

(11) Número de Publicação: **PT 1200117 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 38/46** (2007.10) **A61K 48/00** (2007.10)  
**C12N 15/63** (2007.10) **A61P 9/10** (2007.10)  
**C12N 9/20** (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **2000.06.23**

(30) Prioridade(s): **1999.06.24 EP 99202048**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.05.02**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.08.13**  
**232/2008**

(73) Titular(es):

**THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA**  
**IRC BUILDING, ROOM 331, 2194 HEALTH**  
**SCIENCES MALL VANCOUVER, BRITISH**  
**COLUMBIA V6T 1Z3** **CA**  
**AMSTERDAM MOLECULAR THERAPEUTICS**  
**B.V.** **NL**

(72) Inventor(es):

**MICHAEL R. HAYDEN** **CA**  
**JOHN J. P. KASTELEIN** **CA**  
**KATHERINE JULIA DIANE ASHBOURNE EXCOFFON** **US**

(74) Mandatário:

**MARIA MANUEL RAMOS LUCAS**  
**LARGO DE S. DOMINGOS N.º 1 2910-092 SETÚBAL** **PT**

(54) Epígrafe: **TRATAMENTO À BASE DE VARIANTES DA LIPOPROTEÍNA LIPASE**

(57) Resumo:

## DESCRIÇÃO

### TRATAMENTO À BASE DE VARIANTES DA LIPOPROTEÍNA LIPASE

#### CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção pertence ao campo das proteínas e ácidos nucleicos terapêuticos baseados nas variantes da lipoproteína lipase (LPL), incluindo a terapêutica provida pelo tratamento genético.

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A lipoproteína lipase (EC 3.1.1.34) é uma enzima importante no metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Esta é sintetizada nas células parenquimais do tecido adiposo e do músculo-esquelético e cardíaco, onde é transferida a sítios de ligação no lado vascular das células endoteliais no endotélio vascular. O conhecimento actual é que a LPL tem um papel importante na regulação do metabolismo lipoproteico e lipídico, como segue. Pensamos que o homodímero glicosilado ligado de maneira não covalente é transportado ao endotélio vascular, onde se liga aos proteoglicanos de sulfato de heparano na superfície luminal. É entendido que o catabolismo subsequente dos triglicerídeos dos quilomícrons (CM) e das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) permite a absorção e a utilização dos ácidos gordos livres e glicerol para energia e armazenagem no músculo e no tecido adiposo respectivamente: quilomícron e restos de VLDL ou podem ser utilizados na formação de partículas da lipoproteína de alta densidade (HDL) ou da lipoproteína de baixa densidade (LDL) respectivamente, ou absorvidos pelo fígado e re-embalados em novas partículas de VLDL. A LPL tem um

requisito obrigatório para o seu activador apolipoproteína (apo) CII, uma pequena proteína de 79 aminoácidos que está presente nas partículas de CM e VLDL. Os Inibidores da LPL incluem ácidos gordos livres, apo CIII, e possivelmente apo E. As concentrações altas de sal (1M de NaCl) são também outro inibidor.

Ainda que a origem celular da LPL na circulação não está clara, e pode representar uma acumulação de diferentes fontes teciduais, consideramos que o seu sítio de acção primário está na superfície luminal do endotélio vascular. Devido à sua interacção não covalente com os proteoglicanos de sulfato de heparano, as LPL podem ser deslocadas no plasma por uma injeção em bólus intravenosa de heparina. Assim, a actividade da LPL e os níveis proteicos podem ser simplesmente analisados tomando uma pequena amostra de plasma pós-heparina (PHP). Partes alíquotas desta PHP podem ser seguidamente utilizadas tanto num ensaio de triglicerídeo radiomarcado (TG) sintético para a actividade lipolítica como ser medida por anticorpos específicos da LPL para os níveis proteicos. As medidas lipídicas podem ser executadas nas amostras de pré-heparina desde que a libertação da LPL possa provocar uma rápida lipólise do triglicerídeo na amostra.

Uma deficiência da LPL completa se dá aproximadamente 1 em  $10^6$  pessoas, e a frequência é muito mais alta na população canadense francesa onde se pode dar 1 em 5000 pessoas. As manifestações clínicas de uma deficiência da LPL completa nos seres humanos tem a sua raiz na infância com uma falha para desenvolver, dor abdominal tipo cólica, hepatosplenomegalia, quilomicronemia caracterizada por plasma lactescente, xantoma eruptivo, lipemia retinalis e pancreatite que pode colocar a vida do doente em perigo. Os

medicamentos que diminuem os lípidos são ineficazes e mesmo as restrições dietéticas rígidas são na maioria das vezes mal toleradas. Para as pessoas que sofrem desta doença o desenvolvimento de tratamentos para a deficiência da LPL representaria um avanço importante. Por exemplo, o Pedido de Patente WO 95 27512 A descreve o tratamento genético para o tratamento da doença cardiovascular utilizando a sobre-expressão da LPL tipo selvagem.

Recentemente, os doentes com mutações no gene da LPL que resultam em defeitos parciais na função catalítica da LPL foram identificados e, de facto, são muito comuns na população geral. No seu conjunto, calcula-se que agora as mutações conhecidas que resultam em defeitos catalíticos parciais em LPL se dão na população geral com uma frequência de entre 5 e 7%. A apresentação clínica, pode ser quiescente, evidente só para os níveis de triglicerídeos marginais elevados no estado não stressado, com hipertrigliceridemia profunda desencadeada por factores tais como gravidez normal, obesidade ou diabetes. Estudos metabólicos pós-prandiais foram executados em pessoas heterozigotas para mutações no gene da LPL, demonstrando uma não dissimulação do defeito lipolítico após um desafio de gordura, dando como resultado a lipemia pós-prandial prolongada e doenças significativas nos níveis lipoproteicos e na composição. Há também evidência de que as mutações específicas que alteram, mas não abolem, a actividade da LPL, tais como Asn291Ser, Asp9Asn, existem comumente na população geral (Reymer et al., Nat.Genet. 1995, 10:28-33; Gagné et al., Arterioscl. Thromb. 1994, 14(8):1250-1257). O seu significado não está ainda completamente entendido apesar de que estão implicadas na susceptibilidade à arteriosclerose. Uma mutação que introduz um codão de terminação na posição 447 no lugar de

um codão de serina (Ser447Ter ou S447X) tem sido associada com os níveis de TG diminuídos e de colesterol HDL aumentados (Hokanson, 1997, International Journal of Clinical and Laboratory Research 27, 24-34; Gagné et al., Arterioscl. Thromb. 1994, 14(8):1250-1257; Mattu et al., 1994, Arteriosclerosis and Thrombosis 14, 1090-1097; Kuivenhoven et al., 1997, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 17, 595-599; Groenemeijer et al., 1997, Circulation 95, 2628-2635; Fisher et al., 1997, Atherosclerosis 135, 145-159. U.S. Patent No. 5,658,729; Groenemeijer et al., Circulation 1997, 95:2628-2635; Gagne et al., Clin. Genet. 1999, 55(6):450-454). Correspondentemente, na maioria dos estudos esta mutação parece conferir protecção contra CAD. O(s) mecanismo(s) que estão por detrás destes efeitos não é(são) conhecido(s). Henderson et al., Journal of Lipid Research, vol. 40, 1999, pp 735-43, descreve que o mutante da LPL S447X apresenta actividade da LPL aumentada. Fisher et al., Atherosclerosis, vol. 135, 1997, pp 145-59, relata que a mutação de S447X na LPL está associada com um perfil lipídico benéfico com concentração de TG inferior e protecção contra CAD, e mostra estudos *in vitro* que sugerem que o aumento na actividade da LPL pós-heparina é devido a uma produção mais alta da LPL-S447X.

