

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2009.02.03</b>	(73) Titular(es): <b>YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD. HI-TECH PARK, EDMOND J. SAFRA CAMPUS GIVAT-RAM, JERUSALEM P.O. BOX 39135 JERUSALEM 91390 IL HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES AND DEVELOPMENT LTD. IL</b>
(30) Prioridade(s): <b>2008.02.04 US 25931 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2011.03.30</b>	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2015.10.28 043/2016</b>	(72) Inventor(es): <b>HAYA GALSKI-LORBERBOUM IL MATAN RAPOPORT IL ORIY ELPELEG IL ANN SAADA IL</b>
	(74) Mandatário: <b>MARIA TERESA DELGADO AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA PT</b>

(54) Epígrafe: **MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS  
MITOCONDRIAIS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO DIZ RESPEITO EM GERAL A NOVAS PROTEÍNAS DE FUSÃO QUE COMPREENDEM UMA FRAÇÃO DE TRANSFERÊNCIA PARA A MEMBRANA E UMA FRAÇÃO ENZIMÁTICA. A PRESENTE INVENÇÃO DIZ RESPEITO AINDA A UM MÉTODO DE TRATAR DOENÇAS UTILIZANDO AS DITAS PROTEÍNAS DE FUSÃO.

**RESUMO****“MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS  
MITOCONDRIAIS”**

A presente invenção diz respeito em geral a novas proteínas de fusão que compreendem uma fração de transferência para a membrana e uma fração enzimática. A presente invenção diz respeito ainda a um método de tratar doenças utilizando as ditas proteínas de fusão.

## DESCRIÇÃO

### **“MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS MITOCONDRIAIS”**

#### **CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção diz respeito, em geral, a proteínas de fusão que compreendem uma fração de transferência para a membrana e uma fração enzimática para utilização em métodos de tratar doença.

#### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

##### **Distúrbios metabólicos mitocondriais**

As mitocôndrias desempenham um papel importante e crítico na homeostase celular. Elas participam na sinalização intracelular, apoptose e realizam numerosas tarefas bioquímicas, tais como a oxidação do piruvato, o ciclo de Krebs e o metabolismo de aminoácidos, ácidos gordos, nucleotídeos e esteroides. Uma tarefa crucial é o seu papel no metabolismo de energia celular.

Isto inclui a  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos e produção de ATP através da cadeia de transporte de eletrões e o sistema de fosforilação oxidativa (Chinnery 2003).

A cadeia respiratória mitocondrial consiste em cinco complexos de proteínas com multi-subunidades incorporadas na membrana interior compreendendo: complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase), complexo II (succinato-ubiquinona oxidoreductase), complexo III (ubiquinol-ferricitocromo c oxidoreductase), complexo IV (citocromo c oxidoreductase) e complexo V (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase).

A maioria dos aproximadamente 900 produtos génicos na mitocôndria é codificada pelo ADN nuclear (ADNn); ADNmt contém apenas 13 genes codificadores de proteína. A maioria destes polipeptídeos são sintetizados com uma sequência de direcionamento mitocondrial (MTS) que permite a sua importação a partir do citoplasma para a mitocôndria através da maquinaria

de translocação (TOM/TIM). Após entrar na mitocôndria, a MTS é reconhecida e excisada, permitindo o processamento adequado e, se necessário, a montagem em complexos enzimáticos mitocondriais (Chinnery, 2003).

### **Deficiência em LAD**

Uma destas proteínas importadas é a lipoamida desidrogenase (LAD) (EC 1.8.1.4) que é a terceira subunidade catalítica (E3) nos três complexos enzimáticos na matriz mitocondrial, crucial para o metabolismo de açúcares e aminoácidos - os complexos ácido  $\alpha$ -ceto desidrogenase. Isto inclui o complexo desidrogenase piruvato (PDHC), complexo desidrogenase  $\alpha$ -cetogluturato (KGDHC) e complexo desidrogenase cetoácido de cadeia ramificada (BCKDHC). LAD também é um componente (L-proteína) do sistema de clivagem da glicina na mitocôndria (Chinnery, 2003; Brautigam, 2005).

Defeitos em qualquer uma das numerosas vias bioquímicas mitocondriais podem causar doença mitocondrial. Uma tal doença mitocondrial é a deficiência em lipoamida desidrogenase (LAD) (Elpeleg 1997). LAD é uma oxidorreductase dissulfido flavoproteína que catalisa a re-oxidação reversível da fração di-hidrolipóilo ligada a proteína com NAD<sup>+</sup> a servir como o seu aceitador final de eletrão (Vettakkorumakankav 1996). O precursor de LAD é sintetizado com uma sequência MTS 35AA N-terminal. Um número significativo de pacientes foi diagnosticado com deficiência em LAD (Berger 1996, Elpeleg 1997, Shaag 1999). Este distúrbio herdado recessivo autossômico resulta em perturbações metabólicas extensivas devido à redução nas atividades dos três complexos desidrogenase  $\alpha$ -cetoácido. Sintomas incluem acidemia láctica, disfunção do ciclo de Krebs e degradação debilitada de aminoácidos de cadeia ramificada. O curso clínico da deficiência em LAD pode apresentar-se na infância com uma doença neurológica de severidade variada ou mais tarde na vida com episódios recorrentes de falha hepática ou mioglobínúria (Shaag, 1999).

A base molecular da deficiência em LAD foi elucidada e a correlação genótipo-fenótipo é evidente (Shaag 1999). A maioria das mutações está associada ao curso neurodegenerativo severo, por exemplo D479V, P488L, K72E, R495G, Y35X, E375K e uma deleção na estrutura de Gly136. A maioria dos pacientes morre no início da infância. Em homocigóticos para a mutação G229C, uma mutação comum em Judeus Asquenazes (taxa portadora ~ 1:94), o sistema nervoso central é poupado entre episódios. A heterocigosidade do composto para as mutações G229C e Y35X está associada com doença hepática episódica e envolvimento neurológico moderado (Shaag, 1999).

### **Deficiência no Complexo I**

O Complexo I é o principal ponto de entrada dos elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e contribui para o estabelecimento de um gradiente de prótons necessário para a síntese de ATP. Complexo I é o mais complicado dos complexos da cadeia respiratória, contendo 45 subunidades diferentes em mamíferos, formando um complexo de ~1 MDa. Das subunidades do Complexo I, sete são codificadas pelo ADN mitocondrial (ADNmt) ao passo que as restantes são codificadas pelos genes nucleares, traduzidas no citosol e importadas para os organelos através das translocases da membrana interior e exterior. O Complexo I tem uma configuração em forma de L bipartida que consiste num braço de matriz periférica e num braço de membrana. A deficiência no Complexo I isolada é o mais comum dos distúrbios metabólicos mitocondriais, sendo responsável por um terço de todos os casos de deficiência da cadeia respiratória. Mutações nos genes de ADNmt são detetadas em apenas 20% dos pacientes, o que sugere que a maioria dos pacientes com deficiências do complexo I isoladas transporta mutações nos genes nucleares que codificam subunidades do Complexo I.

Presentemente, não existe cura para os distúrbios metabólicos mitocondriais genéticos. O tratamento é maioritariamente paliativo.

### **Terapêutica de substituição de enzimas**

A terapêutica de substituição de enzimas (ERT) é uma abordagem terapêutica para distúrbios metabólicos através da qual a enzima ausente ou deficiente é fabricada artificialmente, purificada e dada por via intravenosa ao paciente numa base regular. A ERT foi aceite como o tratamento de eleição para doenças do armazenamento lisossomal metabólico, incluindo doença de Gaucher (Sly WS. Enzyme replacement therapy: from concept to clinical practice. *Acta Paediatr, Suppl 91(439):71-8, 2002*), doença de Fabry (Desnick RJ et al, Fabry disease: clinical spectrum and evidence-based enzyme replacement therapy. *Nephrol Ther, Suppl 2:S172-85, 2006*) e variantes atenuadas de mucopolissacaridoses (MPS 1)

Scarpa M et al, Mucopolysaccharidosis VI: the Italian experience. *Eur J Pediatr. 7 de janeiro de 2009*). Contudo, nunca se mostrou, pensou ou mesmo sugeriu que a ERT fosse útil no tratamento de distúrbios envolvendo componentes enzimáticos de complexos de enzimas multi-componentes, tais como o PDHC. Além disso, a incapacidade das enzimas administradas por via intravenosa de penetrarem a barreira sangue-cérebro limita seriamente a aplicação desta abordagem para tratamento de outros distúrbios metabólicos que envolvem o sistema nervoso central (Brady, 2004).

Uma abordagem para entregar proteínas às células é a fusão com domínios de transdução de proteínas (PTDs). A maioria dos PTDs são péptidos catiónicos (11-34 aminoácidos) que interagem com os fosfolípidos carregados negativamente e componentes carboidrato da membrana celular Futaki 2001. PTDs permitem a passagem de uma proteína através das membranas celulares de uma maneira que não é completamente compreendida, mas que se pensa não ser através de fagocitose ou endocitose de poço de clatrina mediada por recetor. O PTD mais bem conhecido e utilizado é o péptido transativador da transcrição (TAT) HIV-1. O péptido TAT é uma porção rica em arginina e lisina com 11 aminoácidos (resíduos 47-57) da proteína Tat HIV-1 com a sequência

apresentada na SEQ. ID N.º 10 (Kuppuswamy 1989). As proteínas de fusão TAT podem ser introduzidas em células cultivadas, tecidos intactos e tecidos vivos e atravessam a barreira sangue-cérebro (BBB) quando injetadas em ratinhos (Futaki 2001; Del Gaizo 2003a, Del Gaizo 2003b).

As proteínas de fusão TAT também atravessam membranas mitocondriais. Quando uma MTS está presente, uma proteína fluorescente verde (GFP) é retida na matriz mitocondrial ao longo do tempo e persiste nos tecidos de ratinhos injetados durante vários dias (Del Gaizo, V et al. Targeting proteins to mitochondria using TAT. *Mol. Genet. Metab* 80: 170-180, 2003; Del Gaizo, V et al. A novel TAT-mitochondrial signal sequence fusion protein is processed, stays in mitochondria, and crosses the placenta. *Mol. Ther.* 7: 720-730, 2003). O documento WO 05/042560 para Payne revela, além disso, a utilização de TAT para dirigir frataxina para a mitocôndria, mas a frataxina translocada não mostra ter qualquer funcionalidade.

O documento US 20060211647 para Khan revela a utilização de um PTD para introduzir GFP e fator de transcrição A (TFAM) para a mitocôndria.

O documento WO 05/001062 para Khan revela o direcionamento de ácidos nucleicos para a mitocôndria utilizando um vetor que compreende um domínio de transdução de proteína, Arg11 (SEQ. ID N.º 38) para a proteína principal de um vetor e entrega de GFP e proteína Fluorescente vermelha utilizando o mesmo.

Rapoport M. et al., *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, agosto de 2006, Volume 29, Suplemento N.º. 1, página 15, descreve um ERT para doenças mitocondriais, tais como deficiência em LAD, utilizando uma proteína de fusão que compreende LAD e o péptido TAT HIV. A LAD entregue nas células e suas mitocôndrias substitui a enzima endógena mutada. A TAT-LAD é naturalmente incorporada em complexos desidrogenase de  $\alpha$ -cetoácidos.

Angdisen J. et al., *Current Drug Targets. Immune, Endocrine and metabolic disorders*, março de 2005, Volume 5, N.º

1, páginas 27-40 refere-se a defeitos na proteína trifuncional mitocondrial (MTP) e descreve uma construção da proteína fluorescente verde (GFP) fundida com TAT e MTS (sequência de direcionamento mitocondrial), que está localizada nas mitocôndrias da célula.

Toro A. et al., *The journal of clinical Investigation*, outubro de 2006, Volume 116, N.º 10, páginas 2717, descreve entrega intracelular mediada por TAT da enzima citoplasmática purina nucleosídeo fosforilase, a vários tecidos/órgãos.

Khan S.M. et al., *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, agosto de 2004, Volume 36, N.º 4, páginas 387-393 refere-se a terapêutica de genes e revela tecnologia de transdução (protofeção) que permite a inserção e expressão de genes mitocondriais humanos nas mitocôndrias das células vivas.

Nenhuma das referências anteriores revela ou sugere que quantidades suficientes de uma enzima anexada a um PTD podem, depois de atravessar ambas as membranas celular e mitocondrial, reter não só atividade enzimática, mas conformação apropriada para formar um componente funcional de um complexo enzimático multi-componente ou substituir função fisiológica em falta num distúrbio metabólico mitocondrial. Além disso, nenhuma das referências anteriores revela ou sugere que tal estratégia funcionaria, apesar da presença de uma enzima mutada (alteração de sentido) enzima no complexo, que se esperaria que bloqueasse a integração de quantidades significativas da enzima funcional.

#### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção providencia uma proteína de fusão para utilização num método de tratamento de um distúrbio mitocondrial num indivíduo, compreendendo dita proteína de fusão um domínio de transdução de proteína (PTD) fundido com um componente funcional de uma enzima mitocondrial e uma sequência de direcionamento de mitocôndria (MTS), em que dita MTS está situada entre dito PTD e dito componente funcional e



em que dita MTS é uma MTS de outra enzima mitocondrial que é codificada por um gene nuclear, em que dita enzima mitocondrial é uma enzima de um complexo enzimático multi-componente mitocondrial e em que dito domínio de transdução de proteína é um péptido TAT, em que dito tratamento compreende administrar dita proteína de fusão a dito indivíduo e é um tratamento contínuo prolongado para uma doença crónica ou compreende uma única ou umas poucas administrações para tratamento de uma condição patológica aguda.

É revelada uma composição farmacêutica que compreende um veículo farmacologicamente aceitável e como um ingrediente ativo uma proteína de fusão que compreende um domínio de transdução de proteína fundido a um componente funcional de uma enzima mitocondrial.

A composição farmacêutica é para o tratamento de um distúrbio mitocondrial.

Também é revelada a utilização de uma proteína de fusão que compreende um domínio de transdução de proteína fundido a um componente funcional de uma enzima mitocondrial, para a preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio mitocondrial.

A proteína de fusão compreende uma sequência de direcionamento de mitocôndria (MTS). A MTS está presente entre o domínio de transdução de proteína e o componente funcional da enzima mitocondrial.

Também é revelado um método para o tratamento de um distúrbio mitocondrial, compreendendo administrar a um indivíduo em necessidade de tal tratamento uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma proteína de fusão que compreende um domínio de transdução de proteína fundido com um componente funcional de uma enzima mitocondrial.

O termo "**proteína de fusão**" no contexto da invenção diz respeito a uma sequência de aminoácidos, predominantemente (mas não necessariamente) ligados uns aos outros por ligações peptídicas, em que uma parte da sequência é derivada (isto é,

tem semelhança de sequência com sequências) de uma origem (nativa ou sintética) e outra parte da sequência é derivada de uma ou mais outra origem. Este termo refere-se à origem das sequências, como na prática quando a proteína é preparada por técnicas recombinantes não existe distinção entre as partes "fundidas".

O termo "**fundido**" de acordo com a proteína de fusão da invenção, refere-se ao facto das sequências das duas origens, preferencialmente também as sequências do domínio de translocação mitocondrial, MTS e enzima mitocondrial, serem ligados um ao outro por ligações covalentes. A fusão pode ser por conjugação química tal como utilizando metodologias do estado da arte utilizadas para conjugar péptidos. Contudo, de acordo com uma modalidade preferida, a fusão é preferencialmente feita por técnicas recombinantes, isto é, pela construção de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica toda a proteína de fusão (codificando ambas as secções) de modo que essencialmente todas as ligações são ligações peptídicas. Tais todas proteínas de fusão contendo ligações peptídicas recombinantemente têm a vantagem de que o produto apresenta maior homogeneidade quando comparado com moléculas quiméricas conjugadas quimicamente.

O termo "**domínio de transdução de proteína (PTD)**" refere-se a qualquer sequência de aminoácidos capaz de causar o transporte de um péptido, sequência ou composto anexado a ele através de membranas celulares independentemente da entrada mediada por recetor. Em particular, é uma sequência que pode causar o transporte através de ambas as membranas citoplasmática e mitocondrial. Estes são péptidos catiónicos caracterizados por estarem fortemente carregados positivamente; ricos em aminoácidos positivos, tais como arginina ou lisina.

Tipicamente estes domínios são péptidos catiónicos com um comprimento de 11-34 aminoácidos.

O PTD da proteína de fusão para utilização da presente

invenção é um péptido transativador da transcrição (TAT). Um exemplo não limitante é o domínio da proteína TAT HIV-1 (SEQ. ID N.º 10).

O termo "**enzima mitocondrial**" refere-se a uma enzima que é essencial para uma atividade biológica da mitocôndria. O termo "**complexo enzimático mitocondrial**" refere-se a uma enzima que forma um complexo com outras enzimas, formando um complexo que é essencial para uma atividade biológica da mitocôndria. Tipicamente, estas são enzimas ou complexos de enzimas que, quando carecem ou mutados em pelo menos uma subunidade, causa um distúrbio mitocondrial.

Um exemplo preferido específico é a lipoamida desidrogenase (LAD), que é uma flavoproteína dissulfido oxidoreductase que catalisa a re-oxidação reversível da fração di-hidrolipoílo ligada a proteína, com NAD<sup>+</sup> a server como o seu aceitador de eletrões final.

"LAD" ou di-hidrolipoamida Desidrogenase, conforme utilizado aqui, refere-se a um gene também conhecido como DLD, tcag7.39, DLDH, E3, GCSL, LAD, PHE3 e com N.º de acesso do banco de genes NG\_008045 e EC número="1.8.1.4". Uma sequência de aminoácidos representativa de LAD é apresentada na SEQ. ID N.º 16 (N.º de acesso do banco de genes NP\_000099).

Noutra modalidade, a enzima mutante cuja atividade é fornecida por uma proteína de fusão para utilização da presente invenção é selecionada do grupo que consiste na subunidade alfa da 2-oxoisovalerato desidrogenase (desidrogenase cetoácido de cadeia ramificada Ela) (N.º de acesso da base de dados de proteínas NCBI P12694; OMIM:248600), subunidade beta da 2-oxoisovalerato desidrogenase (desidrogenase cetoácido de cadeia ramificada Elp; P21953), Acil-CoA desidrogenase, específica de cadeia média (P11310; OMIM:201450), Acil-CoA desidrogenase, específica de cadeia muito longa (P49748; OMIM:201475), subunidade alfa da enzima trifuncional (3 hidroxiacil CoA Desidrogenase de cadeia longa ou LCHAD) (P40939; OMIM:609015) (HADHA), subunidade beta da enzima

trifuncional (Hidroxiacil-CoA Desidrogenase/3-cetoacil-CoA Tiolase/Enoil-CoA Hidratase (P55084) (HADHB)), subunidade beta do componente E1 da Piruvato desidrogenase (P11177; OMIM:208800) e subunidade alfa do componente E1 da Piruvato desidrogenase (P08559; OMIM:312170).

Cada enzima representa uma modalidade separada da proteína de fusão para utilização da presente invenção.

O termo "**componente funcional**" refere-se ao facto de que a enzima, conforme descrita aqui, ter uma atividade enzimática quando presente na mitocôndria como uma parte de um complexo enzimático (com outras enzimas, co-fatores ou proteínas). Numa modalidade, o componente funcional é a sequência inteira da enzima. Noutra modalidade, o componente funcional é um domínio (fragmento) suficiente para realizar a atividade enzimática da enzima, seja isoladamente ou como parte de um complexo, conforme apropriado. Noutra modalidade, o componente funcional é um derivado mutado em que um ou mais dos resíduos de aminoácidos nativos foi deletado, substituído ou modificado enquanto mantendo ainda a funcionalidade enzimática do componente (isolado ou como parte de um complexo). Este termo também se refere a precursores das enzimas que na célula ou na mitocôndria são convertidas numa enzima funcional ou são montadas para formar um complexo enzimático funcional. Noutra modalidade, o termo refere-se a qualquer fragmento da enzima que compreende o domínio catalítico da mesma, em que a conformação do fragmento em condições fisiológicas é tal que a atividade enzimática do domínio catalítico é mantida. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

O termo "**complexo enzimático multi-componente**" refere-se a um grupo de pelo menos duas enzimas diferentes montadas juntas numa razão específica que funciona de uma forma coordenada para catalisar uma série de reações. A função de um complexo enzimático multi-componente está dependente da sua estrutura; assim, as enzimas que compõem o complexo têm de caber

fisicamente juntas na configuração apropriada para catalisar de forma eficiente a série de reações. Exemplos não limitantes de complexos de enzimas multi-componentes mitocondriais são o complexo desidrogenase piruvato (PDHC), complexo  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (KGDHC) e complexo desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada (BCKDHC) (aqueles listados até agora contêm LAD), os complexos da cadeia respiratória e aqueles envolvidos na  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos e no ciclo da ureia. Os exos da cadeia respiratória são complexo I (NADH-ubiquinona oxidorreductase), complexo II (succinato-ubiquinona oxidorreductase), complexo III (ubiquinol-ferricitocromo c oxidorreductase), complexo IV (citocromo c oxidorreductase) e complexo V (F1F0 ATPase).

