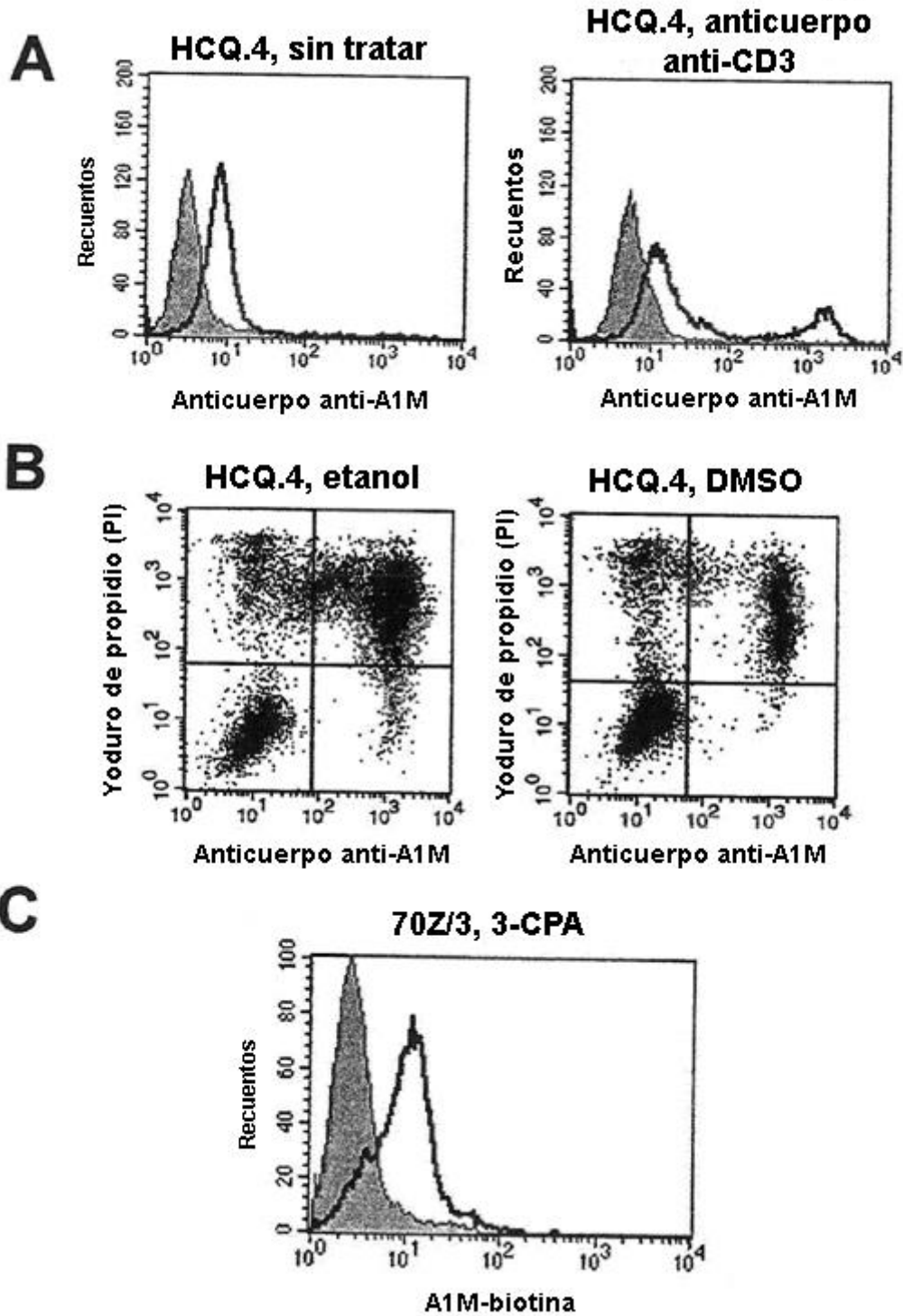
<400> 5  
 ccuauguggu ccacaccaa 19

**REIVINDICACIONES**

1. Alfa-1-microglobulina para su uso en el tratamiento de una enfermedad mitocondrial o para su uso en la reparación, restauración o mantenimiento de la función mitocondrial.
- 5 2. Alfa-1-microglobulina para su uso según la reivindicación 1, en la que la enfermedad mitocondrial se selecciona de la siguiente lista:
- 10 • enfermedad de Alpers (poliodistrofia infantil progresiva)
  - síndrome de Barth (cardiomiopatía infantil letal)
  - defectos de la beta-oxidación
  - 15 • cardiomiopatía
  - deficiencia de carnitina-acilcarnitina
  - deficiencia de carnitina
  - 20 • síndromes de deficiencia de creatina (síndromes de deficiencia de creatina cerebral (CCDS) incluye: deficiencia de guanidinoacetato metiltransferasa (deficiencia de GAMT), deficiencia de L-arginina:glicina amidinotransferasa (deficiencia de AGAT) y deficiencia de transportador de creatina relacionada con SLC6A8 (deficiencia de SLC6A8).
  - 25 • deficiencia de la coenzima Q10
  - deficiencia del complejo I (deficiencia de NADH deshidrogenasa (NADH-CoQ reductasa))
  - 30 • deficiencia del complejo II (deficiencia de succinato deshidrogenasa)
  - deficiencia del complejo III (deficiencia de ubiquinona-citocromo c oxidorreductasa)
  - 35 • deficiencia del complejo IV/deficiencia de COX (la deficiencia de citocromo c oxidasa se provoca por un defecto en el complejo IV de la cadena respiratoria)
  - deficiencia del complejo V (deficiencia de ATP sintasa)
  - deficiencia de COX
  - 40 • CPEO (síndrome de oftalmoplejía externa progresiva crónica)
  - deficiencia de CPT I
  - 45 • deficiencia de CPT II
  - ataxia de Friedreich (FRDA o FA)
  - encefalomiopatía
  - 50 • aciduria glutárica tipo II
  - KSS (síndrome de Kearns-Sayre)
  - 55 • acidosis láctica
  - LCAD (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga)
  - LCHAD
  - 60 • enfermedad o síndrome de Leigh (encefalomielopatía necrotizante subaguda)
  - LHON (neuropatía óptica hereditaria de Leber)
  - 65 • enfermedad de Luft