#### RESUMO DA INVENÇÃO

Um aspecto da invenção envolve o reconhecimento das importantes vantagens que podem ser obtidas através dos tratamentos terapêuticos que compreendem a administração de um tratamento terapêutico derivado da proteína LPL S447X e sequências dos ácidos nucleicos que codificam a proteína LPL S447X. Estas LPL S447X terapêuticas podem incluir peptídeos da LPL S447X, sequências de ácidos nucleicos que

as codificam, células que expressam estes peptídeos ou ácidos nucleicos, e derivados destes peptídeos, onde a LPL S447X terapêutica melhorará ou tratará a doença quando administrados em doses profiláctica ou terapêuticamente eficazes. A LPL S447X terapêutica da invenção inclui modificações, derivados e análogos dos peptídeos da LPL S447X, e dos ácidos nucleicos que codificam estes peptídeos. Nalgumas formas de realização, a LPL S447X terapêutica da invenção pode ser um peptídeo que tem uma sequência de aminoácidos correspondente aos aminoácidos 1-446 de um peptídeo da LPL tipo selvagem de origem natural, como o estabelecido na figura 1 (SEQ ID NO:1). Diversos peptídeos da LPL de origem natural são conhecidos (Murthy V., Julien P., & Gagné C. 1996. Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. Pharmacol.Ther. 70[2], 101-135). Os peptídeos da LPL de origem natural alternativos podem ser identificados mediante a selecção de genomas individuais, incluindo genomas não humanos, para sequências homólogas aos genes da LPL conhecidos.

Em aspectos alternativos, a invenção provê a utilização de uma LPL S447X terapêutica, tal como uma proteína LPL S447X ou ácido nucleico, para modular a actividade da LPL ou a massa da LPL, para reduzir os triglicerídeos no plasma e/ou aumentar o colesterol HDL, alterar os níveis de lípidos no plasma, ou para tratar uma condição responsiva à LPL num doente. A invenção provê ainda composições farmacêuticas para este tipo de usos. Exemplos de condições responsivas à LPL que podem ser susceptíveis ao tratamento nas formas de realização alternativas incluem: uma deficiência da LPL completa (incluindo a crónica (por exemplo para toda a vida, quilomicronemia, hipoalfalipoproteinemia) e aguda (por exemplo pancreatite, hiperlipidemia severa) seja genética ou adquirida); deficiência da LPL parcial

(incluída a crónica e aguda (por exemplo pancreatite, hiperlipidemia, na gravidez, diabetes, alcoolismo); hiperlipidemia que não é devida à deficiência da LPL (por exemplo FH, FCH, lipoproteinemia tipo II); hipertrigliceridemia (com uma variedade de causas); hipoalfalipoproteinemia (HDL baixo), níveis de colesterol HDL baixos; doença cardiovascular; cardiopatia coronária; arteriopatia coronária; arteriosclerose; angina de peito; hipertensão (pressão elevada do sangue); doença cerebrovascular; restenose coronária; doença vascular periférica; diabetes (hipertrigliceridemia e outros sintomas relacionados com a diabetes e nos estados insulino-resistentes); caquexia (por exemplo no cancro ou quando há um perfil da expressão da LPL alterada); e obesidade.

Num aspecto a invenção refere-se à utilização de uma LPL S447X terapêutica seleccionada do grupo composto por:

a) uma proteína LPL S447X em que a sequência de aminoácidos da proteína LPL S447X compreende um segmento contíguo que tem pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO:3 quando optimamente alinhada, e em que a proteína LPL S447X carece dos aminoácidos correspondentes aos aminoácidos 447 e 448 da SEQ ID NO:3 quando está optimamente alinhada; e,

b) um ácido nucleico da LPL S447X que codifica a proteína LPL S447X.

Nalgumas formas de realização, a proteína LPL S447X pode ter uma actividade da LPL ou outra propriedade terapêutica igual ou maior do que uma LPL tipo selvagem, como a LPL da SEQ ID NO:3.

Num aspecto preferido a invenção refere-se à utilização de uma LPL S447X terapêutica, em que a LPL S447X terapêutica é o ácido nucleico da LPL S447X, e o ácido nucleico da LPL S447X compreende uma sequência codificante de ADN que codifica um ARN que pelo menos tem 90% de identidade da sequência com os nucleotídeos 256 a 1599 da SEQ ID NO:4.

Noutro aspecto preferido a invenção refere-se à utilização de uma LPL S447X terapêutica em que a LPL S447X terapêutica é o ácido nucleico da LPL S447X, e o ácido nucleico da LPL S447X compreende uma sequência codificante de ADN que sobre condições severas hibridiza os nucleotídeos 256 a 1599 da SEQ ID NO:4.

Num aspecto, a invenção refere-se à utilização num tratamento genético de um ácido nucleico da LPL S447X que codifica a proteína LPL S447X. O ácido nucleico da LPL S447X pode ser administrado por um vector do tratamento genético terapeuticamente aceitável para tratar condições responsivas à LPL, tais como as condições acima estabelecidas. O vector do tratamento genético pode por exemplo ser um vector adenoassociado (AAV). Este vector pode compreender por exemplo: uma repetição terminal invertida (ITR) em 5'; um promotor, tal como um promotor intensificador de CMV com um intensificador específico muscular; um intrão; uma região não traduzida 3' (3'-UTR); um sinal de poliadenilação, tal como um sinal de poliadenilação de SV40; e uma 3'-ITR.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 é uma lista das sequências de aminoácidos da LPL S447X, que mostra os aminoácidos designados de 1 a 446 na presente (SEQ ID NO:1). A figura reproduz a informação

disponível do número de acesso do GenBank NP\_000228 para um precursor da lipoproteína lipase de *Homo sapiens*, versão NP\_000228.1, GI:4557727, (Wion, et al., Science 235 (4796), 1638-1641 (1987); Sparkes et al., Genomics 1 (2), 138-144 (1987); Mattei et al., Cytogenet. Cell Genet. 63 (1), 45-46 (1993); Zechner, Curr. Opin. Lipidol. 8 (2), 77-88 (1997); Fisher et al., Atherosclerosis 135 (2), 145-159 (1997); e Beisiegel, Eur. Heart J. 19, A20-A23 (1998); Groenemeijer et al., Circulation 1997, 95:2628-2635; Gagne et al., Clin. Genet. 1999, 55(6):450-454).

A figura 2 é uma lista da sequência de aminoácidos de um peptídeo da LPL tipo selvagem madura, que mostra os aminoácidos designados de 1 a 448 na presente (SEQ ID NO:3). A figura reproduz a informação disponível do número de acesso de GenBank NP\_000228.

A figura 3 é uma listra da sequência de aminoácidos de um peptídeo pré-LPL, que mostra uma proteína que tem um peptídeo sinal nos aminoácidos de 1 a 27, antes da sequência do peptídeo da LPL madura (SEQ ID NO:2). A figura reproduz a informação disponível do número de acesso de GenBank NP\_000228.

A figura 4 é um listado da sequência de um ARNm da LPL, em que um peptídeo sinal é codificado pelos nucleotídeos 175 a 255, e o peptídeo maduro é codificado pelos nucleotídeos 256 a 1599 (SEQ ID NO:4). A figura reproduz a informação disponível do número de acesso de GenBank NM\_000237 para um ARNm lipoproteína lipase (LPL) de *Homo sapiens*, versão NM\_000237.1. GI:4557726, (Wion et al., Science 235 (4796), 1638-1641 (1987); Sparkes et al., Genomics 1 (2), 138-144 (1987); Mattei et al., Cytogenet. Cell Genet. 63 (1), 45-46 (1993); Zechner, Curr. Opin. Lipidol. 8 (2), 77-88 (1997);

Fisher et al., *Atherosclerosis* 135 (2), 145-159 (1997); e Beisiegel, *Eur. Heart J.* 19. A20- A23 (1998)).