Cada complexo enzimático multi-componente representa uma modalidade separada da proteína de fusão para utilização da presente invenção.

O termo "**sequência de direcionamento mitocondrial (MTS)**" refere-se a qualquer sequência de aminoácidos capaz de causar o transporte de um péptido, sequência ou composto anexado a ele para a mitocôndria. Noutra modalidade, a MTS é uma MTS humana. Noutra modalidade, a MTS é de outra espécie. Exemplos não limitantes de tais sequências são a MTS LAD humana (SEQ. ID N.º 39), a MTS do produto génico C6ORF66 (SEQ. ID N.º 9) e as MTS's da desidrogenase malato mitocondrial humana (SEQ. ID N.º 40), OGG1 (SEQ. ID N.º 49) e GLUD2 (SEQ. ID N.º 50). Exemplos não limitantes adicionais de sequências MTS são a MTS natural de cada proteína mitocondrial individual que é codificada pelo ADN nuclear, traduzida (produzida) no citoplasma e transportada para a mitocôndria. As várias MTS podem ser intercambiáveis para cada enzima mitocondrial entre elas próprias. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da proteína de fusão para utilização da presente invenção.

Deveria de ser notado que cada enzima mitocondrial que e produzida no citoplasma e transportada para a mitocôndria é produzida como uma enzima precursora carregado a sua MTS

natural, de modo que utilizar a enzima mitocondrial precursora já tem a sua MTS; contudo, esta sequência que ocorre naturalmente na enzima precursora pode ser trocada com qualquer outra MTS conhecida, principalmente para aumentar a eficácia da translocação.

O termo "**distúrbio mitocondrial**" no contexto da invenção refere-se a um grupo de doenças sistêmicas causadas por dano herdado ou adquirido à mitocôndria causando uma escassez de energia dentro dessas áreas do corpo que consomem grandes quantidades de energia, tais como o fígado, músculos, cérebro e o coração. O resultado é, com frequência, falha hepática, fraqueza dos músculos, fadiga e problemas com o coração, olhos e vários outros sistemas. Em certas modalidades preferidas, o distúrbio mitocondrial é deficiência em LAD.

Em certas outras modalidades preferidas, o distúrbio metabólico mitocondrial é deficiência no Complexo I (OMIM:252010). A deficiência no Complexo I pode ser causada por uma mutação em qualquer uma das subunidades do mesmo. Noutra modalidade, a deficiência no Complexo I é causada por uma mutação num gene selecionado do grupo que consiste em NDUFV1 (OMIM: 161015), NDUFV2 (OMIM:600532), NDUFS1 (OMIM:157655), NDUFS2 (OMIM:602985), NDUFS3 (OMIM:603846), NDUFS4 (OMIM:602694), NDUFS6 (OMIM:603848), NDUFS7 (OMIM:601825), NDUFS8 (OMIM:602141) e NDUFA2 (OMIM:602137).

Noutra modalidade, o distúrbio metabólico mitocondrial é a deficiência no Complexo IV (citocromo c oxidase; OMIM:220110). A deficiência no Complexo IV pode ser causada por uma mutação em qualquer uma das subunidades do mesmo. Noutra modalidade, a deficiência no Complexo IV é causada por uma mutação num gene selecionado do grupo que consiste em MTCO1 (OMIM:516030), MTCO2 (OMIM:516040), MTCO3 (OMIM:516050), COX10 (OMIM:602125), COX6B1 (OMIM:124089), SCO1 (OMIM:603644), FASTKD2 (OMIM:612322) e SCO2 (OMIM:604272).

Noutras modalidades, o distúrbio mitocondrial é causado por ou associado a mutação com alteração de sentido na enzima

cuja atividade está a ser substituída. Conforme providenciado aqui, composições da presente invenção exibem a capacidade surpreendente surprising de complementar mutações com alteração de sentido, apesar da presença da proteína mutada em complexos de enzimas multi-componentes.

Noutras modalidades, o distúrbio mitocondrial é uma doença neurodegenerativa. Conforme providenciado aqui, proteínas de fusão para utilização da presente invenção exibem a capacidade de atravessar a barreira sangue-cérebro (BBB). Nesta modalidade, um PTD capaz de atravessar a BBB será selecionado.

Noutras modalidades, o distúrbio mitocondrial é selecionado do grupo que consiste em encefalopatia e falha hepática que é acompanhada de acidose láctica tempestuosa, hiperamonémia e coagulopatia.

Noutras modalidades, o distúrbio mitocondrial é selecionado do grupo que consiste em deficiência em ornitina Transcarbamilase (hiperamonémia) (OTCD), deficiência em Carnitina O-palmitoiltransferase II (CPT2), deficiência em Fumarase, deficiência em Citocromo c oxidase associada a síndrome de Leigh, doença da urina em xarope de ácer (MSUD), deficiência em Acil-CoA Desidrogenase de cadeia média (MCAD), deficiência em Acil-CoA Desidrogenase de cadeia muito longa (LCAD), deficiência em proteína trifuncional, Oftalmoplegia externa progressiva com deleções de ADN mitocondrial (POLG), DGUOK, TK2, deficiência em Piruvato Decarboxilase e síndrome de Leigh (LS). Noutra modalidade, o distúrbio metabólico mitocondrial é selecionado do grupo que consiste em doença de Alpers; Síndrome de Barth; defeitos da  $\beta$ -oxidação; deficiência em carnitina-acil-carnitina; deficiência em carnitina; deficiência na co-enzima Q10; Deficiência no Complexo II (OMIM:252011), Deficiência no Complexo III (OMIM: 124000), Deficiência no Complexo V (OMIM:604273), LHON-neuropatia ótica hereditária de Leber; MM-Miopatia mitocondrial; L IMM- Miopatia mitocondrial infantil letal; MMC-Miopatia e cardiomiopatia

maternal; NARP-fraqueza muscular neurogénica, Ataxia e Retinite Pigmentosa; Doença de Leigh; FICP-Cardiomiopatia infantil letal Mais, uma cardiomiopatia associada a MELAS; MELAS- Encefalomiopatia Mitocondrial com acidose láctica e episódios tipo derrame; LDYT-Neuropatia ótica hereditária de Leber e distonia; MERRF-Epilepsia mioclónica e fibras do músculo vermelho esfarrapadas; MHCM-Cardiomiopatia hipertrófica herdada materno; CPEO-Oftalmoplegia externa progressiva crónica; KSS-Síndrome de Kearns Sayre; DM-Diabetes Melito; DMDF Diabetes Melito + Surdez; Pseudo-obstrução intestinal crónica (CIPO) com miopatia e oftalmoplegia; DEAF-Surdez herdada materno; PEM-Encefalopatia progressiva; SNHL-perda de audição Sensorial-Neural; Encefalomiopatia; Citopatia mitocondrial; DEMCHO-Demência e coreia; AMDF-Ataxia, Mioclono; Epilepsia ESOC; Atrofia ótica; FBSN-Necrose estriada bilateral familiar; FSGS-Glomerulosclerose Segmental Focal; L IMM-Miopatia mitocondrial infantil letal; MDM-Miopatia e Diabetes Melito; MEPR-Epilepsia mioclónica e regressão psico-motora; Doença de sobreposição MERME MERRF/MELAS; MHCM-Cardiomiopatia hipertrófica herdada materno; MICM-Cardiomiopatia herdada materno; MILS-Síndrome de Leigh herdado materno; Encefalocardiomiopatia Mitocondrial; Distúrbio mitocondrial multi-sistema (miopatia, encefalopatia, cegueira, perda de audição, neuropatia periférica); NAION-Neuropatia ótica isquémica anterior não-arterítica; PEM-Encefalopatia progressiva; PME-Epilepsia mioclono progressiva; RTT-Síndrome de Rett; SIDS-Síndrome da morte súbita infantil; e MIDD-Diabetes e Surdez herdados materno.

Distúrbios mitocondriais são distúrbios herdados ou adquiridos, apesar de raramente poderem ser o resultado de uma mutação espontânea durante o desenvolvimento inicial do embrião. Os dois padrões de herança mais comuns de citopatias mitocondriais são o Mendeliano e Materno. Alguns exemplos



representativos de doenças mitocondriais estão representados no quadro a seguir.

<b>Doença</b>	<b>Proteína afetada</b>	<b>OMIM</b>
Deficiência em Ornitina Transcarbamilase (hiperamoniemia) (OTCD)	Ornitina Transcarbamilase (P00480)	311250
Deficiência em Carnitina O-palmitoiltransferase II (CPT2)	Carnitina O-palmitoiltransferase II (P23786)	255110
Deficiência em Fumarase	Fumarate hidratase (P07954)	606812
Deficiência em Citocromo c oxidase associada a síndrome de Leigh	Proteína do locus em excesso 1 (SURF1) (Q15526)	220110
Doença da urina em xarope de açúcar (MSUD)	1. Subunidade alfa da 2-oxoisovalerato desidrogenase (Desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada E1 $\alpha$ ) (P12694) 2. Subunidade beta da 2-oxoisovalerato desidrogenase (Desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada E1 $\beta$ ) (P21953)	248600
Deficiência em Acil-CoA Desidrogenase de cadeia média (MCAD)	Acil-CoA desidrogenase, específica de cadeia média (P1310)	201450
Deficiência em Acil-CoA Desidrogenase de cadeia muito longa (LCAD)	Acil-CoA desidrogenase, específica de cadeia muito longa (P49748)	201475
Deficiência em proteína trifuncional	1. subunidade alfa da enzima trifuncional (3 hidroxiacil CoA Desidrogenase de cadeia longa (LCHAD) (P40939) (HADHA). 2. subunidade beta da enzima trifuncional, [Hidroxiacil-CoA Desidrogenase/3-cetoacil-CoA Tiolase/Enoil-CoA Hidratase, (P55084) (HADHB)	609015
Oftalmoplegia externa progressiva com deleções de ADN mitocondrial (POLG)	Subunidade gama da ADN polimerase 1 (P54098)	157640
DGUOK	Desoxiguanosina quinase	601465
TK2	timidina quinase-2	188250

<b>Doença</b>	<b>Proteína afetada</b>	<b>OMIM</b>
Deficiência em Piruvato Decarboxilase	Subunidade beta do componente E1 da Piruvato desidrogenase E1 (P11177)	208800
	Subunidade alfa do componente E1 da Piruvato desidrogenase E1 (P08559)	312170
Síndrome de Leigh (LS)	Síndrome de Leigh pode ser uma característica de uma deficiência em qualquer um dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial: I (OMIM:252010), II (OMIM:252011), III (OMIM:124000), IV (citocromo c oxidase; OMIM:220110) ou V (OMIM:604273).	

Cada doença mitocondrial representa uma modalidade separada da proteína de fusão para utilização da presente invenção. O termo "**tratamento**" no contexto da invenção não se refere a uma cura completa das doenças, já que não altera a genética de mutação que causa a doença. Este termo refere-se a aliviar pelo menos um dos sintomas indesejados associados com a doença, melhorando a qualidade de vida do indivíduo, diminuindo a mortalidade causada pela doença ou (se o tratamento é administrado suficientemente cedo) prevenindo a manifestação total do distúrbio mitocondrial antes de este ocorrer, principalmente aos órgãos e tecidos que têm uma alta demanda de energia. O tratameto pode ser um tratamento prolongado contínuo para uma doença crónica ou uma única ou umas poucas administrações para o tratamento de uma condição patológica aguda, tal como encefalopatia e falha hepática que é acompanhada de acidose láctica tempestuosa, hiperamonémia e coagulopatia.

Os inventores da presente invenção utilizaram a doença "deficiência em LAD" como um modelo; contudo, o âmbito desta invenção não se restringe a esta doença.

De acordo com um exemplo específico da invenção, a enzima

LAD precursora humana foi fundida a uma fração de entrega (TAT), que conduziu esta enzima às células e suas mitocôndrias, substituindo, assim, a enzima endógena mutada.

Para testar esta abordagem, a proteína de fusão TAT-LAD foi construída e altamente purificada. Foi demonstrado que TAT-LAD é capaz de entrar nas células dos pacientes e nas suas mitocôndrias enquanto aumenta a atividade de LAD. Além disso, foi mostrado que TAT-LAD é capaz de substituir a enzima LAD mutada dentro do complexo da enzima mitocondrial complexo piruvato desidrogenase (PDHC), restaurando, assim, a sua atividade para níveis quase normais.

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

**Figura 1.** Representação esquemática das proteínas de fusão TAT-LAD e LAD, sua expressão e purificação. **A.** Representação esquemática da proteína de fusão TAT-LAD e das proteínas controle TAT- $\Delta$ -LAD (que carecem da fração MTS) e LAD (que carecem da fração TAT). **B.** Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e Western blot utilizando análise de anticorpo anti-LAD de proteínas de fusão TAT-LAD, TAT- $\Delta$ -LAD e LAD purificadas. As proteínas foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade. **C.** Atividade enzimática das proteínas de fusão TAT-LAD, TAT- $\Delta$ -LAD e LAD purificadas. Os valores da atividade de LAD (nmol/min/mg) apresentados são valores médios  $\pm$  DP de três ensaios enzimáticos separados, cada um realizado em triplicado. LAD: Lipoamida Desidrogenase; MTS: sequência de direcionamento mitocondrial; TAT: péptido transativador da transcrição.

**Figura 2.** Entrega de TAT-LAD nas células G229C/Y35X e E375K dos pacientes. **A.** Análise Western blot de extratos de proteínas de células inteiras de células tratadas com G229C/Y35X utilizando anticorpos contra LAD (1:1000). A proteína de fusão TAT-LAD (seta) e LAD endógena mutada correspondem a massa molecular de 58kDa e 50kDa, respetivamente, conforme esperado. **B.** Análise Western blot

de extratos de proteínas de células inteiras de células tratadas com E375K, utilizando anticorpos contra LAD (1:1000) e  $\alpha$ -tubulina (1:10 000). Anti-Tubulina serviu como um controlo interno para carregamento de proteína. **C.** Análise de microscopia de fluorescência de células G229C/Y35X tratadas com TAT-LAD rotulado com FITC (painéis 1-3) e LAD (painel 4) (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  concentração final) durante 30 min (painel 1), 2 horas (painel 2) e 4 horas (painel 3). **D-E.** Atividade LAD em células G229C/Y35X (D) e E375K (E) tratadas. As células foram tratadas com proteína TAT-LAD, TAT-PAH ou LAD (0,075-0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , concentração final) durante períodos de tempo diferentes. A atividade LAD foi analisada em extratos de proteínas de células inteiras por ensaio da atividade enzimática. Os ensaios de atividade foram conduzidos pelo menos três vezes. Os valores são apresentados como a média  $\pm$  e.p.m. (painel da esquerda) ou representam resultados típicos (painel da direita). Os valores de atividade são apresentados como nmol/min/mg proteína.

**Figura 3.** Destino de TAT-LAD e TAT- $\Delta$ -LAD dentro da mitocôndria isolada. **(A)** TAT-LAD e TAT- $\Delta$ -LAD rotulados radioativamente foram expressos *in vitro* e analisados utilizando auto-radiografia SDS-PAGE, fazendo corresponder as suas massas moleculares esperadas, 58 e 54 kd, respetivamente. **(B)** Mitocôndrias isoladas de células foram incubadas durante 30 min. com as proteínas radio-marcadas. As mitocôndrias foram depois lavadas, tratadas com proteinase K e analisadas utilizando auto-radiografia SDS-PAGE. O asterisco marca a banda de 50 kd da proteína de fusão TAT-LAD processada.

**Figura 4.** Entrega de TAT-LAD em mitocôndrias de células G229C/Y35X (A-D) e D479V (**E-H**) de pacientes. As células foram tratadas com a proteína de fusão (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  concentração final) durante 4-6 horas. Foram obtidas frações subcelulares (citossólica e mitocondrial) por centrifugação diferencial. As atividades enzimáticas de LAD (**A,E**) e CS (**B,F**) nas frações

citossólica e mitocondrial das células tratadas foram analisadas e a razão LAD/CS (**C,G**) na sua fração mitocondrial foi calculada. A razão LAD/CS foi quase duas vezes superior para TAT-LAD do que para TAT-ALAD. Os valores de atividade são apresentados como nmol/min/mg proteína. **D e H.** Análise Western blot das frações subcelulares mostrando a distribuição intracelular de TAT-LAD e sua pureza, utilizando anticorpos contra LAD (1:1000) e os marcadores específicos VDAC (porina) (1:5000) para a mitocôndria e  $\alpha$ -tubulina (1:10000) para o citoplasma. O marcador E1 $\alpha$  também foi utilizado para confirmar a pureza da fração mitocondrial.

**Figura 5.** Co-localização de PDHC e atividade enzimática em células tratadas com TAT-LAD de pacientes. (A) Células D479V foram tratadas com TAT-LAD ou LAD rotulada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (fluorescência verde, coluna do meio), lavadas, fixas, permeabilizadas e incubadas com anticorpo anti-E1 $\alpha$ . As células foram depois lavadas e incubadas com anticorpo Cy5 anti-ratinho (fluorescência vermelha, coluna da esquerda). As células foram analisadas para co-localização utilizando microscopia confocal (fusão amarela, coluna da direita). Ampliações originais: 60 (LAD) e 100 (TATLAD). (**B-C**) As células foram incubadas com TAT-LAD (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l, concentração final) durante 3, 6 ou 24 horas. Ensaio de atividade PDHC foram realizados conforme descrito nos Materiais e Métodos. (**B**) Atividade PDHC células E375K tratadas de pacientes. Os valores de atividade são apresentados como nmol/min/mg proteína. (**C**) Atividade PDHC em células E375K e D479V tratadas de pacientes. Os valores de atividade são apresentados como a percentagem da atividade PDHC normal medida em fibroblastos saudáveis nas mesmas experiências. Os ensaios de atividade foram repetidos três vezes. Os valores apresentados em **B e C** são valores médios  $\pm$  DP. PDHC, complexo piruvato desidrogenase. Também foi observada co-localização em células G229C/Y35X tratadas de pacientes.

**Figura 6:** Atividade enzimática de LAD no plasma de ratinhos E3 injetados com TAT-LAD. Comportamento e estabilidade da TAT-LAD injetada foram seguidos no plasma de ratinhos injetados medindo a atividade enzimática LAD. Amostras de sangue de ratinhos injetados E3 foram colhidas em diferentes pontos temporais e foi preparado plasma.

**Figura 7: A.** Atividade TAT-LAD em vários órgãos de ratinhos E3 tratados com TAT-LAD: dependência do tempo. A atividade LAD é apresentada como aumento percentual desde a atividade basal medida nos ratinhos E3 não tratados (injetados com PBS). **B-D.** Efeito de TAT-LAD vs. proteína controlo LAD no fígado (**B**), cérebro (**C**) e coração (**D**).

**Figura 8:** A. Atividade PDHC em órgãos de ratinhos E3 tratados com TAT-LAD. Os resultados são apresentados como o aumento percentual sobre a atividade PDHC basal no mesmo órgão dos ratinhos E3 não tratados (injetados com PBS). B-D. Efeito de TATLAD vs. proteína controlo LAD no fígado (**B**), cérebro (**C**) e coração (**D**).

**Figura 9:** Atividade PDHC vs. atividade LAD em órgãos de ratinhos E3 tratados com TAT-LAD. **A.** fígado. **B.** cérebro. **C.** coração.

**Figura 10:** Atividade do Complexo I é restaurada em células de pacientes com deficiência no Complexo I que são tratados com TAT- ORF66. "PBS" refere-se a células não tratadas.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

Numa modalidade, a presente invenção providencia uma proteína de fusão para utilização num método de tratamento conforme definido nas reivindicações. Em certas modalidades preferidas, a proteína de fusão é produzida por técnicas recombinantes conforme providenciado aqui, a provisão de proteínas de fusão PTD que contêm um domínio catalítico de uma enzima mitocondrial a um indivíduo em necessidade do mesmo é capaz de tratar e aliviar distúrbios metabólicos mitocondriais.