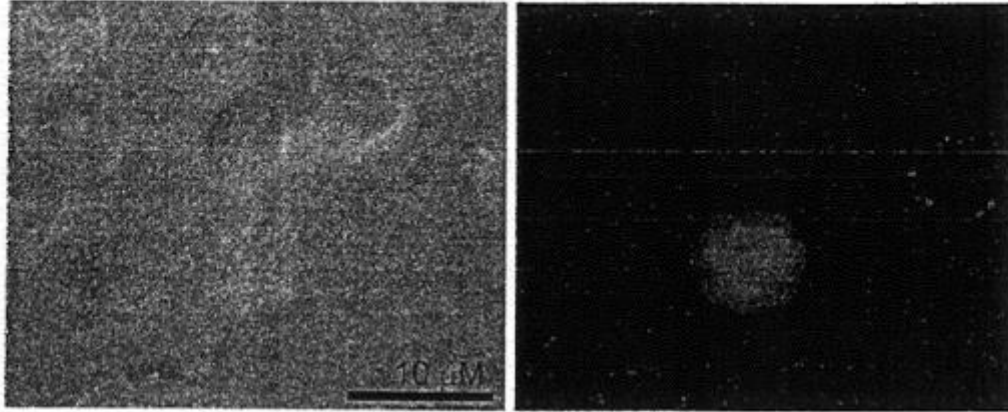
- MCAD (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media)
  - MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a accidente cerebrovascular)
  - 5 • MERRF (epilepsia mioclónica y enfermedad de fibras rojas rasgadas)
  - MIRAS (síndrome atáxico mitocondrial recesivo)
  - citopatía mitocondrial
  - 10 • depleción de ADN mitocondrial
  - encefalopatía mitocondrial incluye: encefalomiopatía, encefalomielopatía
  - 15 • miopatía mitocondrial
  - MNGIE (trastorno mioneurogastrointestinal y encefalopatía)
  - NARP (neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa)
  - 20 • síndrome de Pearson
  - deficiencia de piruvato carboxilasa
  - 25 • deficiencia de piruvato deshidrogenasa
  - mutaciones de POLG
  - deficiencias de la cadena respiratoria
  - 30 • SCAD (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta)
  - SCHAD
  - 35 • VLCAD (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga)
3. Alfa-1-microglobulina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el tratamiento o la profilaxis de trastornos de la cadena respiratoria.
  - 40 4. Alfa-1-microglobulina para su uso según la reivindicación 3, en la que los trastornos de la cadena respiratoria implican defectos del complejo I, II, III, IV o V.
  5. Alfa-1-microglobulina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el tratamiento o la profilaxis de disfunciones mitocondriales en niños o adultos jóvenes.
  - 45 6. Alfa-1-microglobulina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el tratamiento de prevención de enfermedad de Alpers, síndrome de Barth, ataxia de Friedreich, KSS, enfermedad o síndrome de Leigh, LHON, MELAS, MERRF, MIRAS y NARP.
  - 50 7. Alfa-1-microglobulina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el tratamiento o la profilaxis de disfunciones mitocondriales en mujeres.
  8. Alfa-1-microglobulina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el tratamiento o la profilaxis de daño o disfunción de retina o enfermedades oculares asociadas con defecto(s) o disfunción(es) mitocondrial(es).
  - 55