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Nalgumas formas de realização, a LPL S447X terapêutica da invenção pode incluir substancialmente compostos purificados tais como fragmentos peptídicos, fragmentos peptídicos modificados, análogos ou sais aceites na Indústria Farmacêutica da LPL que têm os aminoácidos 447-448 truncados do terminal carboxi de uma LPL tipo selvagem, no seu conjunto estes compostos na presente invenção são denominados como peptídeos da LPL S447X. Os peptídeos da LPL S447X podem incluir homólogos da sequência da LPL madura tipo selvagem dos aminoácidos de 1 a 446, incluindo homólogos das espécies diferentes das *Homo sapiens* (que podem ter aplicações veterinárias). Os peptídeos da LPL S447X podem incluir isoformas de origem natural ou variantes genéticas da LPL tipo selvagem. Os polipeptídeos da LPL podem incluir também polipeptídeos que têm uma similitude de sequências substancial aos aminoácidos de 1 a 446 da LPL tipo selvagem, tal como 90%, 95% ou 99% de identidade de sequência a uma parte correspondente da sequência 1-446 da LPL tipo selvagem, sendo a parte correspondente da LPL tipo selvagem qualquer sequência contígua de qualquer comprimento, tal como 10, 20, 30, 40, 50 ou mais aminoácidos. Nalgumas formas de realização, estas proteínas podem ter actividade da LPL, ou outra propriedade tipo LPL, igual ou maior do que a LPL tipo selvagem. Nalgumas formas de realização, os aminoácidos quimicamente semelhantes podem ser substituídos por aminoácidos na sequência da LPL tipo selvagem (para prover substituições de aminoácidos conservadoras). As substituições de aminoácidos que reduzem a actividade da

LPL, das quais mais de 50 foram descritas, tais como a substituição de um resíduo Ser por Asn na posição 291 (Asn291 Ser), a substituição de Asn por Asp na posição 9 (Asp9Asn), a substituição de Glu por Gly na posição 188 (Gly188Glu, ver Monsalve et al., J. Clin. Invest. 1990, 86(3):728-734) ou Asp250Asn (Ma et al., Genomics. 1992, 13:649-653) podem ser evitadas nas formas preferidas de realizar a invenção.

Duas sequências de ácidos nucleicos ou proteicos são consideradas substancialmente idênticas se, quando estão optimamente alinhadas, compartilham pelo menos aproximadamente 70% da identidade da sequência. Nas formas alternativas de realizar a invenção, a identidade da sequência pode por exemplo ser pelo menos 75%, pelo menos 90% ou pelo menos 95%. O alinhamento óptimo das sequências para comparações de identidade pode ser realizada utilizando uma variedade de algoritmos, tais como o algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, 1981, Adv. Appl. Math 2: 482, o algoritmo de alinhamento por homologia Needleman & Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, a investigação para os métodos de similitude de Pearson & Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, e as implementações computacionais destes algoritmos (como GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics software Package, Genetics Computer Group, Madison, WI, U.S.A.). O alinhamento das sequências pode também ser efectuado com a utilização do algoritmo BLAST, descrito por Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10 (com a utilização dos ajustes por defeito publicados). O software para executar a análise BLAST pode estar disponível através do National Center for Biotechnology Information (através de Internet em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O algoritmo BLAST envolve primeiro identificar os pares das sequências de alta

pontuação (HSPs) identificando palavras curtas de comprimento  $W$  na sequência buscada que corresponde ou que satisfaz uma pontuação  $T$  de limiar de valor positivo quando alinhado com uma palavra do mesmo comprimento numa sequência da base de dados.  $T$  é referido como o limiar de pontuação da palavra vizinha. As palavras comuns iniciais vizinhas actuam como sementes para iniciar as buscas para encontrar HSPs mais compridas. As palavras comuns são estendidas em ambas direcções ao longo de cada sequência até que a pontuação de alinhamento acumulativa possa ser aumentada. A extensão das palavras comuns em cada direcção é detida quando os seguintes parâmetros são encontrados: as caídas de pontuação de alinhamento acumulativa pela quantidade  $X$  do seu valor máximo obtido; a pontuação acumulativa tende para zero ou menos, devido à acumulação de um ou mais alinhamentos de resíduos de pontuação negativa; ou até que o final de cada sequência seja alcançada. Os parâmetros  $W$ ,  $T$  e  $X$  do algoritmo BLAST determinam a sensibilidade e a velocidade do alinhamento. Os programas BLAST podem utilizar por defeito um comprimento de palavra ( $W$ ) de 11, a matriz de pontuação BLOSUM62 (Henikoff & Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919), os alinhamentos ( $B$ ) de 50, do esperado ( $E$ ) de 10 (que pode ser mudada nas formas alternativas de realizar a invenção para 1 ou 0,1 ou 0,01 ou 0,001 ou 0,0001; apesar de que os valores de  $E$  muito superiores a 0,1 não podem identificar sequências funcionalmente semelhantes, é útil examinar as palavras comuns com menos significado, os valores de  $E$  entre 0,1 e 10, para regiões curtas de similitude),  $M=5$ ,  $N=4$ , para ácidos nucleicos uma comparação de ambas as cadeias. Para comparações de proteínas, BLASTP pode ser usado com valores por defeito como segue:  $G=11$  (custo para abrir um espaço);  $E=1$  (custo para estender um espaço);  $E=10$  (valor esperado,

neste ajuste, é esperado 10 palavras comuns com pontuações iguais ou melhores do que a pontuação de alinhamento definido, é esperado que S, se dê ocasionalmente numa base de dados com o mesmo tamanho da que se está a procurar; o valor de E pode ser aumentado ou diminuído para alterar o rigor da busca.); e W=3 (tamanho de palavra, valor por defeito é 11 para BLASTN, 3 para outros programas blast).

A matriz BLOSUM atribui uma pontuação de probabilidade a cada posição num alinhamento que está baseado na frequência em que é sabido que essa substituição se dá entre os blocos de consenso nas proteínas relacionadas. A matriz de substituição BLOSUM62 (custo de existência de espaço = 11; por custo de espaço de resíduo = 1; rácio de lambda = 0,85) é utilizada por defeito em BLAST 2,0. Uma variedade de outras matrizes pode ser utilizada como alternativa a BLOSUM62, incluindo: PAM30 (9,1,0.87); PAM70 (10,1,0.87) BLOSUM80 (10,1,0.87); BLOSUM62 (11,1,0.82) e BLOSUM45 (14,2,0.87). Uma medida da similitude estatística entre as duas sequências que utilizam o algoritmo BLAST é a probabilidade mais pequena da soma ( $P(N)$ ), a qual provê uma indicação da probabilidade pela qual uma correspondência entre duas sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos se pode dar ocasionalmente. Nas formas alternativas de realizar a invenção, as sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos estão consideradas substancialmente idênticas se a probabilidade mais pequena da soma numa comparação das sequências de teste for inferior a aproximadamente 1, preferencialmente inferior a aproximadamente 0,1, mais preferencialmente inferior a aproximadamente 0.01, e da forma mais preferível inferior a aproximadamente 0.001.

É bem conhecido na técnica que algumas modificações e mudanças podem ser feitas na estrutura de um polipeptídeo

sem alterar substancialmente a função biológica deste peptídeo, para obter um polipeptídeo biologicamente equivalente. Num aspecto da invenção, a LPL S447X terapêutica pode incluir peptídeos que divergem de uma parte da sequência da LPL de tipo selvagem por substituições de aminoácidos conservadores. Como é utilizada na presente invenção, a expressão "substituições de aminoácidos conservados" refere-se à substituição de um aminoácido por outro num sítio dado no peptídeo, onde a substituição pode ser feita sem perda de função. Ao fazer estas mudanças, as substituições de resíduos aminoácidos como podem fazer-se, por exemplo, com base na similitude relativa das substituições da cadeia lateral, por exemplo, o seu tamanho, a carga, hidrofobicidade, hidrofiliicidade, e outras, e estas substituições podem ser analisadas quanto ao seu efeito na função do peptídeo por um teste de rotina.

Nalgumas formas de realização, as substituições de aminoácidos conservados podem ser feitas onde um resíduo de aminoácido é substituído por outro que tem um valor de hidrofiliicidade similar (por exemplo, dentro de um valor de mais ou menos 2.0), onde os valores de hidrofiliicidade seguintes são designados para os resíduos aminoácidos (como o detalhado no Pedido de Patente norte-americana No. 4,554,101): Arg (+3.0); Lys (+3.0); Asp (+3.0); Glu (+3.0); Ser (+0.3); Asn (+0.2); Gln (+0.2); Gly (0); Pro (-0.5); Thr (-0.4); Ala (-0.5); His (-0.5); Cys (-1.0); Met (-1.3); Val (-1.5); Leu (-1.8); Ile (-1.8); Tyr (-2.3); Phe (-2.5); e Trp (-3.4).