A proteína de fusão compreende uma sequência de

direcionamento de mitocôndria (MTS). A MTS é uma MTS de outra enzima mitocondrial que é codificada pelo ADN nuclear, traduzida/produzida no citoplasma e transportada para a mitocôndria. Será entendido por aqueles habilitados na arte que as MTS de várias enzimas mitocondriais sintetizadas a partir de genes nucleares são grandemente, se não completamente, intercambiáveis e, portanto, podem ser utilizadas de uma forma intercambiável em métodos e composições da presente invenção.

A MTS está situada entre o PTD e o componente funcional conforme o caso. Em certas modalidades mais preferidas, a porção C-terminal da proteína de fusão à MTS consiste no componente funcional de uma enzima. Noutra modalidade, não estão presentes quaisquer resíduos heterólogos à enzima C-terminal à MTS. Nesta modalidade, a clivagem da MTS gera uma enzima com a sequência nativa, capaz, portanto, de se integrar prontamente num complexo enzimático multi-componente conformacionalmente sensível.

O PTD é um péptido TAT. Exemplos representativos não limitantes de sequências de PTD adequadas são listados aqui.

Cada tipo de proteína de fusão para utilização no método de tratamento representa uma modalidade separada da presente invenção.

É descrita aqui uma composição farmacêutica para tratar ou aliviar um distúrbio mitocondrial, compreendendo um veículo farmacêuticamente aceitável e como um ingrediente ativo a proteína de fusão.

Também é descrita aqui a utilização de uma proteína de fusão da presente invenção para a preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio mitocondrial.

Também é descrito aqui um método para tratar um distúrbio mitocondrial, compreendendo o método a etapa de administrar a um indivíduo em necessidade de tal tratamento uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma proteína de fusão da presente invenção, tratando, assim, um distúrbio mitocondrial. No momento da entrada para a mitocôndria do indivíduo, a proteína

de fusão restaura a atividade enzimática em falta.

Também é descrito aqui um método para introduzir uma atividade da enzima mitocondrial numa mitocôndria de um indivíduo, compreendendo o método a etapa de administrar to a um indivíduo em necessidade de tal tratamento uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma proteína de fusão da presente invenção, introduzindo, assim, uma atividade da enzima mitocondrial numa mitocôndria de um indivíduo em necessidade da mesma.

Conforme providenciado aqui nos Exemplos 1-4, TAT-LAD é capaz de entrar nas células e suas mitocôndrias rapidamente e eficientemente. Além disso, é capaz de aumentar a atividade LAD dentro de células deficientes em LAD e nas suas mitocôndrias de volta para valores de atividade normais e mais altos. De forma mais importante, é capaz de substituir a enzima mutada e ser incorporado naturalmente em complexos de desidrogenase de  $\alpha$ -cetoácidos, tais como o PDHC. Mostramos aqui que a atividade PDHC de células deficientes em LAD tratadas com TAT-LAD mudou de -10% para 70-75% da atividade normal após apenas 3 horas de incubação. Estes valores elevados de atividade enzimática diminuíram após 24 horas de incubação, mas permaneceram estáveis bem acima da atividade basal. Logo, num contexto clínico, uma única aplicação pode ser suficiente para um paciente que se apresenta com um episódio de descompensação que lhe ameaça a vida.

Uma vantagem de utilizar proteínas de fusão TAT para o tratamento de distúrbios mitocondriais é a sua capacidade de serem entregues em virtualmente todas as células sem especificidade. Ao tentar substituir uma enzima mitocondrial mutada não existe a necessidade de direcionamento específico, mas sim, em vez disso, de entregar a enzima em cada célula/tecido, atingindo primariamente tecidos com elevada demanda de energia, tais como músculos, fígado e sistema nervoso central (CNS), que são normalmente os mais afetados nestes tipos de distúrbios.



Além disso, LAD-TAT exibiu um modo de ação muito rápido, aumentando a atividade LAD das células inteiras em células deficientes em LAD de volta para valores normais após apenas 30 min de incubação e mesmo valores mais elevados após prolongamento do tratamento (Figura 2D- E). A atividade LAD normal nos fibroblastos oscila entre 60-140 nmol/min/mg e em portadores assintomáticos de deficiência em LAD entre 25-50 nmo/min/mg (Berger, 1996).

O PDHC é uma máquina enzimática multi-componente macromolecular. O seu processo de montagem envolve numerosas subunidades diferentes. O posicionamento ótimo de componentes individuais dentro deste complexo multi-subunitário afeta diretamente a eficiência da reação enzimática global e a estabilidade dos seus intermediários (Vettakkorumakankav, 1996; Berger, 1996; Del Gaizo 2003b). Dada a estrutura do complexo, não se esperaria que a restauração da atividade de um complexo completo reduzida devido a um único componente não funcional mutado fosse tratável pela administração exógena do componente mutado. De maneira interessante, conforme demonstrado aqui, a substituição mediada por TAT do componente E3 foi suficiente para aumentar a atividade enzimática de todo o complexo do PDHC (Figura 5).

Conforme providenciado aqui, proteínas de fusão PTD para utilização da presente invenção aumentaram a atividade PDHC quatro a cinco vezes de uma forma sustentada, durante o último ponto temporal às 24 horas (Figura 5B). Ao tratar uma doença metabólica, tal como deficiência em LAD, não existe a necessidade de aumentar a atividade da enzima de volta para os 100%; em vez disso, precisa de ser aumentada para cima do limiar energético necessário para um metabolismo normal. Mesmo um aumento ligeiro na atividade LAD pode aumentar a taxa de síntese de ATP e pode afetar de forma favorável o envolvimento neurológico na deficiência em LAD. Logo, as alterações demonstradas aqui na atividade LAD, razão LAD/CS e atividade PDHC provavelmente afetam significativamente a apresentação

clínica em pacientes pelo menos ao nível de portadores de deficiência em LAD assintomáticos.

Atualmente, um impedimento principal de ERT é a incapacidade da enzima administrada de atravessar a barreira sangue-cérebro (BBB). Este obstáculo fundamental limitou severamente o desenvolvimento de ERT para distúrbios metabólicos nos quais o SNC é afetado (Brady, 2004). As proteínas de fusão TAT são capazes de atravessar a BBB, tornando-as, assim, numa escolha favorável para o desenvolvimento de ERT para distúrbios metabólicos que envolvem o SNC.

Conforme providenciado aqui nos Exemplos 5-7, a deficiência em LAD de ratinhos E3 é tratável por proteínas PTD-LAD para utilização da presente invenção. É notável que as experiências com os ratinhos E3 tenham estabelecido evidência substancial de que as alterações em desidrogenases de  $\alpha$ -cetoácidos (os complexos contendo LAD) podem desempenhar um papel na patogênese das doenças neurodegenerativas. Diminuições na atividade dos complexos desidrogenase  $\alpha$ -cetoglutarato associados a LAD e piruvato desidrogenase, no cérebro, representam um elemento comum em várias doenças neurodegenerativas associadas com a idade, incluindo as doenças de Alzheimer e Parkinson (Gibson et al., 2000 e Sullivan e Brown, 2005). Estudos de ratinhos adultos deficientes em LAD sugeriram que uma diminuição parcial de LAD, que é suficiente para diminuir a atividade dos seus complexos enzimáticos associados (Johnson et al., 1997), resulta num nível elevado de suscetibilidade à neurotoxicidade química (Klivenyi et al., 2004). Além disso, variações no gene *DLD* (o análogo de ratinho à LAD) foram ligadas à doença de Alzheimer (Brown et al, 2004 e Brown et al, 2007). Além disso, as proteínas de fusão PTD-LAD da presente invenção são mostradas aqui para restaurar a atividade LAD e PDHC ao cérebro, mostrando, assim, que podem atravessar a BBB e integrar funcionalmente no PDHC lá. Estes resultados mostram claramente que as proteínas de fusão PTD-LAD

da presente invenção são capazes de tratar doenças neurodegenerativas.

### **SECÇÃO DOS DETALHES EXPERIMENTAIS**

#### **MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS (Exemplos 1-4)**

##### **Cultivo celular**

Células de cultivo primário de fibroblasto de pacientes portadores dos genótipos mutados G229C/Y35X, E375K/E357K e D479V/D479V foram estabelecidas a partir de biópsias de pele do antebraço. As células foram mantidas em DMEM (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel) suplementadas com 15% Soro bovino fetal (HyClone, Logan UT, USA), penicilina/estreptomicina e L-glutamina (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel) numa atmosfera humificada com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Todos os cultivos celulares foram testados e deram negativo à contaminação por micoplasma. Todas as experiências que envolviam as células dos pacientes foram aprovadas pelo comité de revisão de ética do Hospital Universitário Hadassah.

##### **Construção de plasmídeos que expressam proteínas TAT-LAD e LAD.**

Foram geradas proteínas de fusão TAT utilizando o plasmídeo pTAT, providenciado pelo Dr. S.F. Dowdy. O plasmídeo contém um gene que codifica uma His-etiqueta 6-histidina, seguido pelo péptido TAT (AA 47-57). Para construir um plasmídeo pTAT com LAD fundido ao péptido TAT etiquetado com His, o gene para o precursor da LAD humana foi amplificado por PCR a partir de uma biblioteca de ADNc placentar utilizando os oligonucleotídeos apresentados na SEQ. ID N.º 1 (frente) e SEQ. ID N.º 2 (reversa). O produto da PCR foi clonado a jusante da sequência TAT num vetor pTAT digerido com BamHI/XhoI.

O plasmídeo de expressão TAT-Δ-LAD foi construído por amplificação por PCR da sequência LAD madura a partir do plasmídeo TAT-LAD utilizando os oligonucleotídeos apresentados na SEQ. ID N.º 5 (frente) e SEQ. ID N.º 6 (reversa). O produto da PCR foi clonado a jusante da sequência TAT num plasmídeo pTAT BamHI/XhoIcut.

Uma proteína LAD controlo que carece do péptido TAT também foi clonada. O vetor de expressão de LAD foi gerado subclonando o fragmento LAD num vetor pTAT modificado que carece da sequência TAT; nucleotídeos e sequências de aminoácidos da proteína LAD controlo são apresentados na (SEQ. ID N.º 45-46, respetivamente). Todos os clones foram confirmados por análise de sequenciação. Exemplos das sequências utilizadas são dados a seguir:

A sequência de ADN TAT-LAD (inclui etiqueta His, péptido TAT e o gene para o precursor da LAD humana) é apresentada na SEQ. ID N.º 3. A sequência de aminoácidos é apresentada na SEQ. ID N.º 4.

A MTS de LAD que ocorre naturalmente tem a sequência apresentada na SEQ. ID N.º 39. A sequência utilizada em TATLAD é idêntica, exceto que carece da Met no N-terminal e é apresentada na SEQ. ID N.º 41.

#### **Expressão e purificação de proteínas**

Células competentes de *E. coli* BL21-CodonPlus (XDE3) transformadas com plasmídeos que codificam as proteínas de fusão foram crescidas a 37°C em meio SLB contendo canamicina (50 µg/ml), tetraciclina (12,5 µg/ml) e cloranfenicol (34 µg/ml). A uma OD<sub>600</sub> de 0,8, a expressão proteica foi induzida adicionando IPTG (1mM, concentração final). Após uma incubação de 24 horas a 22°C, as células foram colhidas por centrifugação (2000Xg durante 15 min a 4°C) seguido de sonicação em tampão de ligação (PBS pH 7,4, PMSF 1mM e 10mM imidazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)). As suspensões foram clarificadas por centrifugação (35,000Xg durante 30 min a 4°C) e os sobrenadantes contendo as proteínas de fusão foram purificados em condições nativas utilizando colunas HP quelantes HiTrap™ (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) pré-equilibradas com tampão de ligação. As colunas foram lavadas pela adição em etapas de concentrações crescentes de imidazol. Finalmente, as proteínas alvo foram eluídas com tampão de eluição (PBS pH 7,4 e 500mM Imidazol). Todos os

procedimentos de purificação foram realizados utilizando o sistema FPLC AKTA™ (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A remoção de imidazol foi realizada por diálise contra PBS (pH 7,4). As proteínas foram mantidas congeladas em aliquotas a -20°C até utilização.

#### **Análise Western blot**

Proteínas (5-20 µg proteína/via) foram resolvidas em géis de 12% SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de transferência Immobilon-P™ (Millipore, Bradford, EUA). Foram realizados Western blots utilizando anticorpos anti-LAD (Elpeleg 1997), anti-His (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), anti- $\alpha$ -Tubulina (Serotec, Oxford, Reino Unido) e anti-VDAC (porina) (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) a diluições 1:1000, 1:10 000, 1:10 000 ou 1:5000, respetivamente.

#### **Entrega das proteínas de fusão às células**

As células foram colocadas em placas com 6 poços ou em frascos de 250 ml (NUNC Brand Products, Roskilde, Dinamarca). Quando as células atingiram 90% de confluência, o meio foi substituído com meio fresco contendo 0,05-0,1 mg/ml (concentração final) de proteínas de fusão TAT para vários períodos temporais. Após incubação, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, peletizadas e mantidas a -80°C até nova utilização. Os peletizados foram depois ressuspensos em PBS contendo 0,5% Triton X-100 e 1mM PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), mantidas em gelo durante 10 minutos e centrifugadas a 15,000Xg durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram analisados por análise western blot ou para atividade enzimática.

#### **Isolamento das frações subcelulares**

Frações mitocondriais foram isoladas a partir células cultivadas utilizando uma técnica de centrifugação diferencial (Bourgeron 1992). As células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e peletizadas. Os peletizados de células foram mantidas congeladas a -80°C até utilização. Os peletizados

foram ressuspensos em tampão Tris-HCl gelado (10mM, pH 7,6, 1mM PMSF) e homogeneizadas com um homogeneizador Dounce (vidro Teflon). Os homogeneizados foram combinados com sacarose (0,25M, concentração final) e centrifugados durante 10 min a 600 X g a 4°C. Os sobrenadantes foram colhidos e centrifugados durante 10 min a 14,000 X g a 4°C. Os peletizados resultantes contendo as mitocôndrias foram ressuspensos em PBS contendo 0,5% Triton X-100 e 1mM PMSF e incubadas em gelo durante 15 min antes de serem analisadas para atividades enzimáticas e Western blots. A pureza das frações subcelulares foi confirmada por Western blot utilizando os seguintes anticorpos marcadores específicos:  $\alpha$ -tubulina para citoplasma e VDAC (porina) para mitocôndria.

#### **Ensaio da atividade de LAD e citrato sintase (CS)**

As atividades LAD e CS foram determinadas para extratos de proteínas de células inteiras, frações subcelulares ou proteínas de fusão TAT purificadas.

A atividade LAD foi determinada conforme descrito em Berger, 2005. A reação foi realizada em tampão de fosfato de potássio (50 mmol/l, pH 6,5) contendo EDTA (1 mmol/l) e NADH (1,5 mmol/l) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Após adição da Lipoamida (2 mmol/l) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), a diminuição na absorvância de um estado estável foi medida por espectrofotometria a 340nm (Uvikon XL, Bio-Tek Instruments, Milan, Itália).

A atividade CS foi determinada seguindo espectrofotometricamente (412nm) o aparecimento do grupo SH livre da CoA-SH libertada no momento da adição de 10mM oxaloacetato para frações subcelulares às quais 100uM acetil-CoA e 2mM DTNB (ácido dititionitrobenzólico; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi adicionado.

#### **Análise de células tratadas com TAT-LAD por fluorescência e microscopia confocal**

As proteínas TAT-LAD e LAD foram rotuladas fluorescentemente com Fluorescina (FITC) utilizando um kit de

rotulagem de proteínas (EZ- Label, PIERCE Biotechnology, Rockford IL, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. O corante fluorescente não ligado foi removido por diálise contra PBS. Células crescidas em lamelas para 50-70% de confluência foram tratadas com TAT-LAD ou LAD rotulada com FITC (0,1 mg/ml, concentração final) durante vários períodos de tempo. Quando indicado, as células foram ainda incubadas com o corante fluorescente seletivo mitocondrial MitoTracker-Red CMXRos™ (Molecular Probes, Eugene, EUA, 200nM). As células foram depois lavadas com PBS, fixas em 3,7% formaldeído em PBS durante 10min à temperatura ambiente e lavadas de novo. Em experiências de fluorescência, as células foram analisadas diretamente sem fixação. As células foram analisadas com um microscópio de fluorescência (NIKON 90i, Nikon Corporation, Tóquio, Japão) ou com um microscópio de varrimento a laser confocal (NIKON C1, Nikon Corporation, Tóquio, Japão).

#### **Ensaio de atividade PDHC**

A atividade PDHC foi determinada utilizando piruvato radioativo conforme se segue: Bolas celulares congeladas foram suspensas e sonicadas em 0,25 ml tampão fosfato de potássio (10mM, pH 7,4). A reação foi realizada em 0,4 ml de tampão de reação contendo 200-300 µg extratos de células proteicas completas e foi terminada adicionando 1M ácido perclórico. O  $^{14}\text{CO}_2$  foi recolhido em Hidróxido de Hiamina™ (Packard, EUA) e contado num contador (Kontron Instruments, Zurich, Suíça) de cintilação líquido (UltimaGold™, Packard, EUA). Os controlos sem co-enzimas foram conduzidos simultaneamente para considerar a libertação de  $^{14}\text{CO}_2$  de fundo.

#### **Entrega e processamento das proteínas de fusão**

Mitocôndrias isoladas de fibroblastos saudáveis e proteína TAT-LAD marcada radioativamente e proteína TAT-Δ-LAD controlo foram utilizadas. Tradução *in vitro* das proteínas foi realizada utilizando o Sistema de tradução/transcrição acoplado TnT Quick™ (Promega, Madison, WI) na presença de [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Mitocôndrias isoladas foram incubadas com as proteínas marcadas radioativamente (1 mg/ml mitocôndria, 1:10 razão volume-para-volume) durante 30 minutos a 30°C, depois peletizadas, lavadas com tampão A e tratadas com 2,5 µg/ml proteinase K (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) durante 10 minutos em gelo. Foi adicionado fluoreto de fenilmetilsulfonilo (1 mmol/l, concentração final) para parar a reação. As mitocôndrias foram depois re-peletizadas, lavadas e analisadas utilizando eletroforese em géis de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio 12% que foram fixos, secos e visualizados utilizando um PhosphorImager™ (BAS-2500; FujiFilm, Valhalla, NY).

**EXEMPLO 1: Construção, expressão, purificação e atividade *in vitro* das proteínas TAT-LAD e LAD**

A sobre-expressão e purificação da proteína de fusão TAT-LAD foram conseguidas inserindo a sequência precursora da LAD humana no vetor pTAT. Vetores de expressão que codificam TAT-Δ-LAD, que carecem da sequência MTS, e uma proteína controlo LAD que carece do péptido TAT também foram construídos (Figura 1A). Estas proteínas foram todas expressas e altamente purificadas nas mesmas condições. Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio e Western blot confirmaram a identidade destas proteínas altamente purificadas (Figura 1B). Verificou-se que estas proteínas de fusão baseadas em LAD purificadas eram altamente ativas num ensaio de atividade enzimática de LAD *in vitro* (Figura 1C).

**EXEMPLO 2: Entrega de TAT-LAD a células deficientes em LAD**

A experiência seguinte examinou a capacidade do domínio de transdução de proteínas (PTD's), tais como TAT, de entregar a enzima LAD humana a células cultivadas de pacientes com deficiência em LAD. TAT-LAD purificada foi incubada durante períodos de tempo diferentes com células de pacientes heterozigóticos para as mutações G229C/Y35X e E375K LAD. Extratos de proteínas de células inteiras foram preparados e



analisados por Western blot utilizando anticorpos anti-LAD. A proteína de fusão TAT-LAD (58kDa) entrou rapidamente nas células G229C/Y35X e foi detetável após 30 minutos de incubação (Figura 2A). Em células homozigóticas para a mutação E375K (Figura 2B), a sua entrega foi algo mais lenta; foi detetada dentro das células após uma incubação de 2 horas. LAD mutada endógena (50kDa) foi detetada apenas em células G229C/Y35X e não em células E375K (Figura 2A). Em ambas linhas de células, o estado estável foi atingido após 2-3 horas; logo, a quantidade da proteína de fusão permaneceu semelhante ao longo dos pontos temporais de 6 horas (Figura 2A) e 24 horas (Figura 2B).