Figura 1

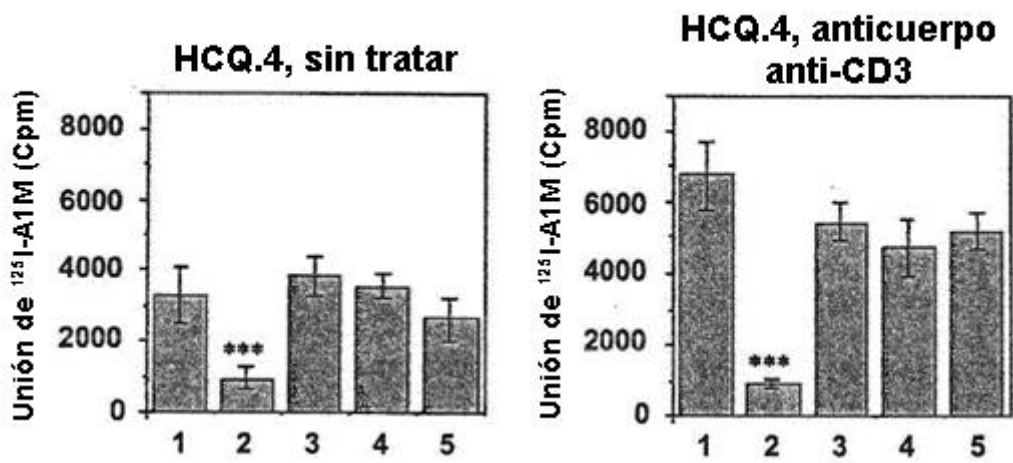


**D**

**K562, hemo**



**E**



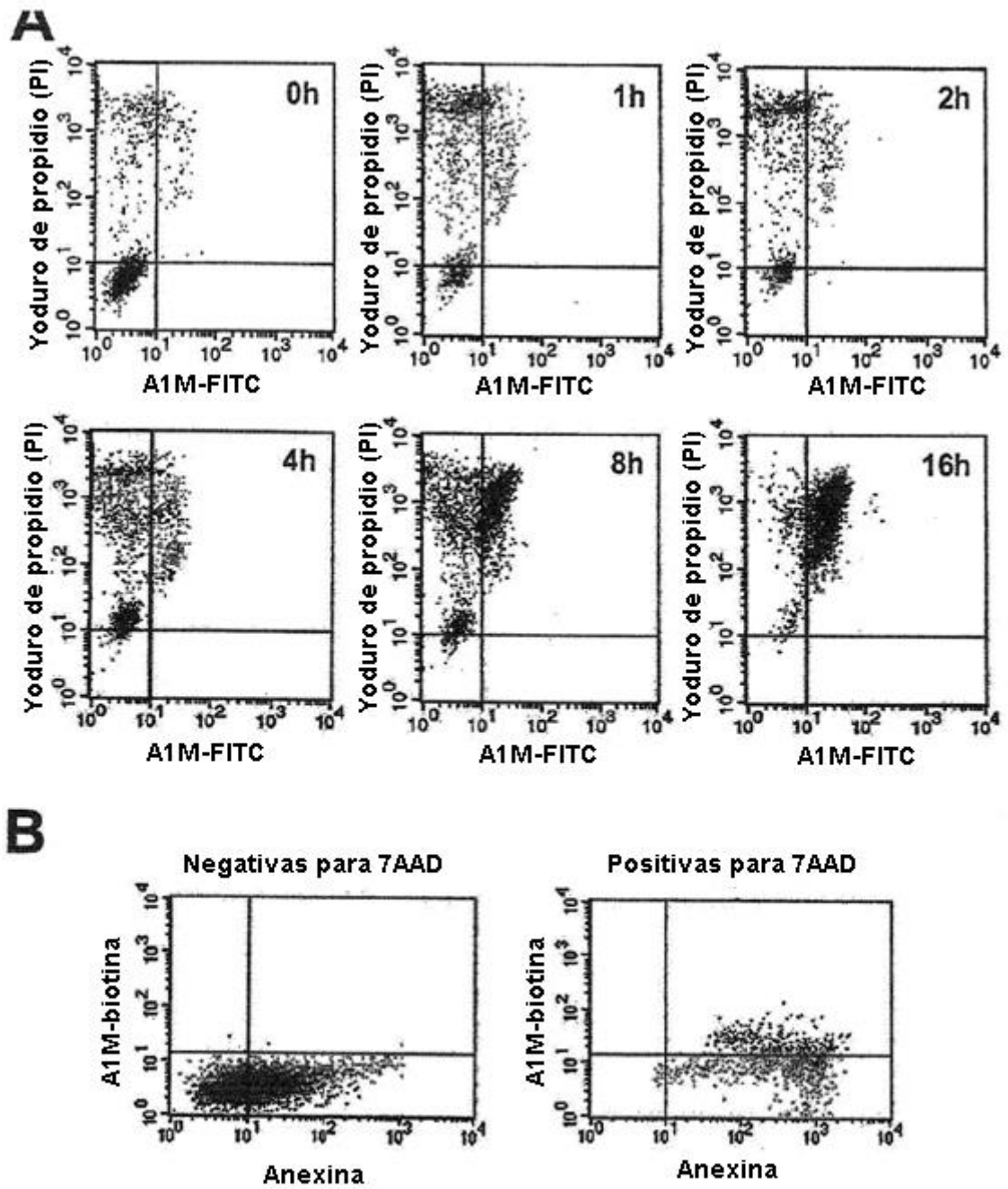