Nas formas alternativas de realizar a invenção, as substituições de aminoácidos conservados podem ser feitas onde um resíduo de aminoácido é substituído por outro que tem um índice hidropático similar (por exemplo, num valor

de mais ou menos 2.0). Nestas formas de realizar a invenção, a cada resíduo de aminoácido pode ser atribuído um índice hidropático baseado nas suas características de hidrofobicidade e de carga, como segue: Ile (+4.5); Val (+4.2); Leu (+3.8); Phe (+2.8); Cys (+2.5); Met (+1.9); Ala (+1.8); Gly (-0.4); Thr (-0.7); Ser (-0.8); Trp (-0.9); Tyr (-1.3); Pro (-1.6); His (-3.2); Glu (-3.5); Gln (-3.5); Asp (-3.5); Asn (-3.5); Lys (-3.9); e Arg (-4.5).

Nas formas alternativas de realizar a invenção, as substituições de aminoácidos conservados podem ser feitas onde um resíduo de aminoácido é substituído por outro na mesma classe, onde os aminoácidos estão divididos em classes básicas e neutras, não polares, acídicas, como segue: não polares: Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, Met; acídicas: Asp, Glu; básicas: Lys, Arg, His; neutras: Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr.

A invenção provê composições farmacêuticas que contêm a LPL S447X terapêutica. Nalgumas formas de realização, estas composições podem incluir uma LPL S447X terapêutica numa quantidade eficaz, suficiente para prover um efeito terapêutico ou profiláctico desejado, e um portador ou excipiente aceite na Indústria Farmacêutica. Uma "quantidade eficaz" inclui uma quantidade terapeuticamente eficaz ou uma quantidade profilacticamente eficaz.

Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, a doses e a períodos de tempo necessários, para obter o resultado terapêutico desejado, tais como a alteração de parâmetros no metabolismo lipídico, como a elevação da actividade da LPL, a elevação de colesterol HDL ou a redução de níveis de triglicerídeos. Uma quantidade terapeuticamente eficaz da LPL S447X

terapêutica pode variar de acordo com factores tais como o estado da doença, a idade, o sexo, e o peso do indivíduo, e a capacidade da LPL S447X terapêutica para provocar uma resposta desejada no indivíduo. Os regimes de doses podem ser ajustados para prover a resposta terapêutica óptima. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também habitualmente aquela onde qualquer efeito tóxico ou prejudicial da LPL S447X terapêutica é decidido pelos efeitos terapeuticamente benéficos.

Uma "quantidade profilacticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, a doses e a períodos de tempo necessários, para obter o resultado profiláctico desejado, como a prevenção ou a inibição de várias condições, incluindo condições responsivas à LPL, como a cardiopatia coronária, a doença cardiovascular, a arteriopatia coronária, os triglicerídeos altos e/ou os HDL baixos. Uma dose profiláctica pode ser usada nos sujeitos antes ou numa fase anterior da doença, e uma quantidade profilacticamente eficaz pode nalguns casos ser mais ou menos uma quantidade terapeuticamente eficaz.

Nas formas particulares de realizar a invenção, uma gama para quantidades terapêutica ou profilacticamente eficazes da LPL S447X terapêutica podem ser 0.01 nM-0.1M, 0.1 nM-0.1M, 0.1 nM-0.05M, 0.05 nM-15 $\mu$ M ou 0.01 nM-10 $\mu$ M. Deve ser notado que os valores das doses podem variar com a gravidade da doença a ser tratada. Para um sujeito particular quaisquer, os regimes de doses específicos podem ser ajustados no tempo de acordo com a necessidade individual e o juízo profissional da administração pessoal ou a supervisão da administração das composições. As variações das doses expostas na presente invenção são

apenas exemplares e não limitam as gamas de doses que podem ser seleccionadas pelos profissionais médicos.

Para os vectores do tratamento genético, a dose a ser administrada pode depender em grande medida da condição e tamanho do sujeito a ser tratado assim como da formulação terapêutica, da frequência de tratamento e da forma de administração. Os regimes para o tratamento de continuação, incluindo doses, formulação, e frequência podem ser guiados pela resposta inicial e juízo clínico. A via parenteral da injeção no espaço intersticial tecidular pode ser preferida, ainda que outras vias parenterais, como a inalação de uma formulação de aerossol, pode ser requerida numa administração específica. Nalguns protocolos, uma formulação que compreende o gene e o sistema de administração de genes num portador aquoso é injectado no tecido nas quantidades apropriadas. O tecido alvo pode ser específico, por exemplo o músculo ou tecido do fígado, ou pode ser uma combinação de diferentes tecidos, por exemplo o músculo e tecidos do fígado. Tecidos alvo exemplares podem ser músculo hepático, esquelético, músculo cardíaco, depósitos adiposos, rim, pulmão, endotélio vascular, células epiteliais e/ou hematopoiéticas.

A quantidade do composto activo nas composições da invenção podem variar de acordo com os factores como o estado da doença, a idade, o sexo, e o peso do indivíduo. Os regimes de doses podem ser ajustados para prover a resposta terapêutica óptima. Por exemplo, um único bólus pode ser administrado, diferentes doses divididas podem ser administradas no tempo ou as doses podem ser proporcionalmente reduzidas ou aumentadas como o indicado pelas exigências da situação terapêutica. Pode ser vantajoso formular composições parenterais na forma de

doses unitárias para facilitar a administração e uniformidade da dose. "Forma de dose unitária" como utilizada na presente invenção refere-se a unidades fisicamente específicas adequadas como doses unitárias para sujeitos a ser tratados; contendo cada unidade uma quantidade predeterminada de composto activo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o portador farmacêutico requerido. A especificação para as formas unitárias de doses da invenção pode ser ditada pelas características únicas do composto activo e pelo efeito terapêutico particular a ser obtido, e pelas limitações inerentes na técnica de compor este composto activo para o tratamento de uma condição nos indivíduos.

Como utilizado na presente invenção "portador aceite na Indústria Farmacêutica" ou "excipiente" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos e retardantes da absorção, e outros que sejam fisiologicamente compatíveis. Numa forma de realização, o portador é adequado para a administração parenteral. De forma alternativa, o portador pode ser adequado para a administração intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, sublingual ou oral. Os portadores aceites na Indústria Farmacêutica incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pó estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injectáveis estéreis. A utilização destes meios e agentes para substâncias farmacologicamente activas é bem conhecido na técnica. A não ser que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o composto activo, a sua utilização nas composições farmacêuticas da invenção está contemplado.

Compostos suplementares activos podem também ser incorporados nas composições farmacêuticas da invenção. Por exemplo, ApoC11 (em forma de ácido nucleico ou de proteína) pode nalgumas formas de realização agir como um co-activador de uma LPL S447X terapêutica. Compostos alternativos activos podem incluir compostos que aumentem as propriedades ou a acção de uma LPL S447X terapêutica. Nalgumas formas de realização a LPL S447X terapêutica pode ser co-administrada com um agente terapêutico, como a insulina, para tratar uma condição alternativa, como a diabetes. Nalgumas formas de realização, os moduladores do sistema imunitário, como a ciclosporina, podem ser co-administrados com a LPL S447X terapêutica, por exemplo para melhorar uma resposta imunitária à LPL S447X terapêutica. Para a análise do risco de uma resposta imunitária contra uma LPL S447X terapêutica, uma análise do gene da LPL de um doente pode ser executada para caracterizar a LPL natural do doente. Uma guia para a co-administração de uma terapêutica adicional pode ser por exemplo encontrada no Compendium of Pharmaceutical and Specialities (CPS) da Canadian Pharmacists Association.

Habitualmente, as composições farmacêuticas são estéreis e estáveis sob as condições de produção e armazenagem. As composições farmacêuticas podem ser formuladas como uma solução, microemulsão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada para receber uma concentração de medicamento alta. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão que contém, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, polipropilenoglicol, e polietilenoglicol líquido, e outros, e misturas destes adequadas. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento como a lecitina, pela manutenção do tamanho da partícula requerido no caso de

dispersão e pelo uso de agentes tensoactivos. Em muitos casos, será preferível incluir na composição agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois como o manitol, o sorbitol, ou o cloreto de sódio. Uma absorção prolongada das composições injectáveis pode ser provocada incluindo na composição um agente retardante da absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina. A LPL S447X terapêutica pode ser administrada numa formulação de libertação temporal ou controlada, por exemplo numa composição que inclui um polímero de libertação lenta ou outros veículos que protegem o composto contra a libertação rápida, incluindo implantes e sistemas de entrega microencapsulados. Os polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem por exemplo ser utilizados, como o acetato de vinil e o etileno, os polianidridos, o ácido poliglicólico, o colagénio, os poliortoésteres, o ácido poliláctico e os copolímeros polilácticos e poliglicólicos (PLG). Muitos métodos para a preparação destas formulações estão patenteadas ou são geralmente conhecidas pelos técnicos especializados.