Entrega de TAT-LAD a células também foi seguida utilizando análise de fluorescência direta. TAT-LAD foi rotulado fluorescentemente com Fluorescina (FITC), incubado com células G229C/Y35X durante períodos de tempo diferentes e analisado por microscopia de fluorescência. Proteína LAD rotulada com FITC que carece da fração PTD foi utilizada como uma proteína controlo. TAT-LAD foi entregue de forma eficiente às células (Figura 2C, painéis 1-3), ao passo que não foram detetados sinais de fluorescência em células tratadas com a proteína LAD controlo (Figura 2C, painel 4). Estes resultados correlacionaram-se com a análise Western blot (Figura 2A-B). TATLAD foi detetada rapidamente dentro de células (após apenas 30 min de incubação; Figura 2C, painel 1) e não houveram diferenças na intensidade do sinal de fluorescência após períodos de incubação mais longos (Figura 2C, painéis 2-3).

Para testar a capacidade de um PTD de entregar uma enzima LAD humana ativa a células deficientes em LAD, TAT-LAD purificada foi incubada com células G229C/Y35X e E375K durante períodos de tempo diferentes. Estas experiências utilizaram a proteína LAD controlo e proteína TAT-PAH, que é uma enzima de fusão TAT controlo que carece de atividade LAD. Extratos proteicos de células tratadas foram analisados em relação à sua atividade LAD. A atividade de LAD dentro das células aumentou dramaticamente de acordo com o tempo de incubação, atingindo

o estado estável após 2-3 horas (Figura 2D-E). Estes resultados pareceram-se aos observados pela análise Western. Este aumento na atividade LAD dentro das células dos pacientes foi dependente da dose e não foi observado após a adição da proteína LAD controle.

Em células G229C/Y35X, a atividade LAD aumentou 2,5 vezes (de 31 nmol/min/mg a 78 nmol/min/mg) após apenas 30 min de incubação e atingiu o equilíbrio de 230-250 nmol/min/mg, um aumento de 8 vezes, após 2-3 horas (Figura 2D). Células G229C/Y35X incubadas com proteínas controle TAT-PAH ou LAD não mostraram alteração na atividade basal LAD, >20 nmol/min/mg, que é inferior aos valores normais (Saada 2000). Em células E375K (Figura 2E), foram observadas a mesmas tendências. A atividade LAD aumentou 9 vezes (aumentando de 5 nmol/min/mg a 423 nmol/min/mg) após 2 horas de incubação e atingiu o equilíbrio de 630-690 nmol/min/mg após 4 horas de incubação, que durou as últimas 24 horas de incubação. Células E375K que foram incubadas com a proteína controle LAD não mostraram alteração na sua atividade basal LAD.

Apesar de tratadas com concentrações de proteína idênticas, as células E375K e G229C/Y35X responderam de forma diferente já que os valores de atividade máxima foram muito superiores nas células E375K do que nas G229C/Y35X, indicando possíveis diferenças na eficiência do tratamento em pacientes portadores de diferentes genótipos.

### **EXEMPLO 3: Entrega de TAT-LAD à mitocôndria**

A etapa seguinte foi examinar a capacidade da TAT-LAD de ser entregue através da membrana da mitocôndria e processada naturalmente na mitocôndria. TAT-LAD rotulada com [35S]-metionina traduzida *in vitro* foi incubada com mitocôndria isolada de fibroblastos saudáveis. As mitocôndrias foram tratadas com proteinase K para digerir proteínas não especificamente adsorvidas para a membrana externa, assegurando, assim, que o extrato mitocondrial continha apenas proteínas dentro da mitocôndria. Como um controle, foi

utilizada proteína TAT- $\Delta$ -LAD rotulada com  $^{35}\text{S}$ -metionina que carece de MTS (e conseqüentemente carece de local de processamento natural dentro dela). Como visto na Figura 3A, TAT-LAD e TAT- $\Delta$ -LAD foram ambas expressas aos seus tamanhos moleculares esperados de 58 e 54 kd, respectivamente. Após tratamento, ambas TAT-LAD e TAT- $\Delta$ -LAD foram detetadas dentro da mitocôndria após 30 minutos de incubação (Figura 3B), por causa da seqüência PTD que estas proteínas transportam. Contudo, apenas a proteína de fusão TAT-LAD foi processada para o seu tamanho maduro, conforme indicado pelo aparecimento de uma banda de 50-kd adicional na auto-radiografia SDS-PAGE (Figura 3B, asterisco). Conforme esperado, a proteína TAT- $\Delta$ -LAD (que carece de MTS) não foi processada e apareceu como uma banda única ao seu tamanho total não processado. Assim, TATLAD é capaz de ser entregue à mitocôndria e processado nela.

Foi depois examinado se TAT-LAD foi capaz de atingir mitocôndria após ser entregue às células intactas. TAT-LAD purificada foi incubada com células G229C/Y35X e D479V durante períodos de tempo diferentes. Após incubação, frações subcelulares mitocondrial e citoplasmática foram preparadas e analisadas para a presença de TAT-LAD e para atividade enzimática LAD. Atividade CS foi utilizada como um marcador mitocondrial. Western blot das frações subcelulares indicou a presença de TAT-LAD (58kDa) em ambas frações citosólica e mitocondrial de células G229C/Y35X e D479V tratadas após 4 e 6 horas de incubação (Figuras 4D e H, respectivamente). A pureza das frações subcelulares foi confirmada utilizando anticorpos contra os marcadores subcelulares  $\alpha$ -tubulina (50kDa) para o citoplasma e VDAC (porina) (31kDa) para a mitocôndria.

Suportando estas observações, houve um aumento significativo na atividade LAD em ambas frações citosólica e mitocondrial de células tratadas com TAT-LAD.

Em células G229C/Y35X, a atividade LAD em frações mitocondriais aumentou 7 vezes (de 28 nmol/min/mg a 205 nmol/min/mg) após uma incubação de 4 horas (Figura 4A).

Atividade enzimática permaneceu aproximadamente a mesma após 6 horas (193 nmol/min/mg) demonstrando que o equilíbrio foi atingido. Este aumento dramático na atividade LAD também foi medido em frações citosólicas, alterando de 10 nmol/min/mg para 222 e 339 nmol/min/mg após 4 e 6 horas de incubação, respectivamente (Figura 4A). Foram observados resultados semelhantes com células D479V. A atividade LAD em frações mitocondriais alterou de 28 nmol/min/mg para 165 e 117 nmol/min/mg após 4 e 6 horas de incubação, respectivamente (Figura 4E). Em frações citosólicas, a atividade mudou de 20 nmol/min/mg para 125 e 193 nmol/min/mg após 4 e 6 horas de incubação, respectivamente.

Além disso, atividade enzimática CS foi determinada em células G229C/Y35X (Figura 4B) e células D479V (Figura 4F). CS é uma enzima da matriz mitocondrial que participa no ciclo de Krebs, convertendo Acetil-CoA em citrato. Foi utilizado o ensaio da atividade enzimática CS como uma referência controle para verificar a pureza das sub-frações mitocondriais e também para calcular a razão LAD/CS para padronizar os valores da atividade enzimática LAD. Em ambas linhas de células, a atividade CS nas frações citosólicas mal foi detectada, ao passo que nas frações mitocondriais foi dentro do intervalo de níveis normais para fibroblastos, verificando, assim, a pureza das frações subcelulares. Além disso, a atividade CS foi constante e quase idêntica em todas as frações mitocondriais, permitindo a padronização adequada dos valores de atividade LAD. Mitocôndrias de G225C/Y35X exibiram razões LAD/CS de 0,102 antes da incubação e 0,740 e 0,678 após 4 e 6 horas de incubação com TAT-LAD, respectivamente (Figura 4C). Em mitocôndrias de células tratadas com D479V, a razão LAD/CS mudou de 0,142 para 0,715 e 0,561 após 4 e 6 horas de incubação, respectivamente (Figura 3G).

Experiências de co-localização foram utilizadas para confirmar adicionalmente a entrega de TAT-LAD às mitocôndrias de células deficientes em LAD. TAT-LAD rotulada com FITC foi

incubada com células G229C/Y35X crescidas em lamelas durante períodos de tempo diferentes. As células foram depois incubadas com o corante fluorescente seletivo mitocondrial MitoTracker-Red CMXRos™ e analisadas por microscopia confocal. Conforme mostrado na Figura 5A, TAT-LAD (fluorescência verde, coluna do meio) co-localizada com mitocôndria (fluorescência vermelha, coluna da esquerda) nos primeiros 30 minutos de incubação, conforme indicado pela coloração amarela na fusão (coluna da direita).

#### **EXEMPLO 4: Uma proteína de fusão PTD-LAD aumenta atividade PDHC células deficientes em LAD**

O teste final e mais crucial para a capacidade de TAT-LAD de tratar com sucesso a deficiência em LAD por ERT é a capacidade da enzima de substituir para a enzima endógena mutada, incluindo a integração com sucesso nos seus complexos enzimáticos multi-componentes naturais, tais como complexo desidrogenase piruvato (PDHC). A deficiência em LAD afeta três complexos enzimáticos multi-componentes mitocondriais, cuja atividade poderia ser restaurada por TAT-LAD. A capacidade de TAT-LAD de substituir com sucesso a enzima defeituosa endógena e aumentar a atividade de PDHC foi testada em células D479V e E375K.

A atividade PDHC foi aumentada em duas células genotipicamente diferentes. Em células E375K, atividade PDHC aumentou de forma significativa 12 vezes após 3 horas de incubação (de 0,029 para 0,367 nmol/min/mg), permanecendo aproximadamente quatro a cinco vezes superior aos baixos valores basais durante pelo menos 24 horas (Figura 5B). Apresentada como uma porcentagem da atividade PDHC normal de fibroblastos saudáveis, a atividade PDHC em células D479V aumentou de 9% para 69% da atividade normal após 3 horas de incubação, permanecendo a 50% do nível normal durante pelo menos 24 horas. Em células E375K, a atividade PDHC aumentou de 5 para 75% da atividade normal após 3 horas de incubação, diminuindo para cerca de 30% após 24 horas de incubação (Figura

5C). De notar, estes valores de atividade PDHC estão em próxima correlação com valores de atividade enzimática LAD medidos na mitocôndria de células tratadas, atingindo níveis máximos após 3 horas de incubação com TAT-LAD.

As proteínas de fusão PTD-LAD são, portanto, capazes de tratar deficiência em LAD aumentando a atividade PDHC em células deficientes em LAD.

### **EXEMPLO 5: Atividade enzimática de LAD em plasma de ratinhos E3 injetados com TAT-LAD**

#### **MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS (Exemplos 5-6)**

O modelo de ratinho da deficiência em LAD é descrito em Klivenyi, P. et al (Mice deficient in dihydrolipoamide dehydrogenase show increased vulnerability to MPTP, malonate and 3-nitropropionic acid neurotoxicity. J Neurochem 88: 1352-1360, 2004) e Johnson, MT et al (Targeted disruption of the murine dihydrolipoamide dehydrogenase gene (*Dld*) results in perigastrulation lethality. Proc Natl Acad Sci USA 94: 14512-14517, 1997). Estes ratinhos são heterozigóticos para uma mutação de perda de função recessiva que afeta a expressão do gene LAD (*Dld*, em ratinhos) ao nível ARNm (instabilidade) (ratinhos *Dld*+/- ou ratinhos E3). Ratinhos homozigóticos morrem no útero a um estágio de gastrulação muito inicial. Estes ratinhos são fenotipicamente normais, apesar da sua atividade LAD ser reduzida em -50%, afetando todos os complexos de enzimas dependentes de LAD. Da mesma forma, heterozigóticos humanos para deficiência em LAD exibem -50% de atividade LAD, mas normalmente não têm sintomas clínicos. Estes ratinhos são atualmente utilizados em experiências no campo dos distúrbios neurodegenerativos incluindo doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington.

Uma única dose (0,2 mg por ratinho) de TAT-LAD altamente purificada foi injetada na veia da cauda de ratinhos E3 e vários tecidos foram extraídos e analisados em relação às atividades LAD e PDHC a diferentes pontos temporais. Vários ratinhos foram utilizados em cada ponto temporal.

## **RESULTADOS**

Para testar a capacidade de TAT-LAD de tratar deficiência em LAD *in vivo*, TAT-LAD purificada foi injetada por via intravenosa em ratinhos E3 e o seu efeito nas atividades LAD e PDHC foi medido em vários tecidos. Esta experiência concentrou-se em 3 órgãos principais que têm as demandas de energia mais elevadas e, logo, são com frequência afetados nos distúrbios mitocondriais - o fígado, o coração (músculos) e o cérebro.

Primeiro, comportamento e estabilidade da proteína de fusão TAT-LAD injetada no plasma de ratinhos injetados foram caracterizados medindo a atividade enzimática LAD. Amostras de sangue de ratinhos injetados E3 foram colhidas a diferentes pontos temporais e o plasma foi preparado.

Não esteve presente qualquer atividade LAD no plasma de ratinhos saudáveis normais nem de ratinhos E3, de modo que a atividade LAD no primeiro ponto temporal foi estabelecida como referência. Após o primeiro ponto temporal, foi observada uma diminuição da atividade LAD no plasma de ratinhos E3, ao longo do tempo (Figura 6). Para determinar se um componente ou fator existe no plasma que reduziu a atividade LAD ao longo do tempo, plasma de ratinho foi incubada com TAT-LAD *in vitro* sob as mesmas concentrações: a 37°C e para os mesmos períodos de tempo. A atividade LAD permaneceu estável nestas amostras de plasma. Assim, a diminuição na atividade enzimática LAD no plasma foi um resultado da entrega de TAT-LAD aos órgãos e tecidos de ratinhos. De facto, estes resultados correlacionam-se com a atividade LAD medida dentro dos órgãos (Figura 7 abaixo). A proteína controlo LAD, que carecem a fração de entrega TAT, também diminuiu a sua atividade no plasma ao longo do tempo, o que sugere possíveis mecanismos de eliminação neste caso.

### **EXEMPLO 6: TAT-LAD aumenta a atividade LAD em órgãos de ratinhos deficientes em LAD**

Os órgãos foram colhidos dos ratinhos descritos no Exemplo prévio e a atividade LAD neles foi medida. A Figura 7A

representa o aumento em percentagem em relação à atividade basal medido nos ratinhos heterozigóticos, nomeadamente ratinhos não tratados E3, injetados apenas com PBS. Uma única injeção intravenosa de TAT-LAD (0,2 mg por ratinho) aumentou significativamente a atividade enzimática LAD dentro do fígado, coração e mais importante - no cérebro após apenas 30 minutos. As formas das curvas foram semelhantes no cérebro e coração e ligeiramente diferentes no fígado (Figura 7C-D e B, respetivamente).

Até aumentos mais robustos foram observados no estado estável. No fígado, a atividade LAD atingiu um estado estável em cerca de 40% de ratinhos não tratados e permaneceu ao mesmo nível durante até 6 horas, ao passo que no cérebro e coração, a atividade LAD no estado estável foi superior, com um pico às 4 horas para níveis de 80% e 100%, respetivamente. A proteína controlo LAD, que carecem da fração de entrega TAT, injetada na mesma quantidade e em condições idênticas, não aumentou significativamente na atividade LAD nos órgãos. Além de e também de importância foi de facto que 24 horas após a injeção, a atividade LAD ainda foi 10% superior à atividade basal.

Logo, as proteínas de fusão PTD-LAD são capazes de restaurar completamente a atividade LAD deficiente num modelo de doença deficiente em LAD e, portanto, são capazes de tratar episódios de descompensação aguda. A magnitude a longo prazo do aumento após apenas um único tratamento, 10%, é também suficiente para afetar o estado clínico de muitos casos.

#### **EXEMPLO 7: TAT-LAD aumenta a atividade PDHC em órgãos de ratinhos deficientes em LAD**

##### **MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS**

O princípio da medição da atividade PDHC em tecidos de ratinhos. Foi utilizado um kit da Mitosciences™ (Catálogo N.º MSP18) para medir a atividade enzimática PDHC. PDHC foi imuno-capturado dos lisados dos tecidos e a sua atividade enzimática é medida. Isto assegurou que qualquer aumento na atividade PDHC medida resultou apenas da TAT-LAD que se tinha



integrado no complexo PDHC. O ensaio enzimático mede a redução em NAD<sup>+</sup> para NADH por um aumento na absorvância a 340nm.

### **RESULTADOS**

A experiência seguinte testou diretamente a capacidade das proteínas de fusão PTD-LAD de substituírem a enzima endógena mutada, seguindo-se a integração com sucesso nos seus complexos enzimáticos multi-componentes naturais, nos órgãos dos ratinhos injetados com TAT-LAD descritos no Exemplo 5. A Figura 8A representa o aumento em percentagem em relação à atividade basal PDHC de ratinhos E3 não tratados (tratados com mock por injeção com PBS) em cada órgão. Cérebros e corações (Figura 8C-D, respetivamente) de ratinhos E3 tratados responderam ambos de forma robusta ao tratamento com TAT-LAD; com picos às 4 horas, com um aumento de 145% na atividade enzimática PDHC; amostras de fígado (Figura 8B) tiveram picos às 2 horas com um aumento de 135% na atividade. Um aumento substancial e significativo na atividade enzimática PDHC (40-65%) também foi evidente nos três órgãos às 24 horas após tratamento. O tratamento com a proteína controlo LAD não afetou a atividade basal PDHC. De forma interessante, o aumento percentual na atividade PDHC foi muito superior do que o da atividade LAD nos tecidos, salientando a potência das proteínas de fusão utilizadas (Figura 9A-C).

Assim, uma única aplicação de uma proteína de fusão PTD-LAD é capaz de aumentar significativamente a atividade PDHC num modelo de doença de deficiência em LAD. As proteínas de fusão PTD-LAD são, assim, capazes de tratar e melhorar as patologias de deficiência em LAD.

### **EXEMPLO 8: TAT-ORF66 restaura atividade do Complexo I nas células de um paciente com deficiência em NADH:ubiquinona oxidoreductase (Complexo I)**

#### **MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS**

Para construir um plasmídeo que expressa uma fusão TAT-C6ORF66, o gene para C6ORF66 humana foi amplificado por PCR a partir de biblioteca de ADN complementar de linfócitos,

utilizando os oligonucleotídeos apresentados na SEQ. ID N.º 47 (frente) e SEQ. ID N.º 48 (reversa). O produto de PCR foi clonado a jusante da sequência TAT num fragmento pTAT digerido com BamHI/XhoI.

### **RESULTADOS**

Uma mutação com alteração de sentido num resíduo conservado do gene C6ORF66 foi identificada numa família consanguínea que se apresentou com encefalomiopatia mitocondrial infantil atribuída a deficiência em NADH:ubiquinona oxidoredutase (Complexo I) isolada. No músculo dos pacientes, os níveis da proteína C6ORF66 e do Complexo I completamente montado foram marcadamente reduzidos. Transfecção dos fibroblastos dos pacientes com ADNc de C6ORF66 de tipo selvagem restaurou a atividade do complexo I (Saada A et al, C6ORF66 is an assembly factor of mitochondrial complex I. Am J Hum Genet 82(1):32-8, 2008).

A sequência de ARNm de C6ORF66 é apresentada na SEQ. ID N.º 7 (acesso do banco de genes # NM\_014165).

A sequência de aminoácidos do produto de C6ORF66 é apresentada na SEQ. ID N.º 8 (acesso do banco de genes # NM\_014165). Os primeiros 34 resíduos da proteína, (SEQ. ID N.º 9), são previstos pelo programa TargetP para formar a sequência de direcionamento mitocondrial (Saada A et al, *ibid*).

Para testar a capacidade de uma proteína de fusão TAT para tratar deficiência no Complexo I, uma proteína de fusão TAT-C6ORF66 foi construída e altamente purificada. Células de fibroblasto primárias isoladas de um paciente com a mutação com alteração de sentido no gene C6ORF66 foram incubadas com TAT-ORF66 durante 48 horas e mitocôndrias foram isoladas e analisadas para a atividade do complexo I. A proteína de fusão TAT foi capaz de restaurar 80% da atividade do complexo I de tipo selvagem na mitocôndria (Figura 10).