Figura 2



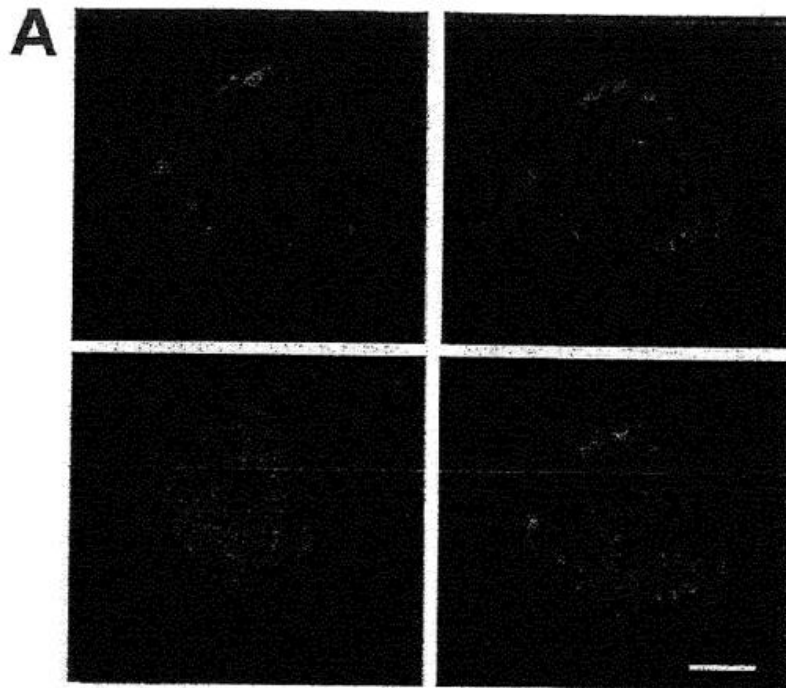
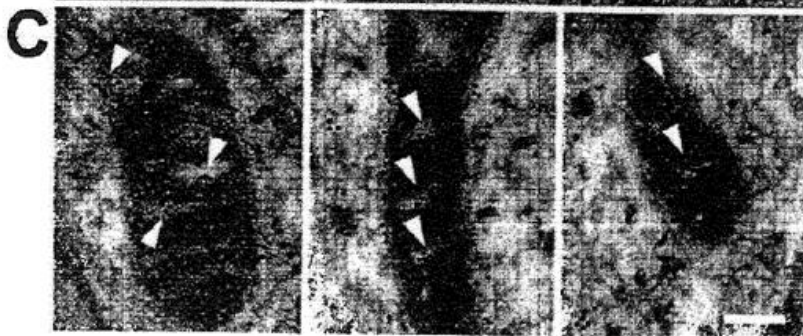
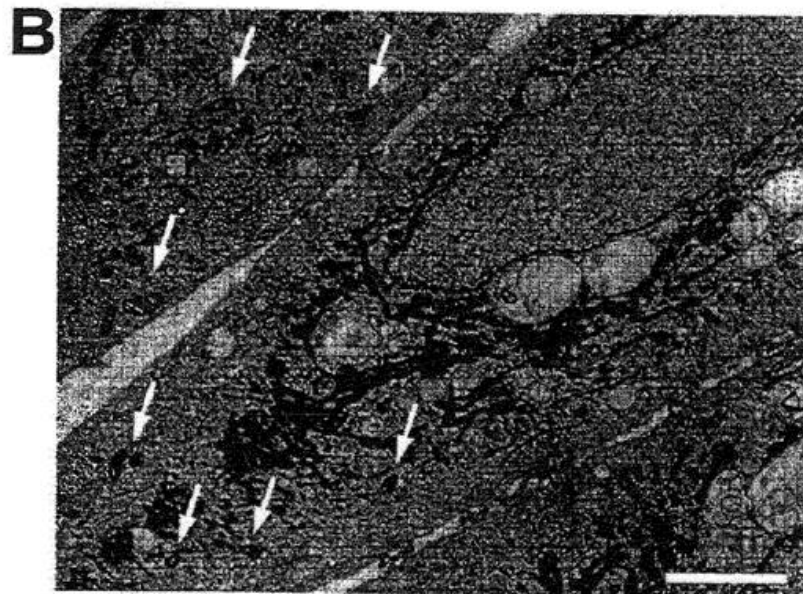