As soluções estéreis injectáveis podem ser preparadas incorporando o composto activo na quantidade requerida num solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumeradas na presente invenção, como o requerido, seguida da esterilização filtrada. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando o composto activo num veículo estéril que contém um meio de dispersão básica e os outros ingredientes requeridos dos acima enumerados. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções estéreis injectáveis, os métodos preferidos de preparação são a secagem por vácuo e a liofilização que produz um pó da substância activa mais qualquer outro ingrediente adicional desejado da sua solução previamente filtrada

estéril. De acordo com um aspecto alternativo da presente invenção, uma LPL S447X terapêutica pode ser formulada com um ou mais compostos adicionais que aumentem a solubilidade da LPL S447X terapêutica.

Os compostos da LPL S447X terapêutica da invenção podem incluir derivados, tais como derivados de hidroximetil C-terminais, derivados O-modificados (por exemplo, hidroximetil benzil éter C-terminal), e derivados modificados N-terminalmente que incluem amidas substituídas tais como alquilamidas e hidrazidas.

Dentro de um peptídeo da LPL S447X da invenção, uma estrutura peptídica pode ser acoplada directa ou indirectamente a um grupo modificador. A expressão "grupo modificador" destina-se a incluir estruturas que são directamente fixadas à estrutura peptídica (por exemplo, por acoplamento covalente), assim como aquelas que são indirectamente fixadas à estrutura peptídica (por exemplo, por uma associação estável não covalente ou por acoplamento covalente a resíduos aminoácidos adicionais, ou miméticos, análogos ou derivados dos mesmos, que podem flanquear a estrutura peptídica do núcleo MCP-3). Por exemplo, o grupo modificador pode ser acoplado ao terminal amino ou ao terminal carboxi de uma estrutura peptídica da LPL S447X, ou a uma região peptídica ou peptidomimética flanqueante do domínio do núcleo. Alternativamente, o grupo modificador pode ser acoplado a uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido do peptídeo da LPL S447X ou a uma região peptídica ou peptidomimética flanqueante do domínio do núcleo (por exemplo, através do grupo épsilon amino de um resíduo(s) de lisil, através do grupo carboxil de um(uns) resíduo(s) de ácido aspártico ou de um(uns) resíduo(s) de ácido glutâmico, através de um grupo hidróxi de um(uns)

resíduo(s) de tirosil, um(uns) resíduo(s) de serina ou um(uns) resíduo(s) de treonina ou outro grupo adequado reactivo numa cadeia lateral do aminoácido). Os grupos modificadores acoplados de maneira covalente à estrutura peptídica podem ser unidos por meio e utilizando métodos bem conhecidos na técnica para ligar as estruturas químicas, incluindo, por exemplo, ligações de amido, de alquilamino, de carbamato ou de ureia.

Nalgumas formas de realização, o grupo modificador pode compreender um grupo cíclico, heterocíclico ou policíclico. A expressão "grupo cíclico", como é utilizada na presente invenção inclui um grupo cíclico saturado ou insaturado (isto é, aromático) que tem de 3 a 10, 4 a 8, ou 5 a 7 átomos de carbono. Grupos exemplares cíclicos incluem ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, ciclohexil, e ciclooctil. Grupos cíclicos podem ser não substituídos ou substituídos numa ou mais posições do anel. Um grupo cíclico pode por exemplo ser substituído com halogéneos, alquilos, cicloalquilos, alquênilos, alquínilos, arilos, heterociclos, hidroxilos, aminos, nitros, tióis, aminas, iminas, amidas, fosfonatos, fosfinas, carbonilos, carboxilos, sililos, éteres, tioéteres, sulfonilos, sulfonatos, selenoéteres, cetonas, aldeídos, ésteres,  $-CF_3$ ,  $-CN$ .

A expressão "grupo heterocíclico" inclui grupos cíclicos, saturados, insaturados e aromáticos que têm de 3 a 10, 4 a 8, ou 5 a 7 átomos de carbono, onde a estrutura anular inclui aproximadamente um ou mais hetero-átomos. Os grupos heterocíclicos incluem pirrolidina, oxolano, tiolano, imidazol, oxazol, piperidina, piperazina, morfolina. O anel heterocíclico pode ser substituído numa ou mais posições com substituintes tais como, por exemplo, halogéneos,

alquilos, cicloalquilos, alquênios, alquínios, arilos, outros heterociclos, hidroxilos, aminos, nitro, tiol, aminas, iminas, amidos, fosfonatos, fosfinas, carbonilos, carboxilos, sililos, éteres, tioéteres, sulfonilos, selenoéteres, cetonas, aldeídos, ésteres,  $-CF_3$ ,  $-CN$ . Os heterociclos podem ainda ser unidos por uma ponte ou fundidos com outros grupos cíclicos como o abaixo descrito.

A expressão "grupo policíclico" como é utilizada na presente invenção destina-se a referir a dois ou mais anéis cíclicos saturados, insaturados ou aromáticos onde dois ou mais carbonos são comuns para dois anéis adjacentes, de forma que os anéis são "anéis fundidos". Os anéis que são unidos através dos átomos não contíguos são denominados anéis "unidos por ponte". Cada um dos anéis do grupo policíclico pode ser substituído com substituintes como os acima descritos, como por exemplo, halogéneos, alquilos, cicloalquilos, alquênios, alquínios, hidroxilos, amino, nitro, tiol, aminas, iminas, amidas, fosfonatos, fosfinas, carbonilos, carboxilos, sililos, éteres, tioéteres, sulfonilos, selenoéteres, cetonas, aldeídos, ésteres,  $-CF_3$ , ou CN.

A expressão "alquilo" refere-se ao radical dos grupos saturados alifáticos, incluindo grupos alquilo de cadeia linear, grupos alquilo de cadeia ramificada, grupos cicloalquilo (alíciclicos), grupos cicloalquilo alquilo substituídos, e grupos alquilo cicloalquilo substituídos. Nalgumas formas de realização, um alquilo de cadeia linear ou de cadeia ramificada tem 20 átomos de carbono ou menos no seu esqueleto ( $C_1-C_{20}$  para cadeia linear,  $C_3-C_{20}$  para cadeia ramificada), ou 10 átomos de carbono ou menos. Nalgumas formas de realização, os cicloalquilos podem ter de 4-10 átomos de carbono na sua estrutura anular, tais

como 5, 6 ou 7 anéis de carbono. A não ser que o número de carbonos seja especificado de outra forma, "alquilo inferior" como é utilizado na presente invenção significa um grupo alquilo, como o acima definido, que tem de um a dez átomos de carbono na sua estrutura de esqueleto. Igualmente, "alquenilo inferior" e "alquinilo inferior" têm comprimentos de cadeia de dez ou menos carbonos.

O termo "alquilo" (ou a expressão "alquilo inferior") como é utilizado em toda a especificação e reivindicações destina-se a incluir os "alquilos não substituídos" assim como os "alquilos substituídos", estes últimos referem-se a fracções de alquilo que têm substituintes que recolocam um hidrogénio num ou mais carbonos do esqueleto de hidrocarbonetos. Estes substituintes podem incluir, por exemplo, halogéneo, hidroxilo, carbonilo (tais como carboxil, e cetonas (incluindo grupos alquilcarbonilo e arilcarbonilo), ésteres (incluindo grupos alquiloxicarbonilo e ariloxicarbonilo), tiocarbonilo, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, acilamino, amido amidina, imino, ciano, nitro, azido, sulfidrilo, alquiltio, sulfato, sulfonato, sulfamoil, sulfonamida, heterociclílico, aralquil, ou uma fracção aromática ou heteroaromática. As fracções substituídas na cadeia de hidrocarboneto podem elas mesmas serem substituídas, se for apropriado. Por exemplo, os substituintes de um alquilo substituído podem incluir formas substituídas e não substituídas de aminos, azidos iminos, amidos, fosforilos (incluindo fosfonatos e fosfinatos), sulfonilos (incluindo sulfatos, sulfonamidos, sulfamoilos e sulfonatos), e grupos silil, assim como éteres, alquílicos, carbonilos (incluindo cetonas, aldeídos, carboxilatos, e ésteres),  $-CF_3$ ,  $-CN$  e outros. Alquilos exemplares substituídos são abaixo descritos. Os

cicloalquilos podem ser adicionalmente substituídos com alquilo, alquenilos, alcoxis, alquílicos, aminoalquilos, alquilos carbonilo substituídos,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{CN}$ , e outros.