Assim, a deficiência no Complexo I é tratável utilizando proteínas de fusão TAT.

Os resultados apresentados aqui demonstram que uma variedade de enzimas mitocondriais pode ser tratada com sucesso por ERT utilizando proteínas de fusão baseadas em PTD. Deficiências em LAD, uma enzima que faz parte de vários complexos enzimáticos multi-componentes e C6ORF66, um fator de montagem do Complexo I, foram tratadas com sucesso. De notar, que as enzimas foram capazes de translocar para a mitocôndria e funcionam no contexto sensível à conformação destes complexos enzimáticos com a sua atividade intacta, após remoção das partes heterólogas da molécula.

Os resultados apresentados aqui demonstram que uma variedade de distúrbios metabólicos mitocondriais é tratável por ERT utilizando proteínas de fusão baseadas em PTD, conforme evidenciado pelo tratamento de ambas deficiência em LAD e deficiência no Complexo I.

#### Referências

- Chinnery, P.F. e Schon, E.A. Mitochondria. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 74, 1188-1199 (2003).
- Brautigam, C.A., Chuang, J.L., Tomchick, D.R., Machius, M. e Chuang, D.T. Crystal structure of human dihydrolipoamide dehydrogenase: NAD<sup>+</sup>/NADH binding and the structural basis of disease-causing mutations. J. Mol. Biol. 350, 543-552 (2005).
- Vettakkorumakankav, N.N. e Patel, M.S. Dihydrolipoamide dehydrogenase: structural and mechanistic aspects. Indian J. Biochem. Biophys. 33, 168-176 (1996).
- Berger, I., Elpeleg, O.N. e Saada, A. Lipoamide dehydrogenase activity in lymphocytes. Clin. Chim. Acta. 256, 197-201 (1996).
- Elpeleg, O.N. et al. Lipoamide dehydrogenase deficiency: a new cause for recurrent myoglobinuria. Muscle Nerve 20, 238-240 (1997).
- Shaag, A. et al. Molecular basis of lipoamide dehydrogenase deficiency in Ashkenazi Jews. Am. J. Med Genet. 82, 177-182 (1999).

Saada, A., Aptowitz, I., Link, G. e Elpeleg, O.N. ATP synthesis in lipoamide dehydrogenase deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 382-386 (2000).

Brady, RO. e Schiffmann, R. Enzyme-replacement therapy for metabolic storage disorders. *Lancet Neurol.* 3, 752-756 (2004).

Futaki, S. et al. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* 276, 5836-5840 (2001).

Kuppuswamy M et al, Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res* 17(9):3551-61, 1989).

Del Gaizo, V., MacKenzie, J.A. e Payne, R.M. Targeting proteins to mitochondria using TAT. *Mol. Genet. Metab.* 80, 170-180 (2003a).

Del Gaizo, V. e Payne, R.M. A novel TAT-mitochondrial signal sequence fusion protein is processed, stays in mitochondria, and crosses the placenta. *Mol. Ther.* 7, 720-730 (2003b).

Bourgeron, T., Chretien, D., Rotig, A., Munnich, A. e Rustin, P. Isolation and characterization of mitochondria from human B lymphoblastoid cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 16-23 (1992).

#### LISTA DE SEQUÊNCIAS

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

<120> MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS MITOCONDRIAIS

<130> Yissum-001-PCT

<160> 50

<170> PatentIn Versão 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> construção artificial

<400> 1

cgggatccgc agagctggag tc 22

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> construção artificial

<400> 2

cccctcgagt caaaagttga ttg 23

<210> 3

<211> 1629

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> construção artificial

&lt;400&gt; 3

atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat	60
atgaggaaga agcggagaca gcgacgaaga ggctcggatc cgcagagctg gagtcgtgtg	120
tactgctcct tggccaagag aggccatttc aatcgaatat ctcatggcct acagggactt	180
tctgcagtgc ctctgagaac ttacgcagat cagccgattg atgctgatgt aacagttata	240
ggttctggtc ctggaggata tgttgctgct attaaagctg cccagttagg cttcaagaca	300
gtctgcattg agaaaaatga aacacttggg ggaacatgct tgaatggtg ttgtattcct	360
tctaaggctt tattgaacaa ctctcattat taccatatgg cccatggaac agattttgca	420
tctagaggaa ttgaaatgtc cgaagttcgc ttgaaattag acaagatgat ggagcagaag	480
agtactgcag taaaagcttt aacaggtgga attgcccact tattcaaca gaataaggtt	540
gttcatgtca atggatatgg aaagataact ggcaaaaatc aagtcactgc tacgaaagct	600
gatggcggca ctcaggttat tgatacaaa aacattctta tagccacggg ttcagaagtt	660
actccttttc ctggaatcac gatagatgaa gatacaatag tgtcatctac aggtgcttta	720
tctttaaaaa aagttccaga aaagatggtt gttattggtg caggagtaat aggtgtagaa	780
ttgggttcag tttggcaaag acttgggtgca gatgtgacag cagttgaatt tttaggtcat	840
gtaggtggag ttggaattga tatggagata tctaaaaact ttcaacgcat ccttcaaaaa	900
caggggttta aatttaaatt gaatacaaa gttactggtg ctaccaagaa gtcagatgga	960
aaaattgatg tttctattga agctgcttct ggtggtaaag ctgaagttat cacttgtgat	1020
gtactcttgg tttgcattgg ccgacgacct ttactaaga atttgggact agaagagctg	1080
ggaattgaaac tagatcctag aggtagaatt ccagtcaata ccagatttca aactaaaatt	1140
ccaaatatct atgccattgg tgatgtagtt gctggtccaa tgctggctca caaagcagag	1200
gatgaaggca ttatctgtgt tgaaggaatg gctggtggtg ctgtgcacat tgactacaat	1260
tgtgtgccat cagtgattta cacacacctt gaagttgctt gggttggcaa atcagaagag	1320
cagttgaaag aagaggggtat tgagtacaaa gttgggaaat tcccatttgc tgctaacagc	1380
agagctaaga caaatgctga cacagatggc atggtgaaga tccttgggca gaaatcgaca	1440
gacagagtac tgggagcaca tattcttggg ccaggtgctg gagaaatggt aaatgaagct	1500
gctcttgctt tggaaatag agcatcctgt gaagatatag cttagagtctg tcatgcacat	1560
ccgaccttat cagaagcttt tagagaagca aatcttgctg cgtcatttgg caaatcaatc	1620
aacttttga	1629

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 543

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construção artificial

&lt;400&gt; 4

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro  
 1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Ser  
 20 25 30

Asp Pro Gln Ser Trp Ser Arg Val Tyr Cys Ser Leu Ala Lys Arg Gly  
 35 40 45

His Phe Asn Arg Ile Ser His Gly Leu Gln Gly Leu Ser Ala Val Pro  
 50 55 60

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



Lys Ile Asp Val Ser Ile Glu Ala Ala Ser Gly Gly Lys Ala Glu Val  
 325 330 335  
 Ile Thr Cys Asp Val Leu Leu Val Cys Ile Gly Arg Arg Pro Phe Thr  
 340 345 350  
 Lys Asn Leu Gly Leu Glu Glu Leu Gly Ile Glu Leu Asp Pro Arg Gly  
 355 360 365  
 Arg Ile Pro Val Asn Thr Arg Phe Gln Thr Lys Ile Pro Asn Ile Tyr  
 370 375 380  
 Ala Ile Gly Asp Val Val Ala Gly Pro Met Leu Ala His Lys Ala Glu  
 385 390 395 400  
 Asp Glu Gly Ile Ile Cys Val Glu Gly Met Ala Gly Gly Ala Val His  
 405 410 415  
 Ile Asp Tyr Asn Cys Val Pro Ser Val Ile Tyr Thr His Pro Glu Val  
 420 425 430  
 Ala Trp Val Gly Lys Ser Glu Glu Gln Leu Lys Glu Glu Gly Ile Glu  
 435 440 445  
 Tyr Lys Val Gly Lys Phe Pro Phe Ala Ala Asn Ser Arg Ala Lys Thr  
 450 455 460  
 Asn Ala Asp Thr Asp Gly Met Val Lys Ile Leu Gly Gln Lys Ser Thr  
 465 470 475 480  
 Asp Arg Val Leu Gly Ala His Ile Leu Gly Pro Gly Ala Gly Glu Met  
 485 490 495  
 Val Asn Glu Ala Ala Leu Ala Leu Glu Tyr Gly Ala Ser Cys Glu Asp  
 500 505 510  
 Ile Ala Arg Val Cys His Ala His Pro Thr Leu Ser Glu Ala Phe Arg  
 515 520 525  
 Glu Ala Asn Leu Ala Ala Ser Phe Gly Lys Ser Ile Asn Phe Glx  
 530 535 540

<210> 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> construção artificial

<400> 5

cgggatccgg cagatcagcc gattgat 27

<210> 6

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> construção artificial

<400> 6

cccctcgagt caaaagttga ttg 23

<210> 7

<211> 1458

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

acttgtgcgc atgctccggg tgtcccggag ttgtcctgcg ccggtgttcc cacgtgcggc	60
ctgaacctga ggcataatg ttatgaggag atgggagcac tagtgattcg cggatcagg	120
aatttcaacc tagagaaccg agcggaacgg gaaatcagca agatgaagcc ctctgtcgt	180
cccagacacc cctctaccaa cagcctcctg cgagagcaga ttagtctcta tccagaagtt	240
aaaggagaga ttgctcgtaa agatgaaaag ctgctgtcgt ttctaaaaga tgtgtatggt	300
gattccaaaag atcctgtgtc ttccttgtag gtaaaagctg ctgaaacatg tcaagagccg	360
aaggaattca gattgccgaa agaccatcat tttgatatga taaatattaa gagcattccc	420
aaaggcaaaa tttccattgt agaagcattg acacttctca ataatacataa gcttttccca	480
gaaacctgga ctgctgagaa aataatgcag gaataccagt tagaacagaa agatgtgaat	540
tctcttctta aatattttgt tacttttgaa gtcgaaatct tccctcctga agacaagaaa	600
gcaatacgat caaatgaag aaaatcacag aaatttctta tgtgtactcc tcatcctcc	660
tgctgtatat tttctcattt tttgcgtaat aaattatggt aattaccaa tattaatgc	720
tctcattgtg agggcatact cttaatattt attgagctcc ctgacttttc aagattgccca	780
tagaatatct tttgttttat ttaatttgg tttaggcata tttcataagt gcatgtcagc	840
atgactgagc acatctgtac ctttattatg gtgaaagagt taatttgta ttttaggcac	900
atataccaac ttttaattg gtcataattac cccttgggaa atgctctgaa tccctcaact	960
gagttttact ttccaagta ggtgtttagt tcattcttct catgcgatag tgaaagtaaa	1020
agctttcctg acccttaaga ctgacatttt ctggttaggg aaagagactc gatagcaggg	1080
tagactaaca gtagtccca aataaaggca cacaggagaa aatgaatcaa tagaatctaa	1140
ttaaaattac tactccaggg aataagaagt attgaggatt tattttattt tgaattgggt	1200
ttaagtatgg aataattgtc tttacagtta taaaaagtaa ttagtgggtg ttacaaaatg	1260
ttgggaattt ctgctttgac agataggtaa gtcccatggg aatttctgct ttgacaaata	1320
gttaagtccc atggccttca gagaggcagg aagcagaaac tttcaaaaaa gtaacatttc	1380
tctggattta atgtggaaat agagaaaaat ttaaagaata attaaaaaac catggtagat	1440
gaaatttgggt gattacat	1458

<210> 8

<211> 175

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

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

<210> 9

<211> 34

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

<210> 10  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> vírus da imunodeficiência humana de tipo 1  
 <400> 10

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

<210> 11  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> vírus herpes simplex 7  
 <400> 11

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

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

**Val Asp**

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

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

<210> 13  
 <211> 27

<212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> construção sintética  
 <400> 13

**Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu**  
**1 5 10 15**  
**Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu**  
**20 25**

<210> 14  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Desconhecido

<220>  
 <223> fonte desconhecida  
 <400> 14

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

<210> 15  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Desconhecido

<220>  
 <223> fonte desconhecida

&lt;400&gt; 15

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

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

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 509

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 16

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

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

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





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

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Desconhecido

&lt;220&gt;

<223> fonte desconhecida

<400> 17

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

**Leu Leu Arg Ala**  
**20**

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 18

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

**Pro Pro**

<210> 19

<211> 27

<212> PRT

<213> *Caiman crocodilus*

<400> 19

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

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

<210> 20  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Desconhecido

<220>  
 <223> fonte desconhecida

<400> 20

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

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

<210> 21  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Desconhecido

<220>  
 <223> fonte desconhecida

<400> 21

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

**Lys Lys Arg Lys Val**  
**20**

<210> 22  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> vírus da imunodeficiência humana de tipo 1

<400> 22

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

Arg

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> herpesvírus felino 1

<400> 23

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

<210> 24

<211> 19

<212> PRT

<213> vírus do mosaico do bromo

<400> 24

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

Thr Ala Arg

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> vírus linfotrópico humano de tipo III

<400> 25

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

<210> 26

<211> 22

<212> PRT

<213> *Cabassous unicinctus*

<400> 26

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

Asn Lys Arg Asn Thr Arg  
 20

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> fago P22 de enterobactérias

<400> 27

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

Arg

<210> 28

<211> 18

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> fonte desconhecida

<400> 28

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

Arg Arg

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> *saccharomyces cerevisiae*

<400> 29

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

<210> 30

<211> 26

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

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

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

<210> 31

<211> 28

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

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

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

<210> 32

<211> 22

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 32

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

Leu Gln Arg Met Lys Gln  
 20

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 33

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5

<210> 34

<211> 24

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 34

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

Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro  
 20

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> *Acidithiobacillus ferrooxidans*

<400> 35

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

<210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 36

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

Lys Lys Arg Lys Val  
 20

<210> 37

<211> 16



<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 37

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

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 38

**Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg**  
**1 5 10**

<210> 39

<211> 35

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 39

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

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

**Arg Thr Tyr**  
**35**



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

**1**

**5**

**10**

<210> 43

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 43

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

<210> 44

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 44

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

**Ser Lys**

<210> 45

<211> 1599

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 45

atgggcagca gccatcatca tcacatcac agcagcggcc tggcgccgcg cggcagccat	60
atgtcggatc cgcagagctg gagtcgtgtg tactgctcct tggccaagag aggccatttc	120
aatcgaatat ctcatggcct acagggactt tctgcagtgc ctctgagaac ttacgcagat	180
cagccgattg atgctgatgt aacagttata ggttctggtc ctggaggata tgttgctgct	240
attaaagctg cccagttagg ctccaagaca gtctgcattg agaaaaatga aacacttggg	300
ggaacatgct tgaatgttgg ttgtattcct tctaaggcct tattgaacaa ctctcattat	360
taccatatgg cccatggaac agattttgca tctagaggaa ttgaaatgtc cgaagttcgc	420
ttgaatttag acaagatgat ggagcagaag agtactgcag taaaagcttt aacagggtga	480
attgccact tattcaaaca gaataagggt gttcatgtca atggatatgg aaagataact	540
ggcaaaaatc aagtcactgc tacgaaagct gatggcggca ctcaggttat tgatacaaag	600
aacattctta tagccacggg ttcagaagtt actccttttc ctggaatcac gatagatgaa	660
gatacaatag tgtcatctac aggtgcttta tctttaaaaa aagttccaga aaagatgggt	720
gttattggtg caggagtaat aggtgtagaa ttgggttcag tttggcaaag acttggtgca	780
gatgtgacag cagttgaatt tttaggatcat gtagggtggag ttggaattga tatggagata	840
tctaaaaact ttcaacgcat ccttcaaaaa caggggttta aatttaaatt gaatacaaag	900
gttactggtg ctaccaagaa gtcagatgga aaaattgatg tttctattga agctgcttct	960
gggtgtaaaag ctgaagttat cacttgtgat gtactcttgg tttgcattgg ccgacgaccc	1020
tttactaaga atttgggact agaagagctg ggaattgaac tagatcctag aggtagaatt	1080
ccagtcata ccagatttca aactaaaatt ccaaatatct atgccattgg tgatgtagtt	1140
gctggtccaa tgctggctca caaagcagag gatgaaggca ttatctgtgt tgaaggaatg	1200
gctggtggtg ctgtgcacat tgactacaat tgtgtgcat cagtgattta cacacacctt	1260
gaagttgctt gggttggcaa atcagaagag cagttgaaag aagaggggat tgagtacaaa	1320
gttgggaaat tcccatttgc tgctaacagc agagctaaga caaatgtga cacagatggc	1380
atggtgaaga tccttgggca gaaatcgaca gacagagtac tgggagcaca tattcttggg	1440
ccaggtgctg gagaaatggt aatgaagct gctcttgctt tggaatatgg agcatcctgt	1500
gaagatatag ctagagtctg tcatgcacat ccgaccttat cagaagcttt tagagaagca	1560
aatcttgctg cgtcatttgg caaatcaatc aacttttga	1599

<210> 46

<211> 532

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 46

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

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

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

<210> 47  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> construção sintética

<400> 47  
 cgggatccgg gagcactagt gatt 24

<210> 48  
 <211> 27  
 <212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 48

cccctcgagt cattttgatc gtattgc 27

<210> 49

<211> 31

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 49

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

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

<210> 50

<211> 55

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 50

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

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

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

Ala Arg Arg His Tyr Ser Glu  
50 55



**DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

**Documentos de patente referidos na descrição**

- WO 05042560 A, Payne [0014]
- US 20060211647 A, Khan [0015]
- WO 05001062 A, Khan [0016]

**Documentos de não patente citados na descrição**

- **SLY WS.** Enzyme replacement therapy: from concept to clinical practice. *Acta Paediatr*, 2002, vol. 91 (439), 71-8 [0011]
- **DESNICK RJ et al.** Fabry disease: clinical spectrum and evidence-based enzyme replacement therapy. *Nephrol Ther*, 2006, vol. 2, 172-85 [0011]
- **SCARPA M et al.** Mucopolysaccharidosis VI: the Italian experience. *Eur J Pediatr.*, 07 January 2009 [0012]
- **DEL GAIZO, V et al.** Targeting proteins to mitochondria using TAT. *Mol. Genet. Metab*, 2003, vol. 80, 170-180 [0014]
- **DEL GAIZO, V et al.** A novel TAT-mitochondrial signal sequence fusion protein is processed, stays in mitochondria, and crosses the placenta. *Mol. Ther.*, 2003, vol. 7, 720-730 [0014]
- **RAPOPORT M. et al.** *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, August 2006, vol. 29 (1), 15 [0017]
- **ANGDISEN J. et al.** *Current Drug Targets. Immune, Endocrine and Metabolic disorders*, March 2005, vol. 5 (1), 27-40 [0018]
- **TORO A. et al.** *The journal of clinical Investigation*,

October 2006, vol. 116 (10), 2717 [0019]

- **KHAN S.M. et al.** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, August 2004, vol. 36 (4), 387-393 [0020]
- **KLIVENYI, P. et al.** Mice deficient in dihydrolipoamide dehydrogenase show increased vulnerability to MPTP, malonate and 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *J Neurochem*, 2004, vol. 88, 1352-1360 [0103]
- **JOHNSON, MT et al.** Targeted disruption of the murine dihydrolipoamide dehydrogenase gene (Dld) results in perigastrulation lethality. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, vol. 94, 14512-14517 [0103]
- **SAADA A et al.** C6ORF66 is an assembly factor of mitochondrial complex I. *Am J Hum Genet*, 2008, vol. 82 (1), 32-8 [0115]
- **CHINNERY, P.F. ; SCHON, E.A. MITOCHONDRIA.** *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2003, vol. 74, 1188-1199 [0122]
- **BRAUTIGAM, C.A. ; CHUANG, J.L. ; TOMCHICK, D.R. ; MACHIUS, M. ; CHUANG, D.T.** Crystal structure of human dihydrolipoamide dehydrogenase: NAD<sup>+</sup>/NADH binding and the structural basis of disease-causing mutations. *J. Mol. Biol.*, 2005, vol. 350, 543-552 [0122]
- **VETTAKKORUMAKANKAV, N.N. ; PATEL, M.S.** Dihydrolipoamide dehydrogenase: structural and mechanistic aspects. *Indian J. Biochem. Biophys*, 1996, vol. 33, 168-176 [0122]
- **BERGER, I.; ELPELEG, O.N. ; SAADA, A.** Lipoamide dehydrogenase activity in lymphocytes. *Clin. Chim. Acta.*, 1996, vol. 256, 197-201 [0122]
- **ELPELEG, O.N. et al.** Lipoamide dehydrogenase deficiency: a new cause for recurrent myoglobinuria. *Muscle Nerve*, 1997, vol. 20, 238-240 [0122]
- **SHAAG, A. et al.** Molecular basis of lipoamide dehydrogenase deficiency in Ashkenazi Jews. *Am. J. Med Genet.*, 1999, vol. 82, 177-182 [0122]
- **SAADA, A. ; APTOWITZER, I. ; LINK, G. ; ELPELEG, O.N.** ATP synthesis in lipoamide dehydrogenase deficiency.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, vol. 269, 382-386  
[0122]

- **BRADY, RO. ; SCHIFFMANN, R.** Enzyme-replacement therapy for metabolic storage disorders. *Lancet Neurol.*, 2004, vol. 3, 752-756 [0122]
- **FUTAKI, S. et al.** Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 5836-5840 [0122]
- **KUPPUSWAMY M et al.** Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res*, 1989, vol. 17 (9), 3551-61 [0122]
- **DEL GAIZO, V. ; MACKENZIE, J.A. ; PAYNE, R.M.** Targeting proteins to mitochondria using TAT. *Mol. Genet. Metab.*, 2003, vol. 80, 170-180 [0122]
- **DEL GAIZO, V. ; PAYNE, R.M.** A novel TAT-mitochondrial signal sequence fusion protein is processed, stays in mitochondria, and crosses the placenta. *Mol. Ther.*, 2003, vol. 7, 720-730 [0122]
- **BOURGERON, T. ; CHRETIEN, D. ; ROTIG, A. ; MUNNICH, A. ; RUSTIN, P.** Isolation and characterization of mitochondria from human B lymphoblastoid cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, vol. 186, 16-23 [0122]

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Proteína de fusão para utilização num método de tratamento de um distúrbio mitocondrial num indivíduo, compreendendo a dita proteína de fusão um domínio de transdução de proteína (PTD) fundido a um componente funcional de uma enzima mitocondrial e uma sequência de direcionamento de mitocôndria (MTS),

em que a dita MTS está situada entre o dito PTD e o dito componente funcional e em que dito MTS é uma MTS de outra enzima mitocondrial que é codificada por um gene nuclear, em que a dita enzima mitocondrial é uma enzima de um complexo enzimático multi-componente mitocondrial, e

em que o dito domínio de transdução de proteína é um péptido TAT,

em que o dito tratamento compreende administrar a dita proteína de fusão a dito indivíduo e é um tratamento prolongado contínuo para uma doença crónica ou compreende uma única ou algumas administrações para o tratamento de uma condição patológica aguda.