Figura 3



**Figura 4**

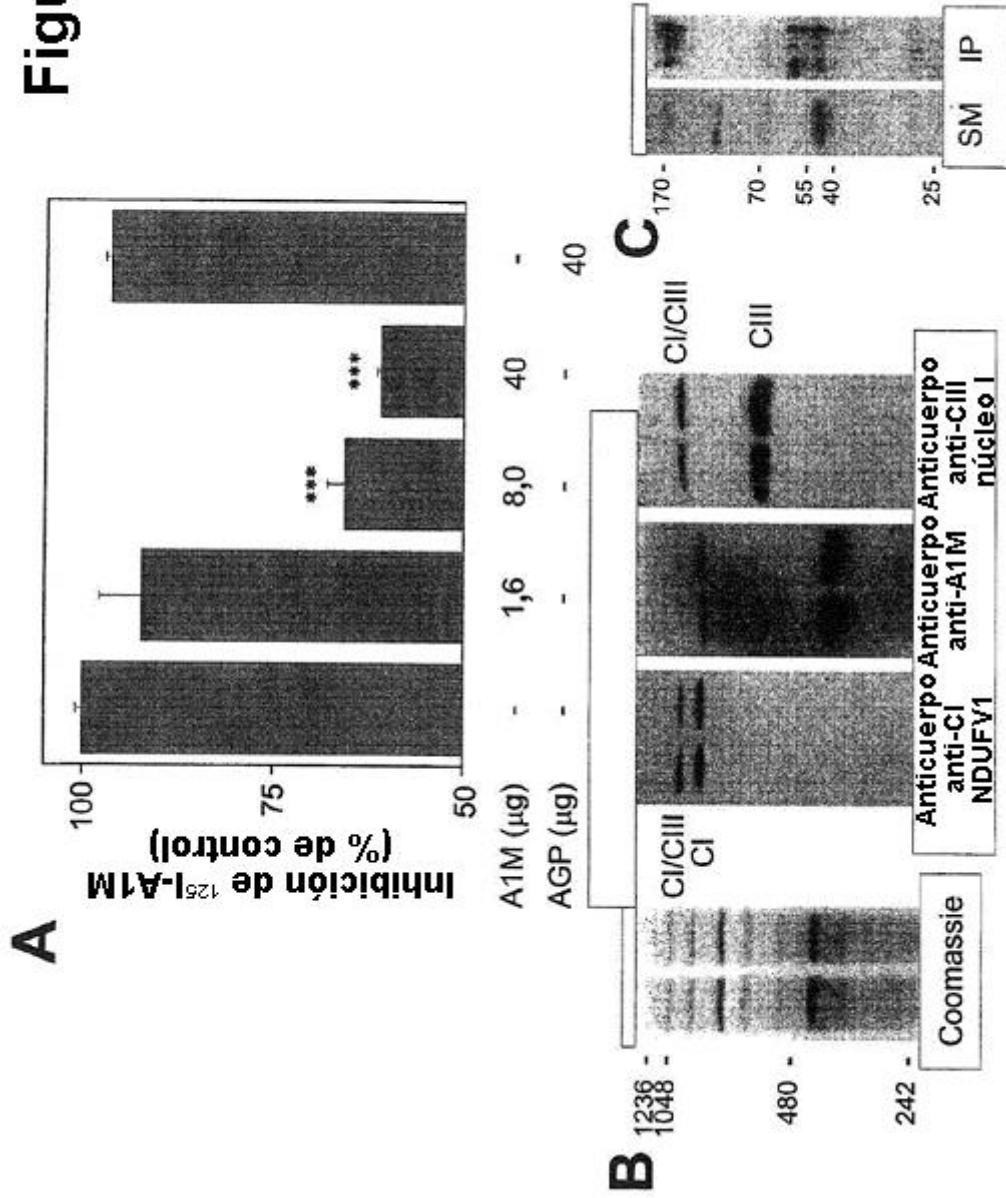


Figura complementaria 1