Os termos "alquenilo" e "alquinilo" referem-se a grupos insaturados alifáticos análogos em comprimento e possível substituição pelos alquilos acima descritos, mas que contêm pelo menos uma ligação dupla ou tripla respectivamente.

O termo "aralquilo", como é utilizada na presente invenção refere-se a um grupo alquil ou alquilenilo substituído com pelo menos um grupo arilo. Aralquilos exemplares incluem benzil (isto é, fenilmetil), 2-naftiletil, 2-(2-piridil)propil, 5-dibenzosuberil, e outros.

O termo "alquilcarbonilo", como é utilizada na presente invenção refere-se a  $\text{C}(\text{O})$ -alquilo. Da mesma forma, o termo "arilcarbonilp" refere-se a  $\text{C}(\text{O})$ -arilo. O termo "alquiloxicarbonilo", como é utilizada na presente invenção refere-se ao grupo  $\text{C}(\text{O})$ -O-alquilo, e o termo "ariloxicarbonilo" refere-se a  $\text{C}(\text{O})$ -O-arilo. O termo "aciloxi" refere-se a  $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}_7$ , em que  $\text{R}_7$  é alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo ou heterociclilo.

O termo "amino", como é utilizada na presente invenção refere-se a  $-\text{N}(\text{R}_\alpha)(\text{R}_\beta)$ , em que cada um de  $\text{R}_\alpha$  e  $\text{R}_\beta$  são independentemente hidrogénio, alquilo, alquienilo, alquinilo, aralquilo, arilo, ou em que  $\text{R}_\alpha$  e  $\text{R}_\beta$  juntos com o átomo de nitrogénio ao qual estão presos formam um anel que tem 4-8 átomos. Assim, o termo "amino", como é utilizada na presente invenção inclui grupos amino não substituídos, mono-substituídos (por exemplo, mono-alquilamino ou mono-arilamino), e di-substituídos (por exemplo, di-alquilamino ou alquilarilamino). O termo "amido" refere-se a  $-\text{C}(\text{O})-$

$N(R_8)(R_9)$ , em que  $R_8$  e  $R_9$  são como o acima definido. O termo "acilamino" refere-se a  $-N(R'_8)C(O)-R_7$ , em que  $R_7$  é como o acima definido e  $R'_8$  é alquilo.

Como é utilizado na presente invenção o termo "nitro" significa  $-NO_2$ ; o termo "halogéneo" designa  $-F$ ,  $-Cl$ ,  $-Br$  ou  $-I$ ; o termo "sulfidrilo" significa  $-SH$ ; e o termo "hidroxilo" significa  $-OH$ .

O termo "arilo" como é utilizado na presente invenção inclui grupos aromáticos de 5, 6 e 7-membros que podem incluir de zero a quatro hetero-átomos no anel, por exemplo, fenilo, pirrolilo, furilo, tiofenilo, imidazolilo, oxazol, tiazolilo, triazolilo, pirazolilo, piridilo, pirazinilo, piridazinilo e pirimidinilo, e outros. Estes grupos arilo que têm hetero-átomos na estrutura anular podem também denominar-se "heterociclos de arilo" ou "hetero-aromáticos". O anel aromático pode ser substituído numa ou mais posições do anel por substituintes como os acima descritos como por exemplo, halogéneo, azida, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, silil éter, alquiltio, sulfonilo, sulfonamida, acetona, aldeído, éster, um heterociclilo, uma fracção aromática ou heteroaromática,  $-CF_3$ ,  $-CN$ , ou outra. Os grupos arilo podem também ser parte de um grupo policíclico. Por exemplo, grupos arilo incluem fracções fundidas aromáticas como o naftilo, o antracenilo, o quinolilo, o indolilo, e outros.

Grupos modificadores podem incluir grupos que compreendem estruturas de biotinilo, grupos com fluoresceína, um grupo de dietileno-triaminapentaacetilo, um grupo  $(-)$ -mentoxiacetilo, um grupo N-acetilneuraminilo, uma estrutura

de colil ou um grupo iminobiotinilo. Um peptídeo da LPL S447X pode ser modificada no seu terminal carboxi com um grupo colil de acordo com métodos conhecidos na técnica (ver por exemplo: Wess, G. et al., (1993) Tetrahedron Letters, 34:817-822; Wess, G. et al., (1992) Tetrahedron Letters 33:195-198; and Kramer, W. et al., (1992) J. Biol. Chem. 267:18598-18604). Derivados e análogos de colil podem também ser utilizados como grupos modificadores, como o Aic (3-(O-aminoetil-iso)-colil), que tem um grupo amino livre que pode ser utilizado para modificar adicionalmente o peptídeo da LPL S447X. Um grupo modificador pode ser uma "estrutura de biotinil", que inclui grupos de biotinil e análogos e derivados dos mesmos (como um grupo 2-iminobiotinil). Noutra forma de realização, o grupo modificador pode compreender um "grupo que contém fluoresceína", como um grupo derivado da reacção de um peptídeo da LPL S447X com 5-(e 6-)-carboxifluoresceína, éster succinimidílico ou isotiocianato de fluoresceína. Em várias outras formas de realização, o(s) grupo(s) modificador(es) pode(m) compreender um grupo N-acetilneuraminil, um grupo trans-4-cotinincarboxil, um grupo 2-imino-1-imidazolidineacetil, um grupo (S)-(-)-indolina-2-carboxil, um grupo (-)-mentoxiacetil, um grupo 2-norbornanoacetil, um gama-oxo-5-acenaftenobutirilo, um grupo (-)-2-oxo-4-tiazolidinacarboxil, um grupo tetrahydro-3-furoil, um grupo 2-iminobiotinil, um grupo dietilentriaminopentaacetilo, um grupo 4-morfolinacarbonil, um grupo 2-tiofenoacetil ou um grupo 2-tiofenosulfonil.

Uma LPL S447X terapêutica da invenção pode ser adicionalmente modificada para alterar as propriedades específicas do composto enquanto que é retida a funcionalidade desejada do composto. Por exemplo, numa forma de realização, o composto pode ser modificado para

alterar uma propriedade farmacocinética do composto, tal como a estabilidade *in vivo* ou meia vida. O composto pode ser modificado para marcar o composto com uma substância detectável. O composto pode ser modificado para acoplar o composto a uma fracção terapêutica adicional. Para ainda modificar o composto quimicamente, assim como para alterar as suas propriedades farmacocinéticas, podem ser derivatizados grupos reagentes. As Modificações C-terminais potenciais incluem aquelas que reduzem a capacidade do composto para agir como um substrato para carboxipeptidases. Exemplos de modificadores C-terminais incluem um grupo amido, um grupo etilamida e vários aminoácidos não naturais, tais como D-aminoácidos e beta-alanina. Alternativamente, quando o grupo modificador é preso à extremidade carboxi terminal do domínio do núcleo de agregação, a extremidade amino-terminal do composto pode ser adicionalmente modificada, por exemplo, para reduzir a capacidade do composto de agir como um substrato para aminopeptidases.