2. Proteína de fusão para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a porção da dita proteína de fusão que é C-terminal face à dita MTS consiste na dita componente funcional de uma enzima.

3. Proteína de fusão para utilização de acordo com a reivindicação 2 em que não existem resíduos heterólogos à enzima presente C-terminal face ao MTS e a clivagem da dita MTS gera uma enzima com a sequência nativa, que é prontamente integrada num complexo enzimático multi-componente sensível conformacionalmente.

4. Proteína de fusão para utilização da reivindicação 1 ou 2, em que dita enzima é a lipoamida desidrogenase (LAD).

5. Proteína de fusão para utilização da reivindicação 1 ou 2, em que a dita enzima é selecionada do grupo que consiste na subunidade alfa da 2-oxoisovalerato desidrogenase (desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada E1 $\alpha$ ), subunidade beta da 2-oxoisovalerato desidrogenase (desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada E1 $\beta$ ), Acil-CoA desidrogenase, específica de cadeia média, acil-CoA desidrogenase, específica de cadeia muito longa, subunidade alfa da enzima trifuncional (3 hidroxiaçilo CoA desidrogenase de cadeia longa ou LCHAD) (HADHA), subunidade beta da enzima trifuncional (hidroxiaçil-CoA desidrogenase/3-cetoacil-CoA tiolase/enoil-CoA hidratase [HADHB]), subunidade beta do componente E1 da piruvato desidrogenase e subunidade alfa do componente E1 da piruvato desidrogenase.

6. Proteína de fusão para utilização da reivindicação 1 ou 2, em que o dito complexo enzimático multi-componente é selecionado do grupo que consiste em complexo piruvato desidrogenase (PDHC), complexo [alfa]-cetoglutatarato desidrogenase (KGDHC) e complexo desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada (BCKDHC).

7. A proteína de fusão para utilização da reivindicação 1 ou 2, em que dito complexo enzimático multi-componente é selecionado do grupo que consiste em complexo I (NADH-ubiquinona oxidorreductase), complexo II (succinatoubiquinona oxidorreductase), complexo III (ubiquinol-ferricitocromo c oxidorreductase), complexo IV (citocromo c oxidorreductase) e complexo V (F1F0 ATPase).

8. Proteína de fusão para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 em que o dito distúrbio mitocondrial é causado por uma mutação com alteração de sentido em dita enzima.

9. Proteína de fusão para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 em que o dito distúrbio mitocondrial é selecionado do grupo que consiste em deficiência em LAD e deficiência no complexo I isolado.

10. Proteína de fusão para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 em que o dito distúrbio mitocondrial é uma doença neurodegenerativa.

11. Proteína de fusão para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 em que o dito distúrbio mitocondrial é selecionado do grupo que consiste em encefalopatia e falha hepática que é acompanhada de acidose láctica tempestuosa, hiperamonémia e coagulopatia, doença de Alpers, síndrome de Barth, defeitos da beta-oxidação, deficiência em carnitina-acil-carnitina, deficiência em carnitina, deficiência na co-enzima Q10, deficiência no complexo I, deficiência no complexo II, deficiência no complexo III, deficiência no complexo IV, deficiência no complexo V, deficiência em COX, CPEO, KSS, LCHAD, doença ou síndrome de Leigh, LHON, LIC (cardiomiopatia infantil letal), doença de Luft, MELAS, MERRF, citopatia mitocondrial, miopatia mitocondrial, MNGIE, NARP e deficiência em piruvato desidrogenase.

12. Proteína de fusão para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 em que o dito distúrbio mitocondrial é selecionado do grupo que consiste em deficiência em ornitina transcarbamilase (hiperamoniemia) (OTCD), deficiência em carnitina opalmitoiltransferase II (CPT2), deficiência em fumarase, deficiência em citocromo c oxidase associada com síndrome de Leigh, doença da urina em xarope de açúcar (MSUD), deficiência em acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD), deficiência em acil-CoA desidrogenase de cadeia

muito longa (LCAD), deficiência em proteína trifuncional, oftalmoplegia externa progressiva com deleções de ADN mitocondrial (POLG), DGUOK, TK2, deficiência em piruvato decarboxilase, MMC-miopia e cardiomiopia maternal; etaxia, retinite pigmentosa; cardiomiopia infantil FICP-Fatal Mais, uma cardiomiopia associada a MELAS; MELAS-encefalomiopia mitocondrial com acidose láctica e episódios tipo derrame; LDYT-neuropatia ótica hereditária de Leber e distonia; MHCM-cardiomiopia hipertrófica herdada maternoalmente; DM-diabetes mellitus; DMDF diabetes mellitus + surdez; pseudo-obstrução intestinal crónica (CIPO) com miopia e oftalmoplegia; DEAF-surdez herdada maternoalmente; PEM-encefalopatia progressiva; SNHL-perda de audição sensorial-Neural; encefalomiopia; DEMCHO-demência e coreia; AMDF-ataxia, mioclono; epilepsia ESOC; atrofia ótica; FBSN-necrose estriada bilateral familiar; FSGS-glomerulosclerose segmental focal; L IMM-miopia mitocondrial infantil letal; MDM-miopia e diabetes mellitus; MEPR-epilepsia mioclónica e regressão psico-motora; doença de sobreposição MERME MERRF/MELAS; cardiomiopia hipertrófica herdada maternoalmente do MHCM; cardiomiopia herdada maternoalmente do MICM; MILS-síndrome de Leigh herdado maternoalmente; encefalocardiomiopia mitocondrial; distúrbio mitocondrial multi-sistema (miopia, encefalopatia, cegueira, perda de audição, neuropatia periférica); NAION-neuropatia ótica isquémica anterior não-arterítica; PEM-encefalopatia progressiva; PME-epilepsia mioclono progressiva; RTT-síndrome de Rett; SIDS-síndrome da morte súbita infantil; e MIDD-diabetes e surdez herdados maternoalmente.

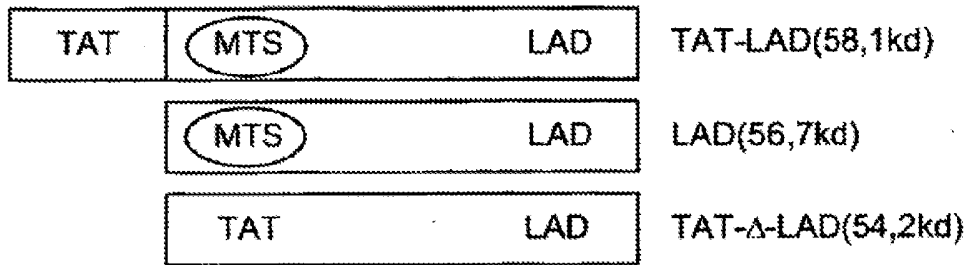


FIG. 1A

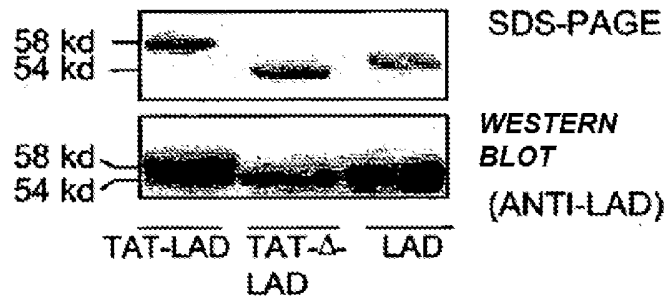


FIG. 1B

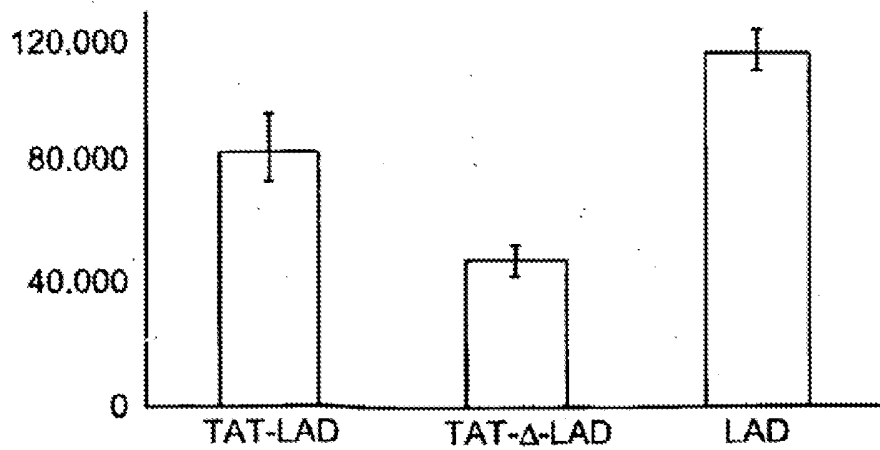


FIG. 1C



FIG. 2A

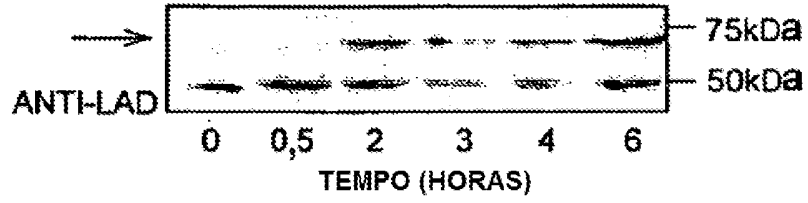


FIG. 2B

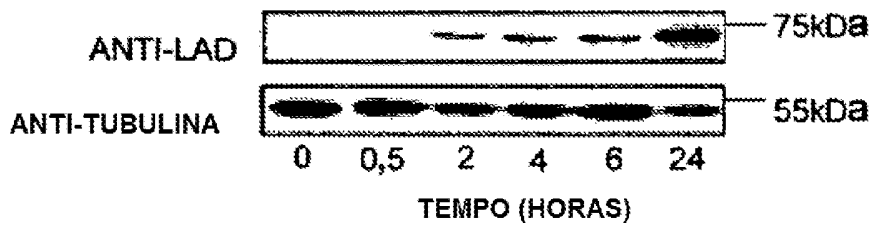
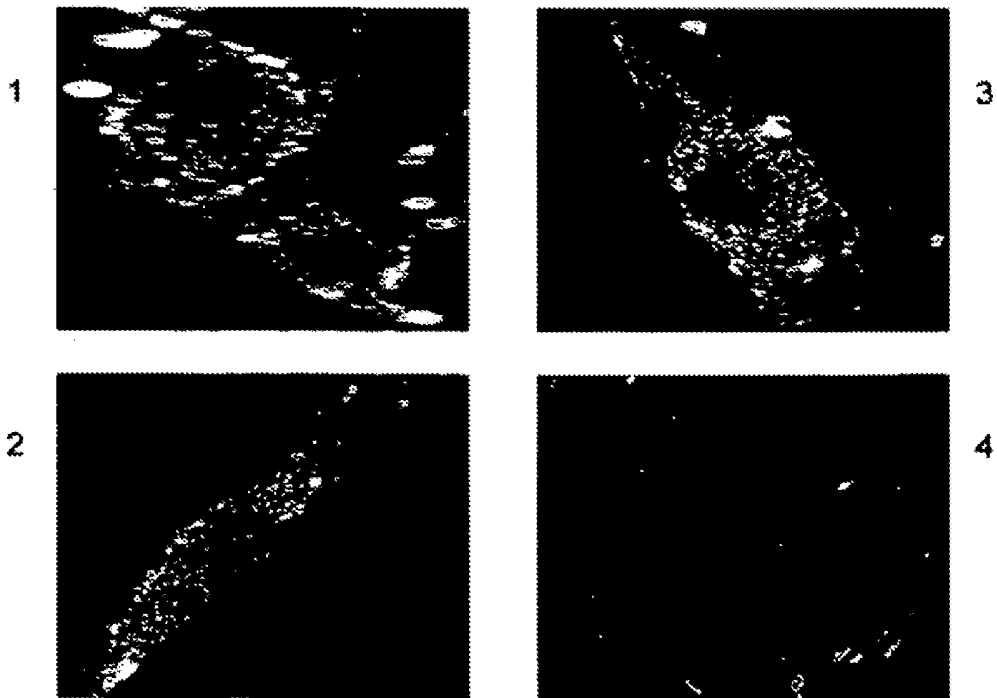
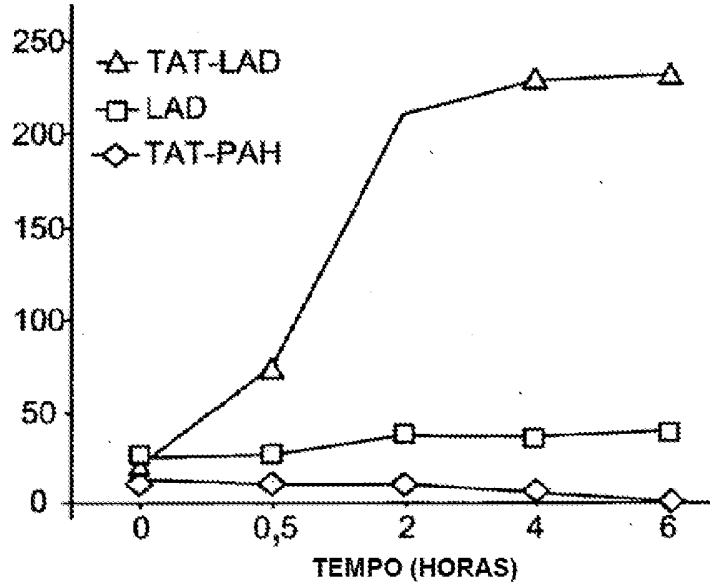


FIG. 2C



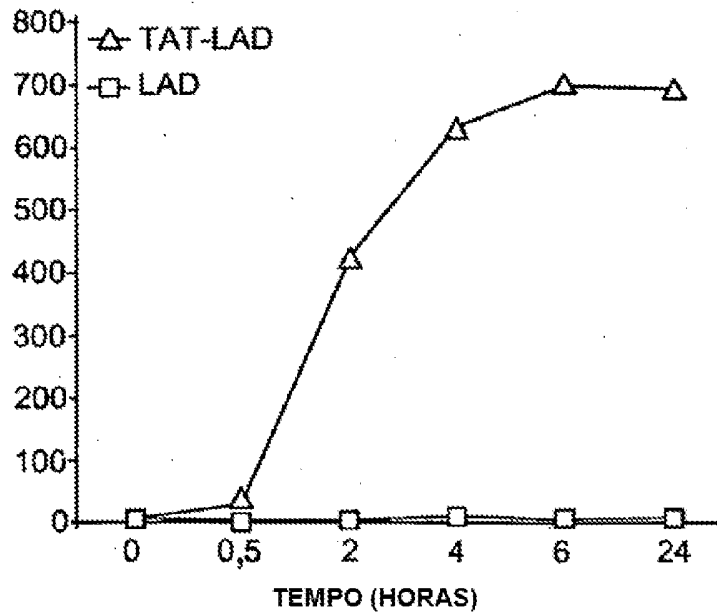
ATIVIDADE LAD  
(NMOL/MIN/MG)

FIG. 2D



ATIVIDADE LAD  
(NMOL/MIN/MG)