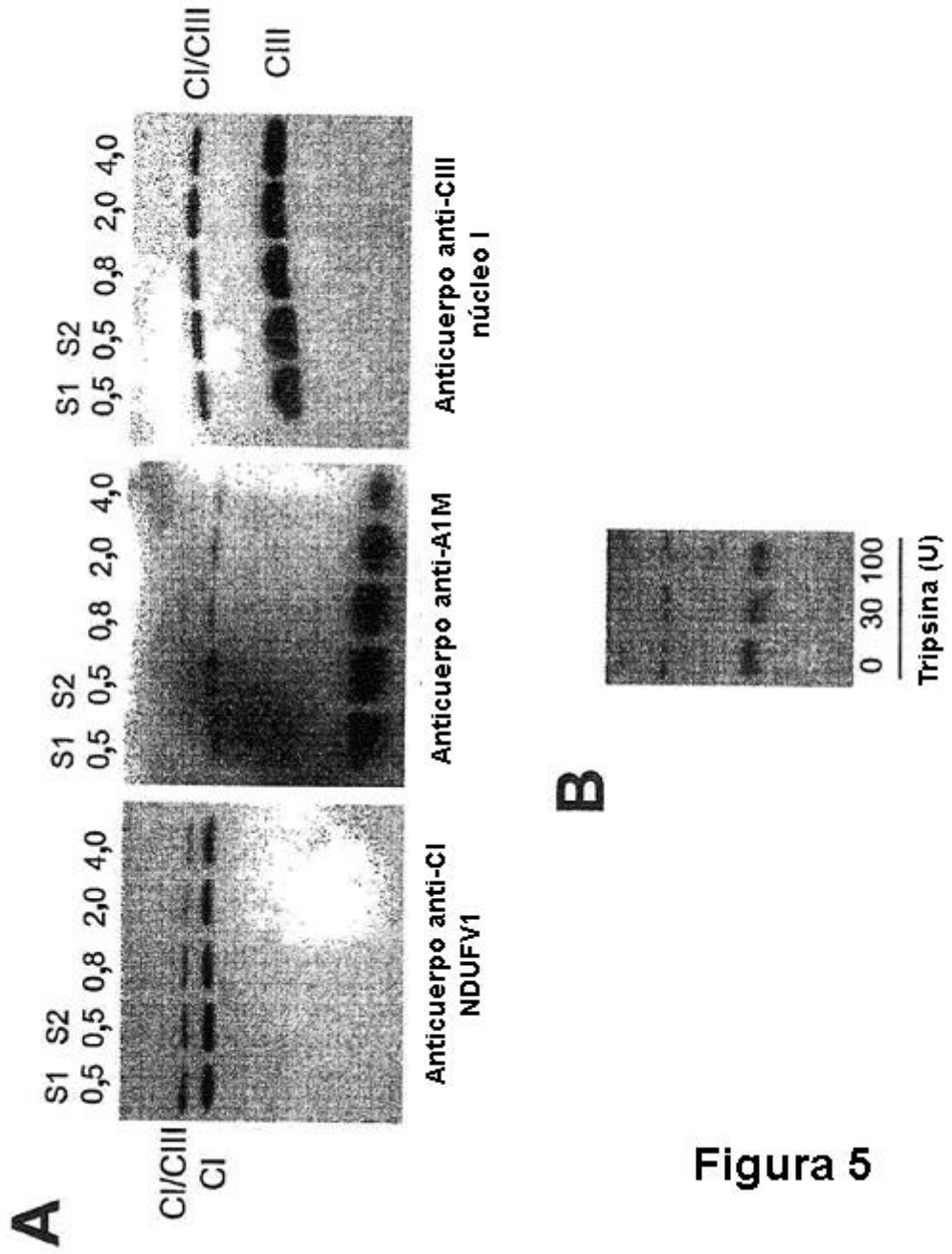


Figura 5

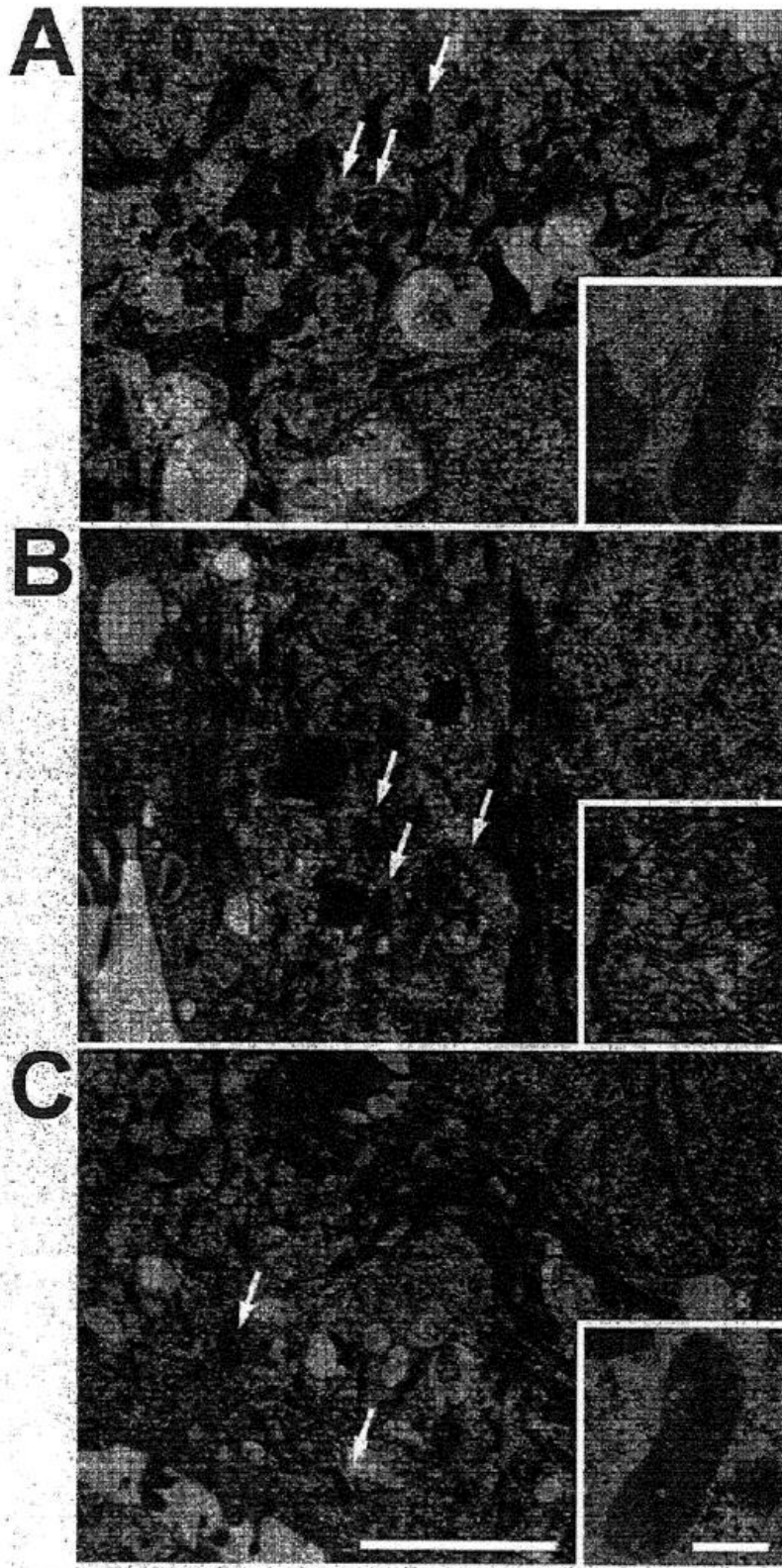