Uma LPL S447X terapêutica pode ser adicionalmente modificada para marcar o composto reagindo o composto com uma substância detectável. As substâncias detectáveis adequadas incluem várias enzimas, grupos proteicos, materiais fluorescentes, materiais luminiscentes e materiais radioactivos. Exemplos de enzimas adequados incluem peroxidase de rábano-silvestre, fosfatase alcalina, beta-galactosidase, ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupos proteicos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais adequados fluorescentes incluem umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminiscente inclui

luminol; e exemplos de material adequado radioactivo incluem  $^{14}\text{C}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{35}\text{S}$  ou  $^3\text{H}$ . Uma LPL S447X terapêutica pode ser radioactivamente marcada com  $^{14}\text{C}$ , seja por incorporação de  $^{14}\text{C}$  no grupo modificador ou uma ou mais estruturas de aminoácido no composto. A LPL S447X terapêutica marcada pode ser utilizada para testar a farmacocinética *in vivo* dos compostos, assim como para detectar a progressão da doença ou tendência de um sujeito para desenvolver uma doença, por exemplo para fins de diagnóstico. A distribuição no tecido da LPL S447X terapêutica pode ser detectada utilizando uma LPL S447X terapêutica marcada seja *in vivo* ou numa mostra *in vitro* derivada de um sujeito. Para ser utilizada como um agente de diagnóstico *in vivo*, uma LPL S447X terapêutica da invenção pode por exemplo ser marcada com tecnécio radioactivo ou iodina. Um grupo modificador pode ser escolhido que provê um sítio em que pode ser introduzido um grupo de quelação para o marcador, tal como um derivado Aic de ácido cólico, que tem um grupo amino livre. Por exemplo, um resíduo de fenilalanina na sequência peptídica da LPL S447X pode ser substituída com iodotirosil radioactivo. Quaisquer dos diferentes isótopos de iodina radioactiva podem ser incorporados para criar um agente de diagnóstico.  $^{123}\text{I}$  (meia vida=13.2 horas) pode ser utilizada para a cintigrafia de corpo inteiro,  $^{124}\text{I}$  (meia vida=4 dias) pode ser utilizada para a tomografia por emissão de positrões (PET),  $^{125}\text{I}$  (meia vida=60 dias) pode ser utilizada para estudos de produção metabólica e  $^{131}\text{I}$  (meia vida=8 dias) pode ser utilizada para a contagem de corpo inteiro e estudos de formação de imagens de baixa resolução retardada.

Numa modificação química alternativa, uma LPL S447X terapêutica da invenção pode ser preparada numa forma

"profármaco", em que o composto por si mesmo não age como um agente terapêutico, mas que é capaz de ser transformado, por metabolismo *in vivo*, numa LPL S447X terapêutica como o definido na presente invenção. Por exemplo, neste tipo de composto, o grupo modificador pode estar presente numa forma pró-fármaco que é capaz de ser convertido pelo metabolismo na forma de uma LPL S447X terapêutica activa. Esta forma de pró-fármaco de um grupo modificador é na presente invenção denominada como um "grupo modificador secundário". Na técnica são conhecidas várias estratégias para preparar pró-fármacos peptídicos que limitem o metabolismo para otimizar a administração da forma activa do medicamento baseado no peptídeo (ver por exemplo, Moss, J. (1995) in *Peptide-Based Drug Design: Controlling Transport and Metabolism*, Taylor, M. D. & Amidon, G. L. (Eds), Chapter 18).

Os análogos peptídicos da LPL S447X da invenção podem ser preparados por técnicas standard conhecidas na especialidade. Os análogos peptídicos da LPL S447X podem estar compostos, pelo menos em parte, por um peptídeo sintetizado usando técnicas standard (tais como as descritas em Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993); Grant, G. A. (ed.). *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W. H. Freeman and Company, New York (1992); ou Clark-Lewis, I., Dewald, B., Loetscher, M., Moser, B., & Baggiolini, M., (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 16075-16081). Os sintetizadores de peptídeos automatizados estão comercialmente disponíveis (por exemplo, Advanced ChemTech Model 396. Milligen/Bioscience 9600). Os peptídeos podem ser testados para actividade de acordo com métodos standard. Os peptídeos podem ser purificados por HPLC e analisados por espectrometria de massas. Os peptídeos podem ser dimerizados via uma ponte de

dissulfureto formada por oxidação suave das cisteínas utilizando 10% de DMSO em água. Depois da purificação por HPLC, a formação do dímero pode ser verificado, por espectrometria de massas. Um ou mais grupos modificadores podem ser fixados a um peptídeo da LPL S447X por métodos standard, por exemplo utilizando métodos para a reacção através de um grupo amino (por exemplo, o grupo alfa-amino no termo amino de um peptídeo), um grupo carboxilo (por exemplo, no termo carboxi de um peptídeo), um grupo hidroxilo (por exemplo, num resíduo de tirosina, serina ou treonina) ou outro grupo adequado reactivo numa cadeia lateral de aminoácido (ver por exemplo, Greene, T. W. & Wuts, P. G. M. Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Inc., New York (1991)).

Noutro aspecto da invenção, os peptídeos da LPL S447X podem ser preparados de acordo com as técnicas de ADN recombinante standard utilizando uma molécula de ácido nucleico que codifica o peptídeo. Uma sequência de nucleotídeos que codifica o peptídeo de interesse pode ser determinado utilizando o código genético e uma molécula oligonucleotídeo que tem esta sequência de nucleotídeos pode ser sintetizada por métodos de síntese de ADN standard (por exemplo, utilizando um sintetizador de ADN automatizado). Alternativamente, uma molécula de ADN que codifica um composto peptídico pode ser derivado do gene da proteína precursora natural ou ADNc (por exemplo, utilizando a reacção em cadeia da polimerase (PCR) e/ou digestão com a enzima de restrição) de acordo com as técnicas standard de biologia molecular. Por exemplo, o fragmento de ADNc da LPL tipo selvagem humana pode ser clonado por RT-PCR do ARN total do tecido adiposo humano utilizando os seguintes iniciadores 5' e 3' UTR respectivamente; 5'-ATA GAA TTC GGA TCC ATC GAT/GC TCC TCC

AGA GGG ACG GCG CCC CG-3' (que introduz um sítio 5' EcoRI, BamHI e ClaI da sequência codificante da LPL) e 5'-TAT GTC GAC TAG ATA TC/GCC GTT CTT TGT TCT GTA GAT TCG CCC-3' (que introduz os sítios 3' SalI, XbaI e EcoRV da sequência codificante de LPL). Os ADNcs da LPL S447X podem ser derivados do ADNc da LPL de 1.6kb de tipo selvagem humana por mutagénese sítio dirigido (que pode ser confirmada pela sequenciação, ver Henderson et al., 1991, Journal of Clinical Investigation 87, 2005-2011; e, Zhang et al., 1996 Biochimica et Biophysica Acta 1302, 159-166).

A invenção também provê uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um peptídeo da LPL S447X da invenção. A expressão "molécula de ácido nucleico" inclui moléculas de ADN e moléculas de ARN que podem ser monocatenários ou bicatenários. Nas formas alternativas de realizar a invenção, o ácido nucleico isolado codifica um peptídeo em que um ou mais aminoácidos são alterados ou deletados.

Para facilitar a expressão de um composto peptídico numa célula hospedeira por técnicas standard de ADN recombinante, o ácido nucleico isolado que codifica o peptídeo pode ser incorporado num vector de expressão recombinante. Consequentemente, a invenção também provê vectores de expressão recombinantes que compreendem as moléculas de ácido nucleico da invenção. Como é utilizado na presente invenção, o termo "vector" refere-se a um ácido nucleico, proteína, lípido ou outra molécula capaz de transportar um ácido nucleico ao qual ele foi ligado funcionalmente. Os vectores podem incluir plasmídeos de ADN bicatenário circular e vectores víricos. Certos vectores são capazes de fazer a replicação autónoma numa célula hospedeira na que são introduzidos (tais como vectores

bacterianos que têm uma origem bacteriana de replicação e vectores de mamífero episomal). Outros vectores (tais como vectores de mamífero não episomal) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira por introdução na célula hospedeira, e desse modo podem-se replicar ao longo do genoma hospedeiro. Certos vectores podem ser capazes de dirigir a expressão de genes aos quais eles estão ligados funcionalmente.

Nos vectores recombinantes da invenção, a sequência de nucleotídeos que codifica um peptídeo pode ser ligado funcionalmente a uma ou mais sequências reguladoras, seleccionadas com base nas células hospedeiras a ser utilizadas para a expressão. As expressões "ligadas funcionalmente" ou ligação "funcional" significam que as sequências que codificam o peptídeo estão ligadas à(s) sequência(s) regulador(as) de forma a que permitam a expressão do composto peptídico. A expressão "sequência reguladora" inclui promotores, intensificadores, sinais de poliadenilação e outros elementos de controlo da expressão. Estas sequências reguladoras estão descritas, por exemplo, em Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, san Diego, Calif. (1990).