FIG. 2E



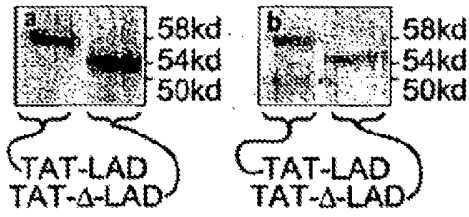


FIG. 3A

FIG. 3B

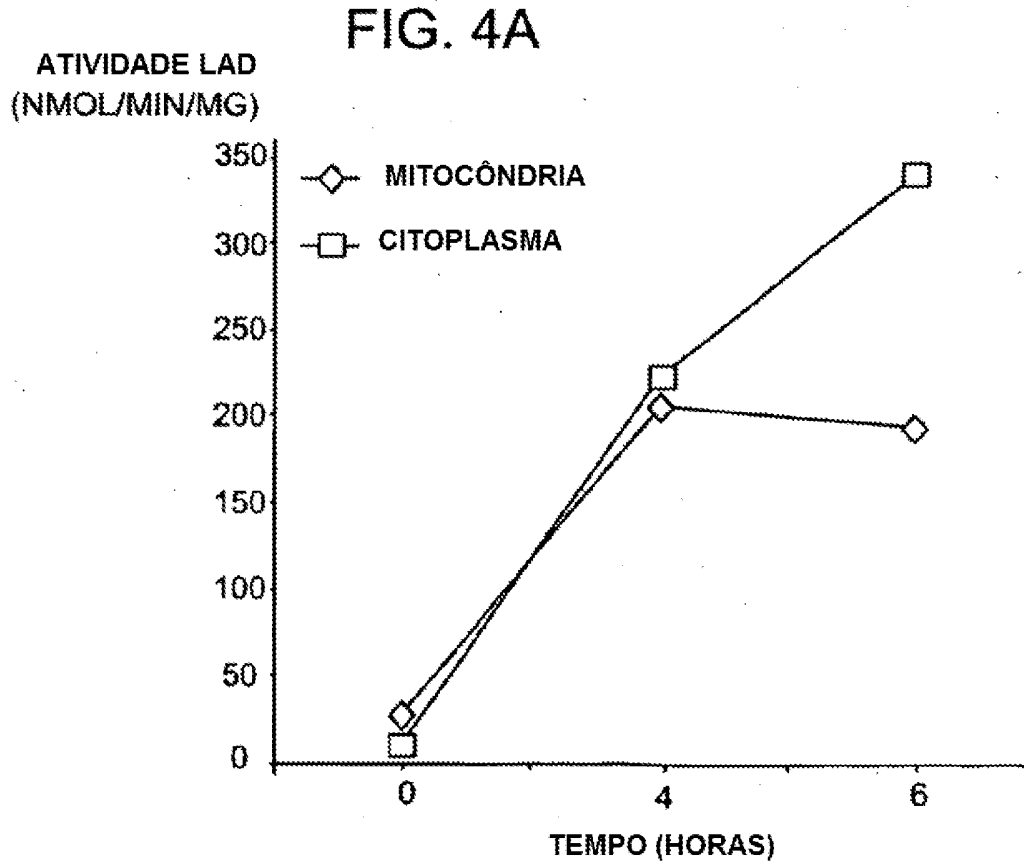


FIG. 4B

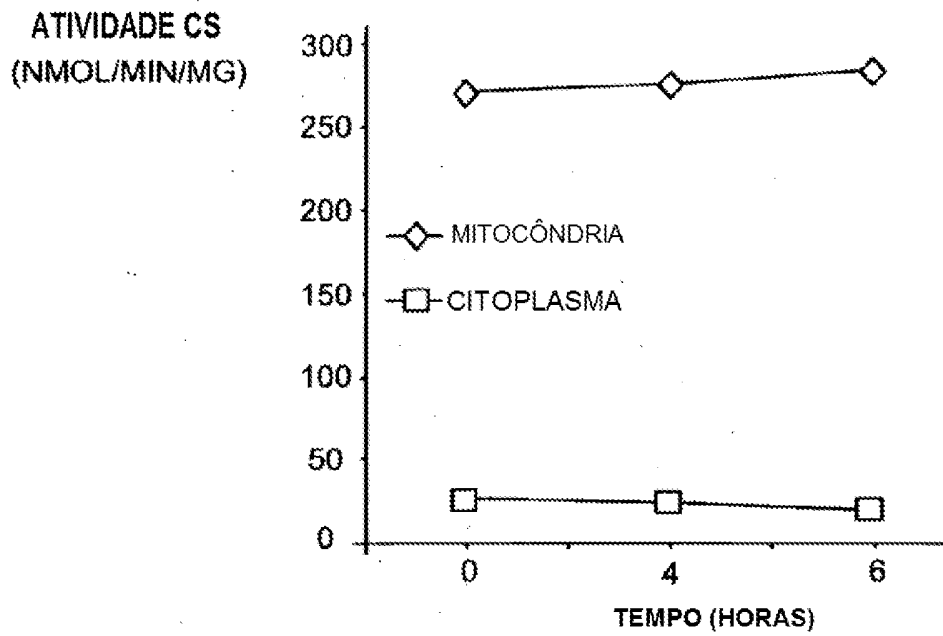


FIG. 4C

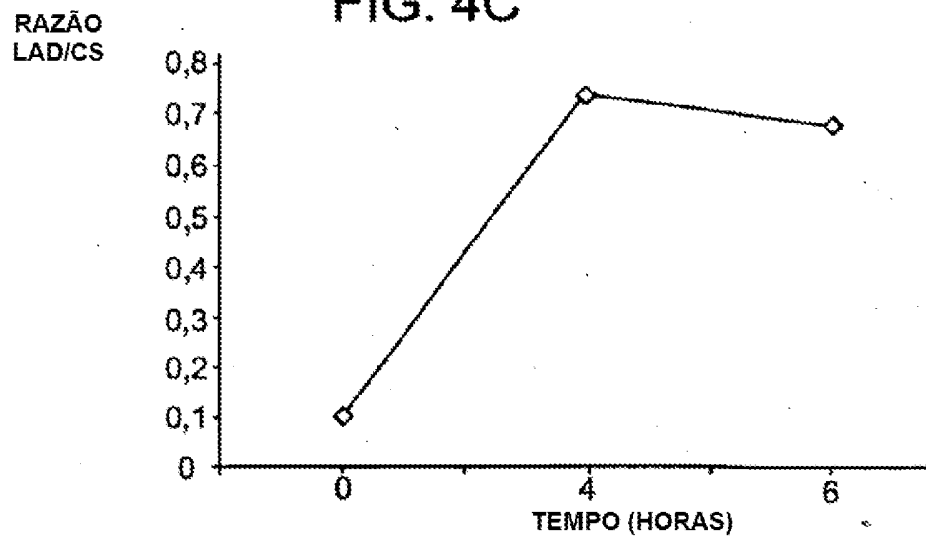


FIG. 4D

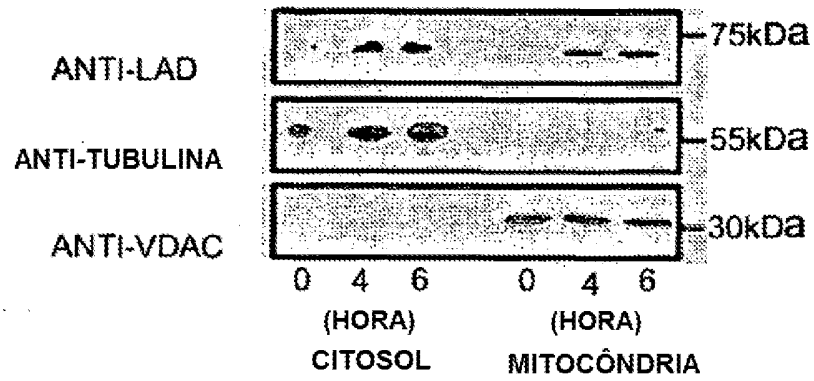
ATIVIDADE LAD  
(NMOL/MIN/MG)

FIG. 4E

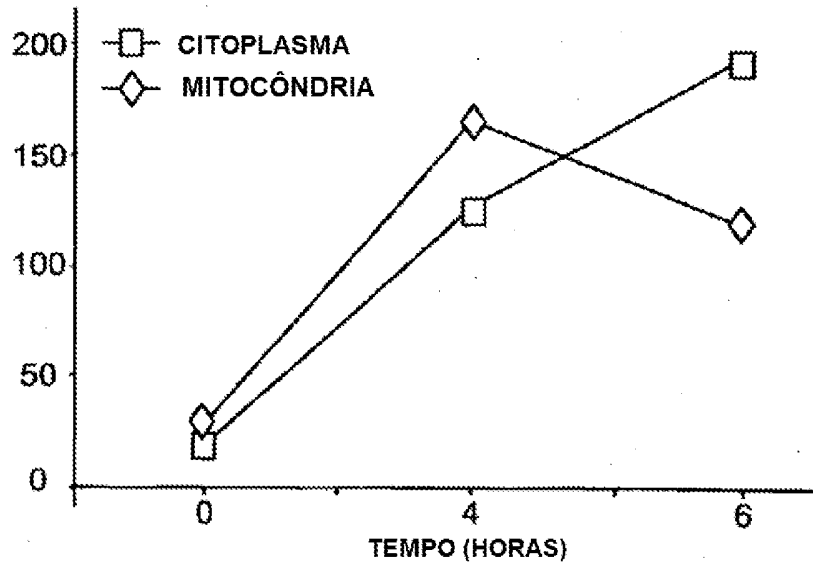


FIG. 4F

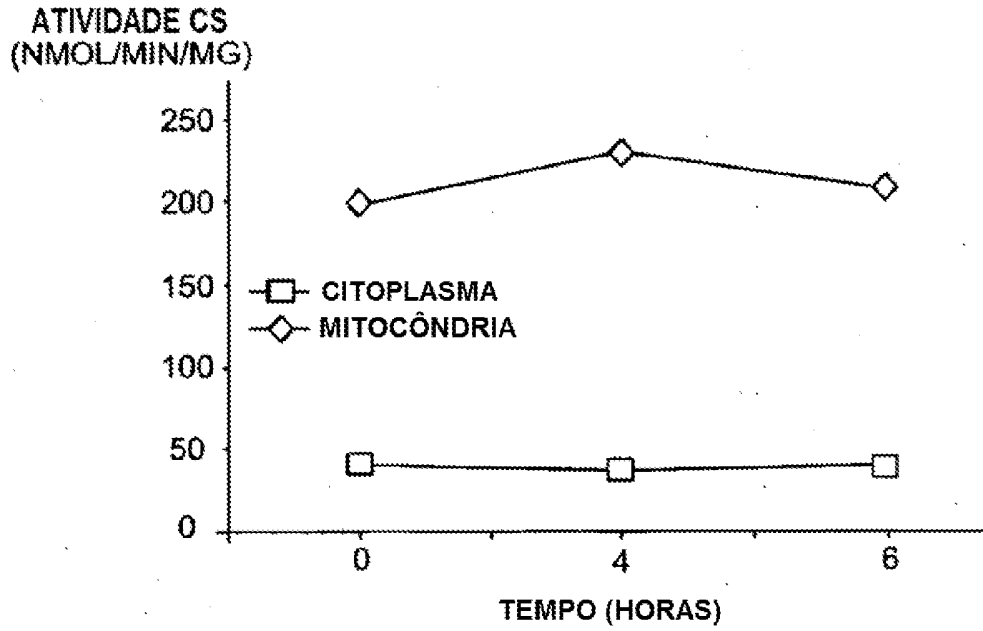


FIG. 4G

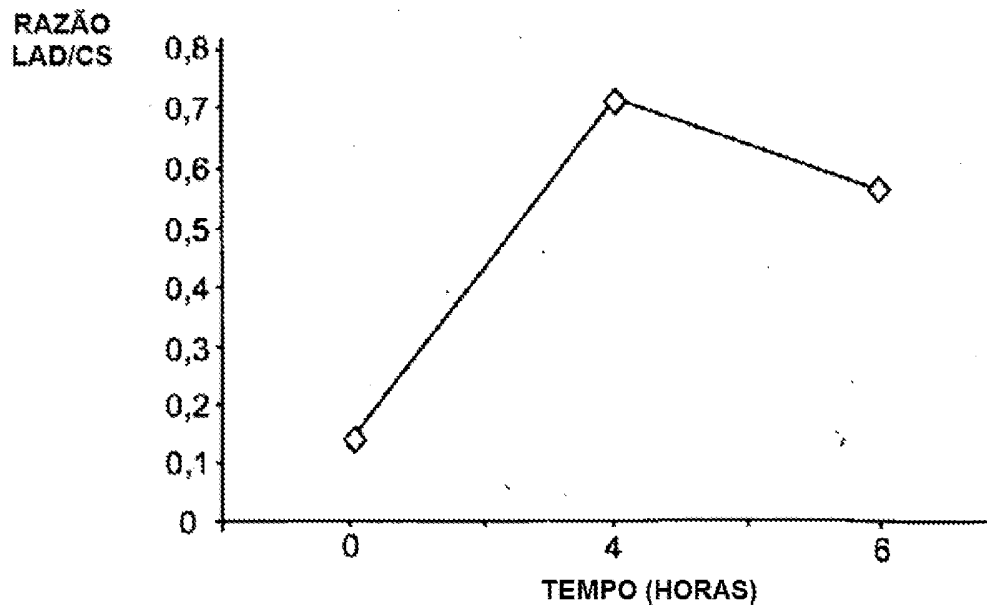


FIG. 4H

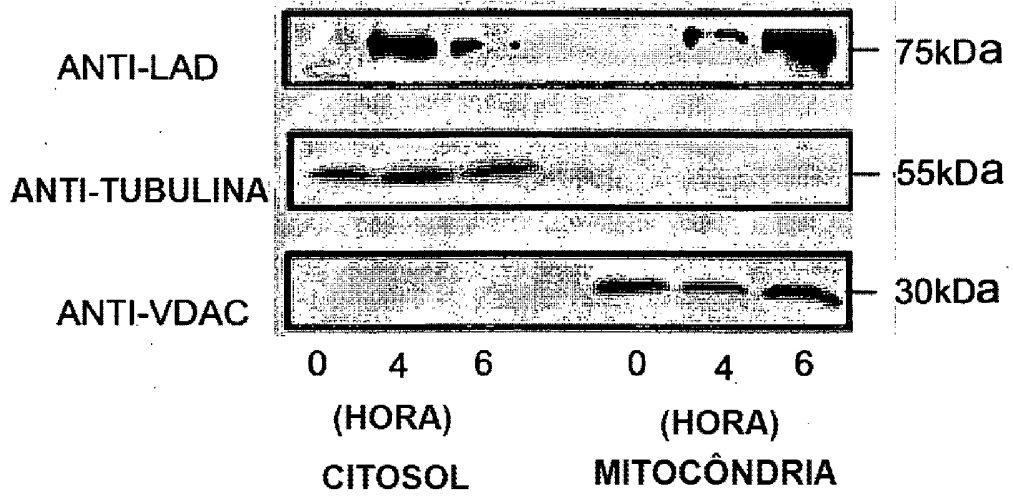
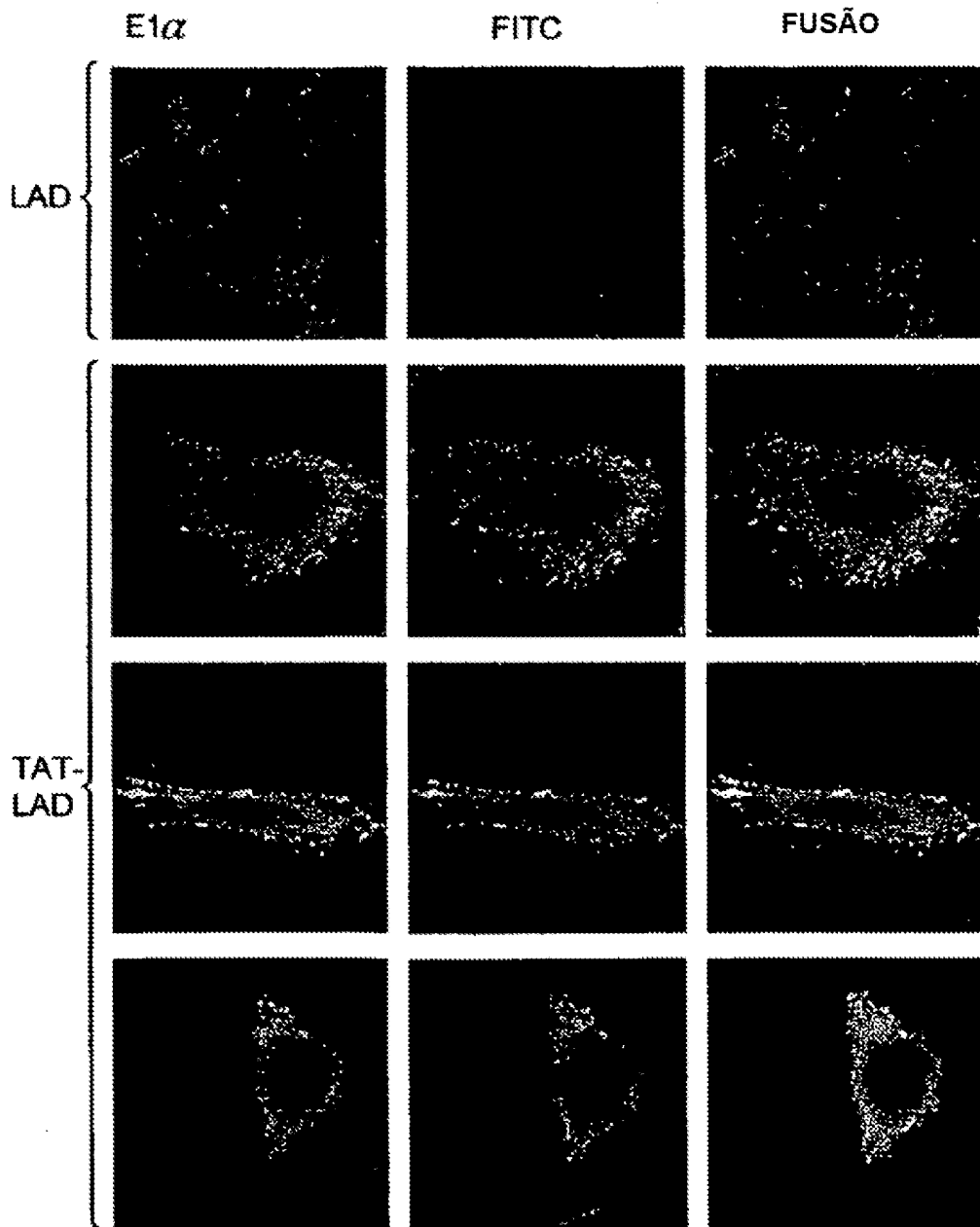


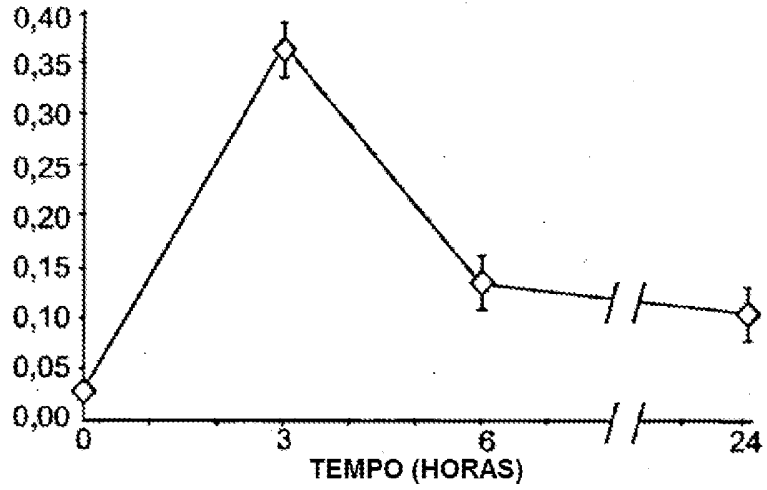
FIG. 5A





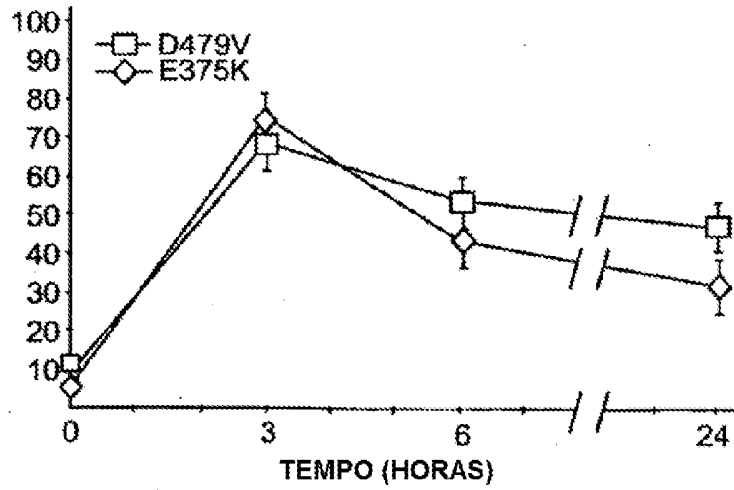
ATIVIDADE PDHC  
(NMOL/MIN/MG)

FIG. 5B



ATIVIDADE PDHC  
(% DO NORMAL)