Figura 6

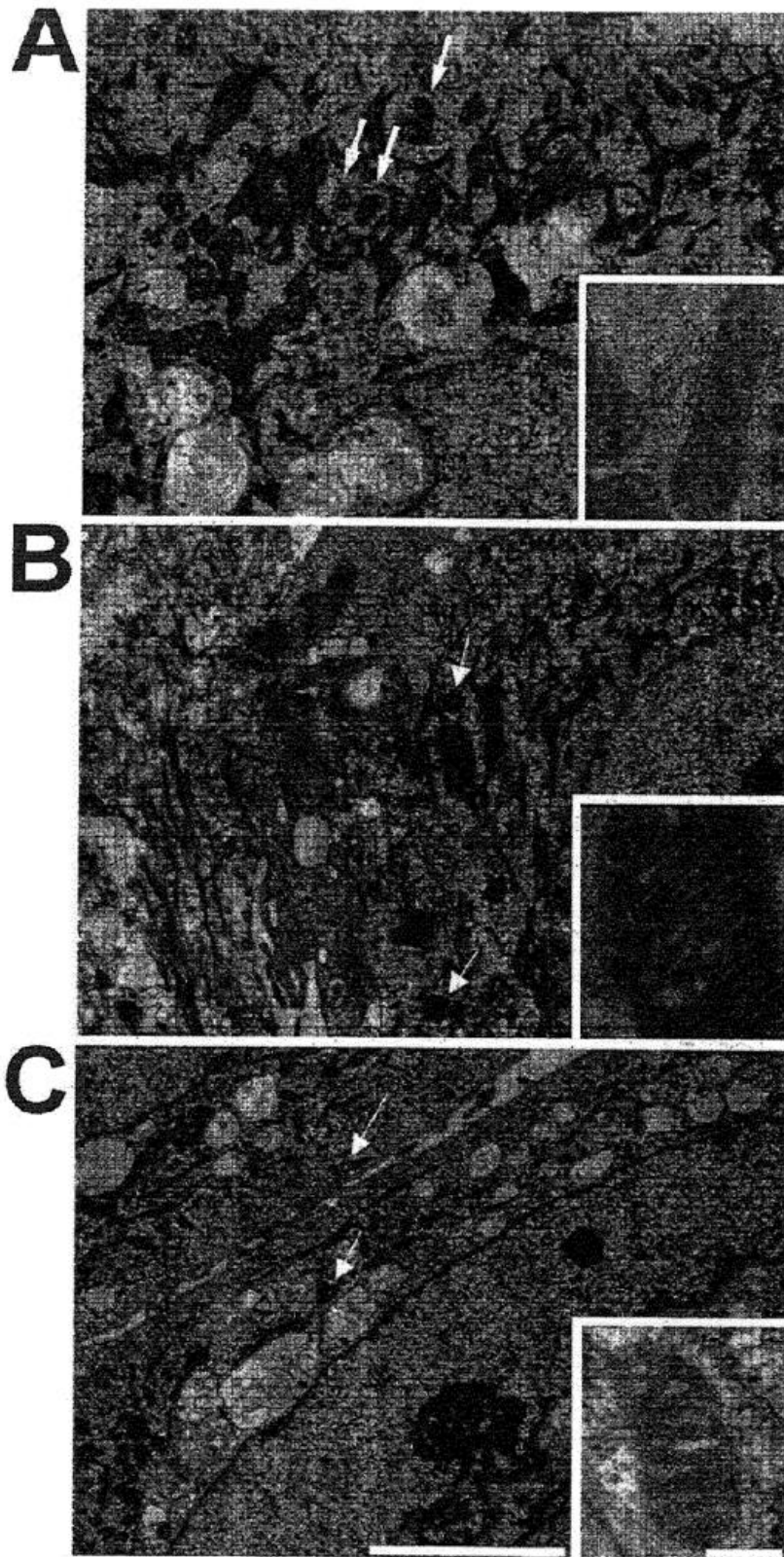
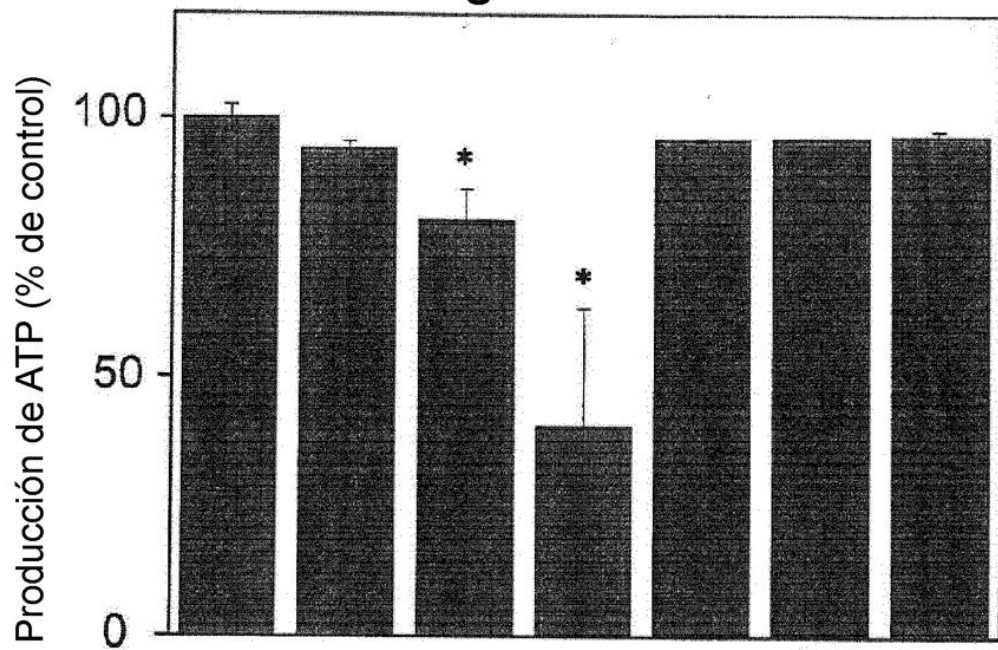