FIG. 5C



% DA ATIVIDADE  
NO PONTO DE PARTIDA

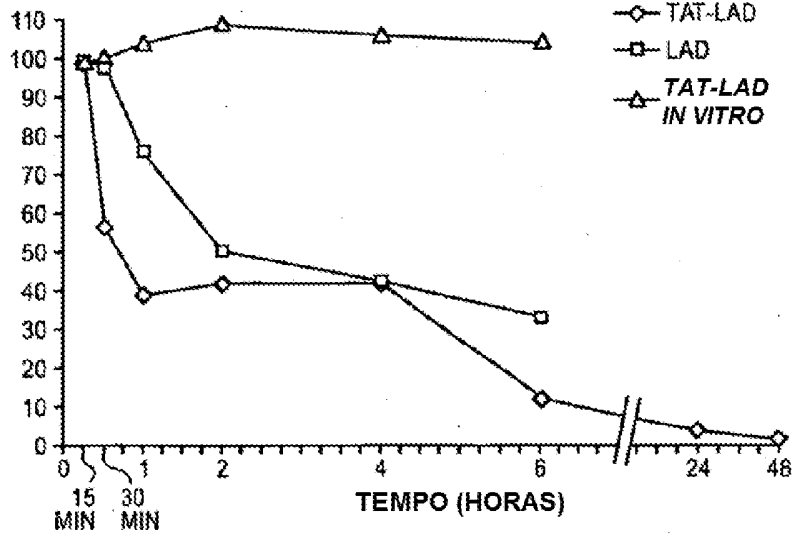


FIG. 6

%  
DO AUMENTO

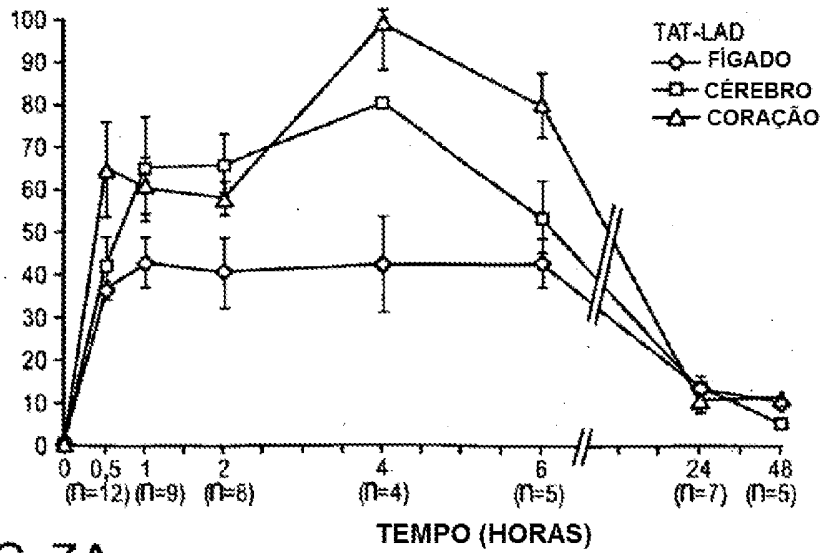


FIG. 7A

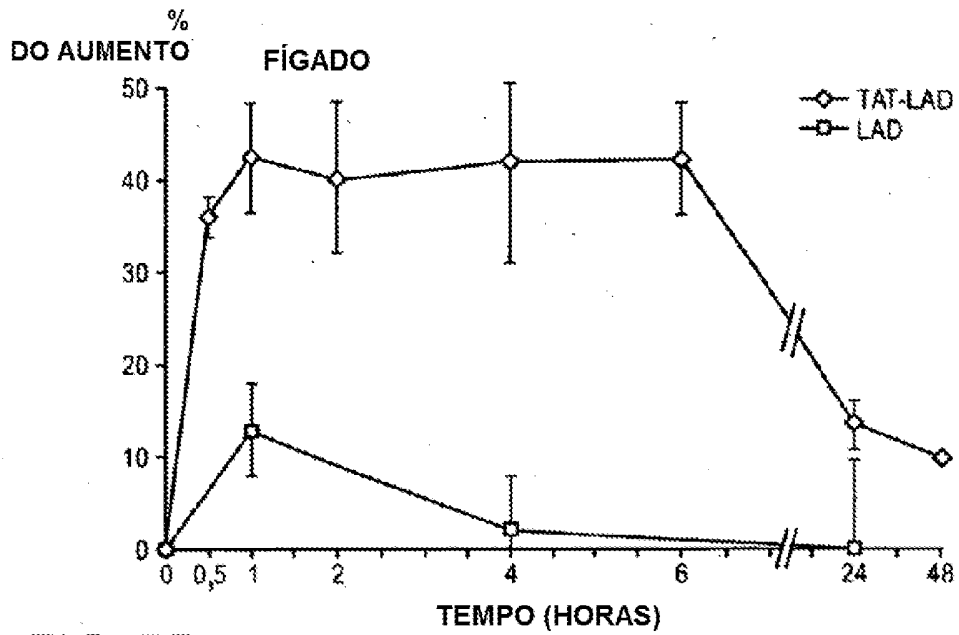


FIG. 7B

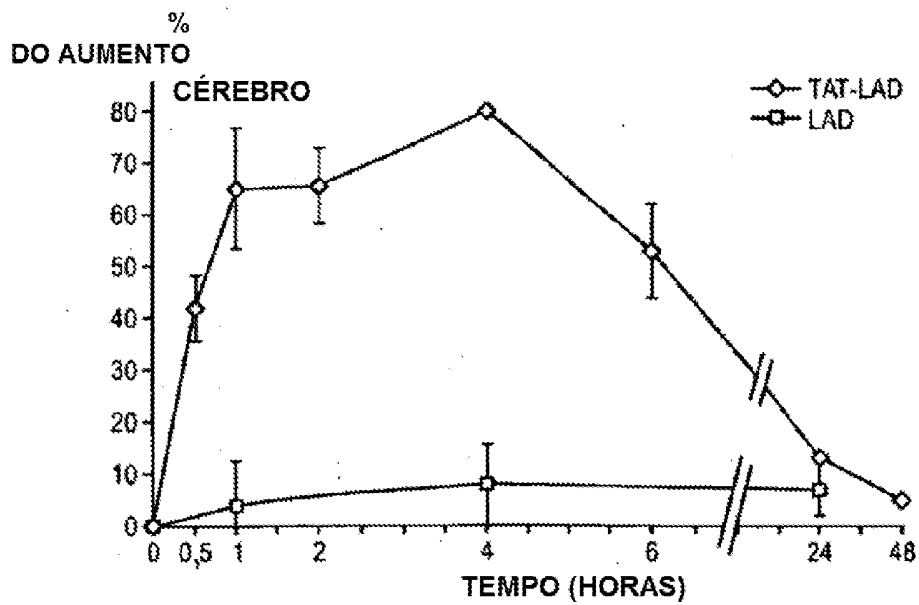


FIG. 7C

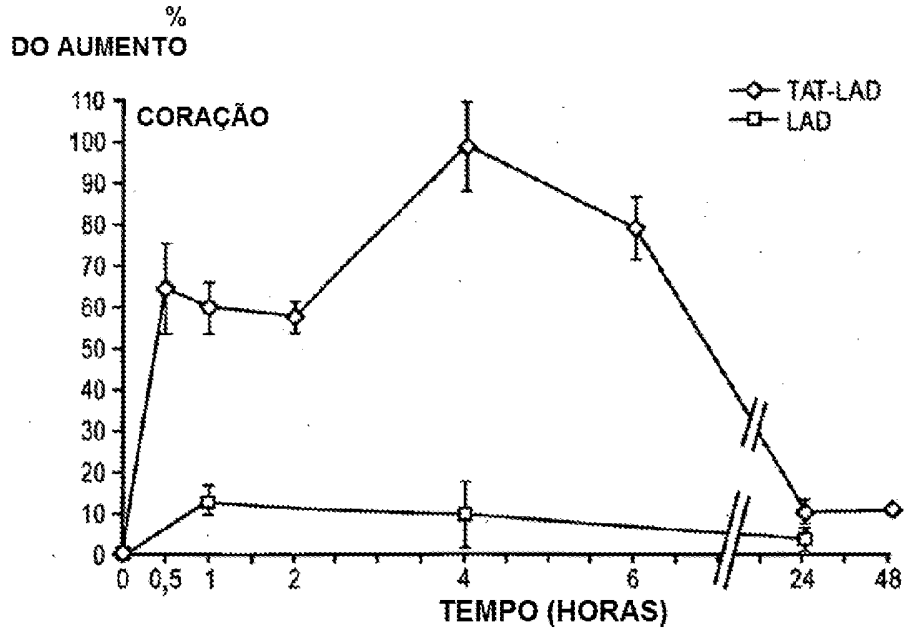


FIG. 7D

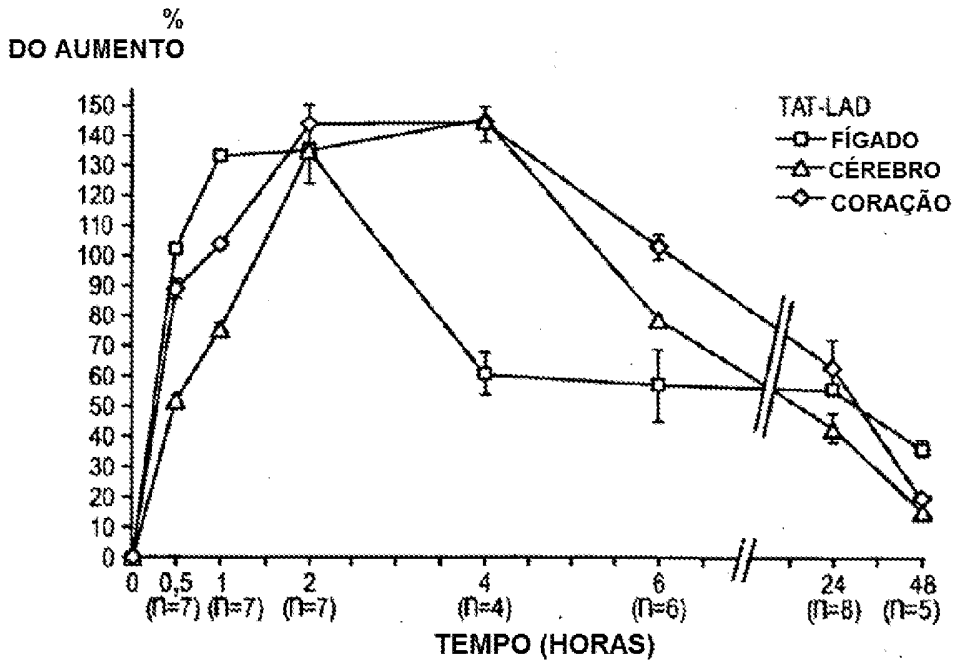


FIG. 8A

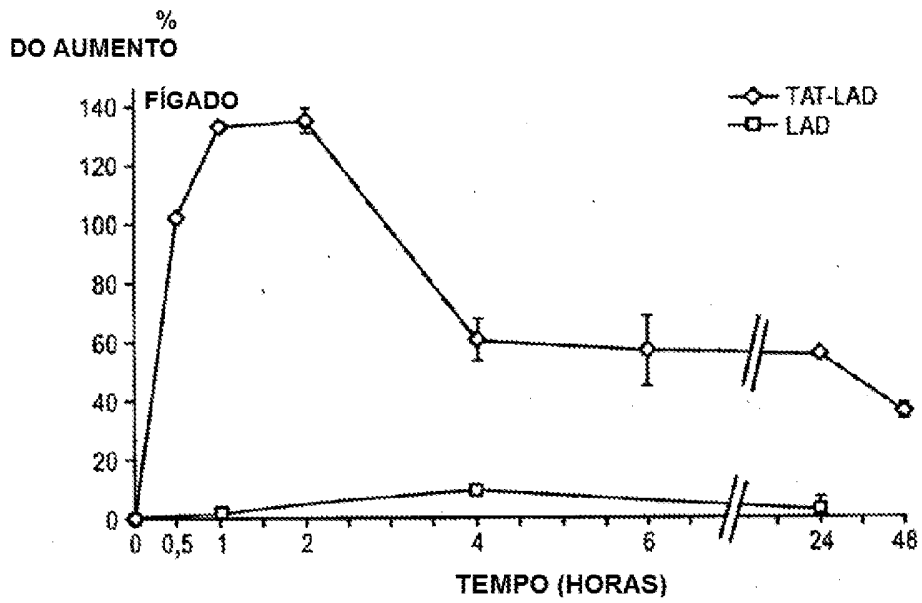


FIG. 8B

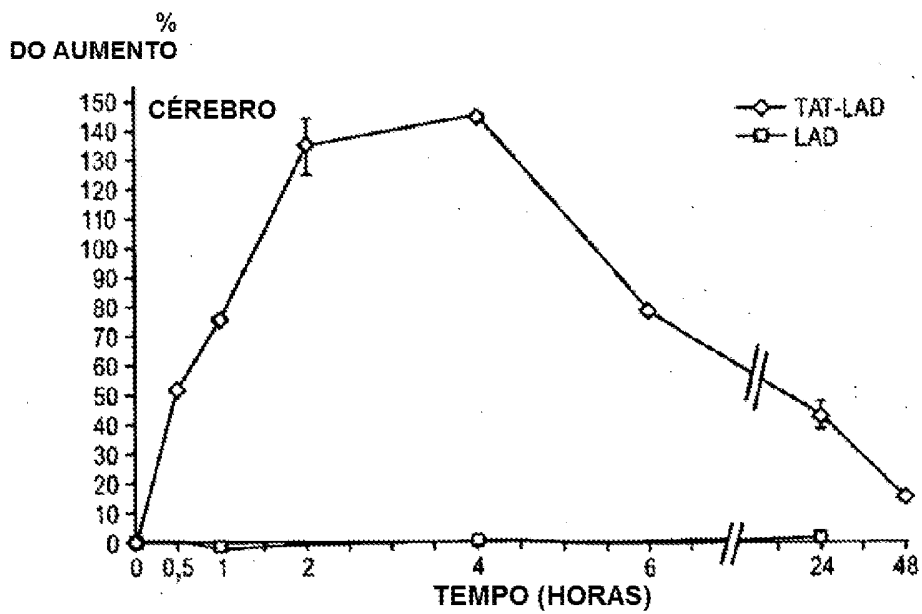


FIG. 8C

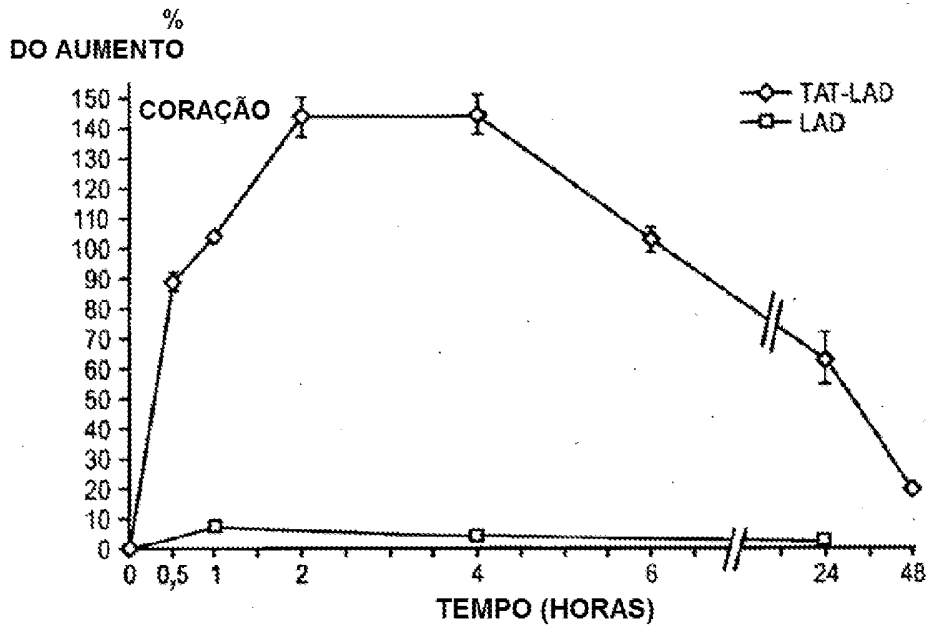


FIG. 8D

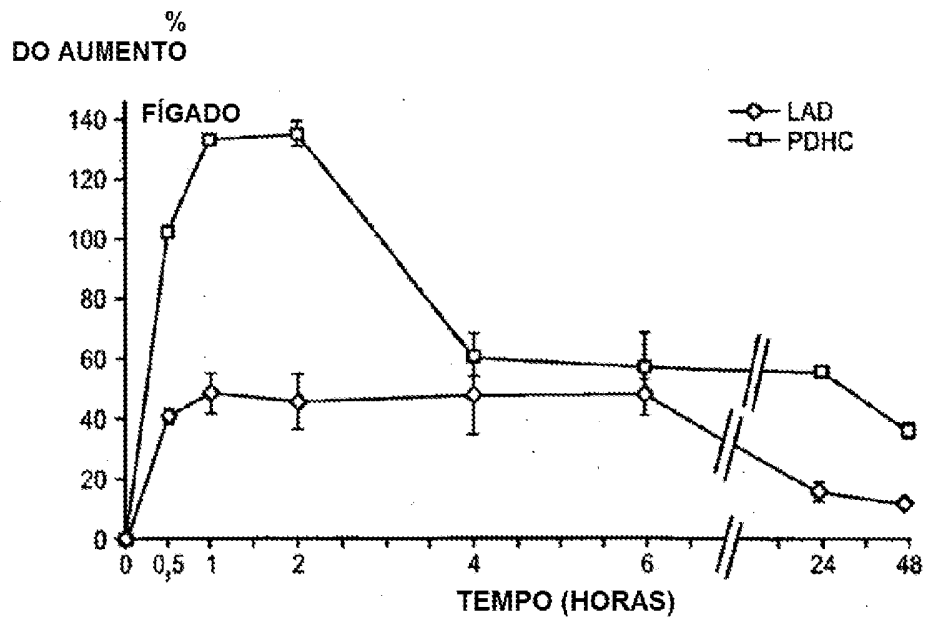


FIG. 9A

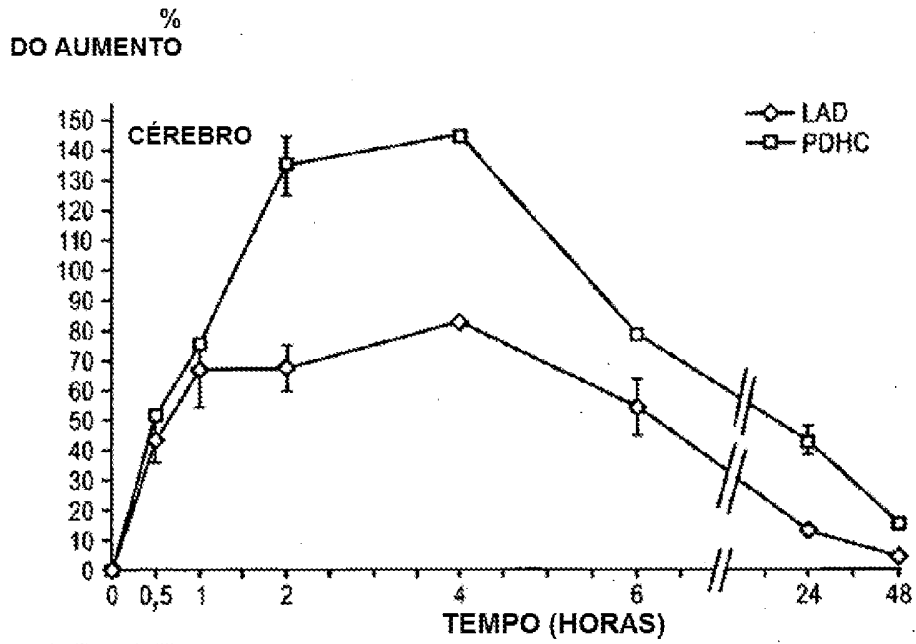


FIG. 9B

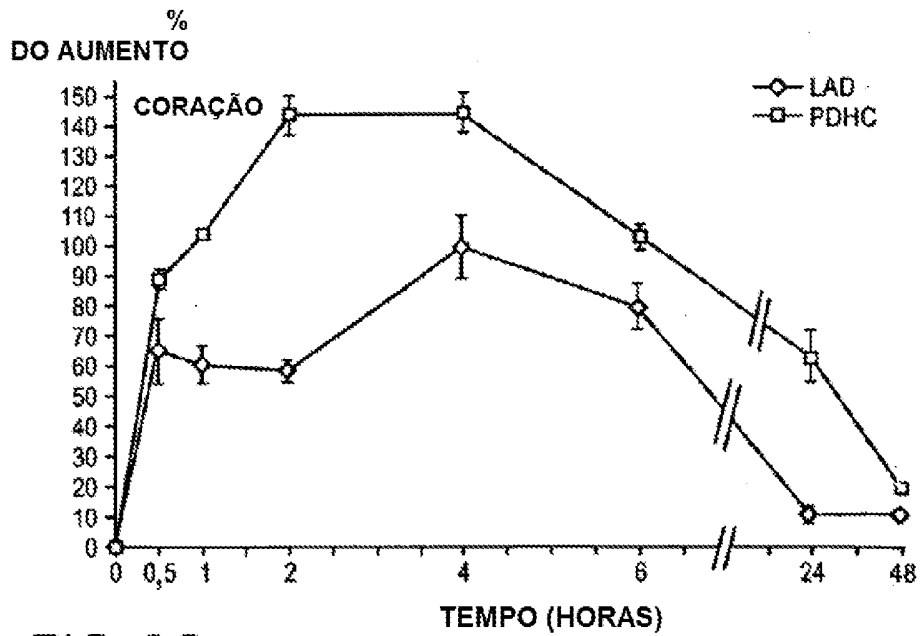


FIG. 9C

FIG. 10