Figura 7

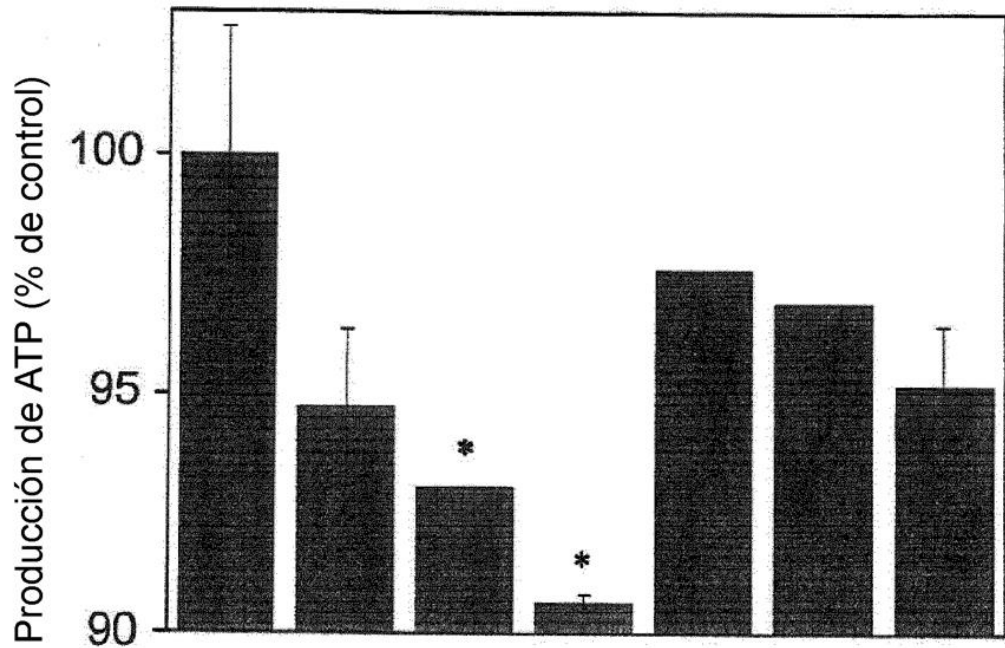
**A**

**Figura 8**



Hemo (μM)	-	1,0	5,0	20	1,0	5,0	10
A1M (μM)	-	-	-	-	10	10	10

**B**



H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	-	20	100	250	20	100	250
A1M (μM)	-	-	-	-	10	10	10

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> Akerstrm, Bo et al

<120> **Alfa-1-microglobulina para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con mitocondrias**

<130> P81204108DK00

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 183

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe  
 1 5 10 15  
 Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser  
 20 25 30  
 Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr  
 35 40 45  
 Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser  
 50 55 60  
 Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu  
 65 70 75 80  
 Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asn  
 85 90 95  
 Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala  
 100 105 110  
 Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr  
 115 120 125  
 Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln  
 130 135 140  
 Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile  
 145 150 155 160  
 Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro  
 165 170 175  
 Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg  
 180

**Figura 9**

<210> 2  
 <211> 201  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu  
 1 5 10 15  
 Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu  
 20 25 30  
 Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile  
 35 40 45  
 Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val  
 50 55 60  
 Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met  
 65 70 75 80  
 Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala  
 85 90 95  
 Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys  
 100 105 110  
 Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu  
 115 120 125  
 Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr  
 130 135 140  
 Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp  
 165 170 175  
 Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln  
 180 185 190  
 Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg  
 195 200

<210> 3  
 <211> 549  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

ggccctgtgc caacgccgcc cgacaacatc caagtgcagg aaaacttcaa tatctctcgg

60



ES 2 599 034 T3

atctatggga agtgggtacaa cctggccatc ggttccacct gcccctggct gaagaagatc 120  
atggacagga tgacagtgag cacgctgggtg ctgggagagg gcgctacaga ggcggagatc 180  
agcatgacca gcactcgttg gcggaaaggt gtctgtgagg agacgtctgg agcttatgag 240  
aaaacagata ctgatgggag gtttctctat cacaaatcca aatggaacat aaccatggag 300  
tcctatgtgg tccacaccac ctatgatgag tatgccattt ttctgaccaa gaaattcagc 360  
cgccatcatg gaccacccat tactgccaag ctctacgggc gggcgccgca gctgagggaa 420  
actctctcgc aggacttcag agtgggtgcc cagggtgtgg gcatccctga ggactccatc 480  
ttcaccatgg ctgaccgagg tgaatgtgtc cctggggagc aggaaccaga gcccatttta 540  
atccccgaga 549

<210> 4  
<211> 603  
<212> **ADN**  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcgccct 60  
gtgccaacgc cggccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120  
gggaagtggg acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180  
aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gaggcgcta cagaggcggg gatcagcatg 240  
accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300  
gatactgatg ggaggtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataacat ggagtcctat 360  
gtggtccaca ccacctatga tgagtatgcc attttctga ccaagaaatt cagccgcat 420  
catggacca ccattactgc caagctctac gggcgggagc cgcagctgag ggaaactctc 480  
ctgcaggact tcagagtggg tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540  
atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccc 600  
aga 603

<210> 5  
<211> 19  
<212> **ARN**  
<213> **Secuencia artificial**

<220>  
<223> **para silenciar la expresión de alfa-1-microglobulina**

<400> 5  
ccuauguggu ccacaccaa 19

Figura 10