As sequências reguladoras incluem aquelas que dirigem a expressão constitutiva de uma sequência de nucleotídeos em muitos tipos de células hospedeiras, aquelas que dirigem a expressão da sequência de nucleotídeos só em determinadas células hospedeiras (tais como sequências reguladoras específicas do tecido) e aquelas que dirigem a expressão de uma maneira regulável (tal como só na presença de um agente de indução). O desenho do vector de expressão pode depender de factores tais como a escolha da célula hospedeira para

ser transformada e o nível de expressão do composto peptídico desejado.

Os vectores de expressão recombinantes da invenção podem ser desenhados para a expressão de compostos peptídicos nas células procarióticas ou eucarióticas. Por exemplo, os compostos peptídicos podem ser expressos em células bacterianas tais como *E. coli*, células de insecto (usando vectores de expressão de baculovírus) células de levedura ou células mamíferas. As células hospedeiras adequadas são discutidas adicionalmente em Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Alternativamente, o vector de expressão recombinante pode ser transcrito e traduzido *in vitro*, por exemplo usando sequências reguladoras do promotor T7 e T7 polimerase. Exemplos de vectores para a expressão em levedura *S. cerevisiae* incluem pYepSec1 (Baldari et al., (1987) EMBO J. 6:229-234), pMFa (Kurjan & Herskowitz, (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) Gene 54:113-123), e pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.). Os vectores de baculovírus disponíveis para a expressão de proteínas ou peptídeos nas células de insecto cultivadas (por exemplo, células Sf 9) incluem as séries pAc (Smith et al., (1983) Mol. Cell. Biol. 3:2156-2165) e as séries pVL (Lucklow, V. A., & Summers, M. D., (1989) Virology 170:31- 39). Exemplos de vectores de expressão mamíferos incluem pCDM8 (Seed, B., (1987) Nature 329:840) e pMT2PC (Kaufman et al. (1987), EMBO J. 6:187-195). Quando utilizadas nas células mamíferas, as funções de controlo do vector de expressão são muitas vezes providas por elementos reguladores víricos. Por exemplo, promotores comummente utilizados são derivados de políoma, adenovírus 2, citomegalovírus e Vírus Símios 40.

Adicionalmente às sequências de controlo reguladoras, os vectores de expressão recombinantes podem conter sequências de nucleotídeos adicionais, tais como um gene marcador genético para identificar as células hospedeiras que têm o vector incorporado. Os genes marcadores genéticos são bem conhecidos na técnica. Para facilitar a secreção do composto peptídico de uma célula hospedeira, em particular das células hospedeiras mamíferas, o vector de expressão recombinante preferencialmente codifica uma sequência sinal ligado funcionalmente às sequências que codificam o terminal amino do composto peptídico, de forma a que após a expressão, o composto peptídico é sintetizado com a sequência sinal fundido no seu terminal amino. Esta sequência sinal dirige o composto peptídico na via secretora da célula e esta é seguidamente clivada, permitindo a libertação do composto do peptídeo maduro (isto é o composto peptídico sem a sequência sinal) da célula hospedeira. A utilização de uma sequência sinal para facilitar a secreção das proteínas ou dos peptídeos das células hospedeiras mamíferas é bem conhecida na técnica.

Um vector de expressão recombinante que compreende um ácido nucleico que codifica um composto peptídico pode ser introduzido numa célula hospedeira para produzir o composto peptídico na célula hospedeira. Consequentemente, a invenção também provê células hospedeiras que contêm os vectores de expressão recombinantes da invenção. As expressões "células hospedeiras" e "as células hospedeiras recombinantes" são na presente invenção utilizadas indistintamente. Estas expressões referem-se não só à célula objecto particular mas também à progénie ou progénie potencial dessa célula. Porque certas modificações podem dar-se nas gerações posteriores seja devido à mutação ou devido a influências meio ambientais, esta progénie não

pode, de facto, ser idêntica à célula mãe, mas está incluída dentro do âmbito da expressão como é utilizada na presente invenção. Uma célula hospedeira pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica. Por exemplo, um composto peptídico pode ser expresso nas células bacterianas tais como *E. coli*, células de insecto, levedura ou células mamíferas. O composto peptídico pode ser expresso *in vivo* num sujeito para o sujeito por tratamento genético (discutido adicionalmente abaixo).

O vector de ADN pode ser introduzido nas células procarióticas ou eucarióticas via técnicas de transformação ou de transfecção convencionais. Os termos "transformação" e "transfecção" referem-se a técnicas para introduzir um ácido nucleico externo numa célula hospedeira, incluindo fosfato de cálcio ou coprecipitação de cloreto de cálcio, transfecção mediada por dextrano DEAE, lipofecção, electroporação, microinjecção e transfecção mediada vírica. Os métodos adequados para transformar ou transfectar as células hospedeiras podem por exemplo ser encontrados em Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989), e outros manuais de laboratório. Os métodos para introduzir ADN nas células mamíferas *in vivo* são também conhecidos, e podem ser utilizados para administrar o ADN vector da invenção a um sujeito para o tratamento genético.

Para a transfecção estável das células mamíferas, é sabido que, dependendo do vector de expressão e da técnica de transfecção utilizada, só uma pequena fracção das células pode integrar o ADN estrangeiro no seu genoma. Para identificar e seleccionar estes integrantes, um gene que codifica um marcador genético (tal como resistência aos antibióticos) pode ser introduzido nas células hospedeiras

juntamente com o gene de interesse. Os marcadores genéticos preferidos incluem aqueles que conferem resistência aos medicamentos, tais como G418, higromicina e metotrexato. Os ácidos nucleicos que codificam um marcador genético podem ser introduzidos numa célula hospedeira no mesmo vector que codifica o composto peptídico ou pode ser introduzido num vector separado. As células transfectadas de maneira estável com o ácido nucleico introduzido podem ser identificadas por selecção de medicamento (as células que incorporaram o gene marcador genético sobreviverá, enquanto que as outras células morrerão).

Um ácido nucleico da invenção pode ser administrado às células *in vivo* utilizando os métodos tais como a injeção directa de ADN, a absorção de ADN mediado por receptor, a transfecção mediada por vírus ou a transfecção não vírica e a transfecção baseada em lípidos, todos eles podem envolver a utilização de vectores do tratamento genético. A injeção directa foi utilizada para introduzir ADN nas células *in vivo* (ver por exemplo, Acsadi et al. (1991) *Nature* 332:815-818; Wolff et al. (1990) *Science* 247:1465-1468). Pode ser utilizado um aparelho de administração (por exemplo, uma "pistola de genes") para injectar ADN nas células *in vivo*. Este aparelho pode estar comercialmente disponível (por exemplo, de BioRad). O ADN nu pode também ser introduzido nas células complexando o ADN num catião, tal como polilisina, que é acoplada a um ligando para um receptor da superfície celular (ver por exemplo Wu, G. & Wu, C. H. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:14621; Wilson et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:963-967, e Pedido de Patente norte-americana No. 5,166,320). A união do complexo de ligando de ADN ao receptor pode facilitar a absorção do ADN por endocitose mediado por receptor. Um complexo de ligando de ADN ligado a cápsides de adenovírus que desagregam

endossomas, libertando deste modo material no citoplasma, pode ser utilizado para evitar a degradação do complexo por lisossomas intracelulares (ver por exemplo Curiel et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8850. Cristiano et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2122-2126).

Os retrovírus defeituosos estão bem caracterizados para serem utilizados como vectores de tratamento genético (para uma revisão ver Miller, A. D. (1990) Blood 76:271). Os protocolos para produzir retrovírus recombinantes e para infectar células *in vitro* ou *in vivo* com estes vírus podem ser encontrados em Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14 e outros manuais de laboratório standard. Exemplos de retrovírus adequados incluem pLJ, pZIP, pWE e pEM que são bem conhecidos dos técnicos especializados. Exemplos de linhas de vírus de empacotamento adequadas incluem .p $\psi$ i.Crip, .p $\psi$ i.Cre, .p $\psi$ i.2 e .p $\psi$ i.Am. Os retrovírus têm sido utilizados para introduzir uma variedade de genes em muitos tipos de células diferentes, incluindo as células epiteliais, as células endoteliais, os linfócitos, os mioblastos, os hepatócitos, as células de medula óssea, *in vitro* e/ou *in vivo* (ver por exemplo Eglitis, et al. (1985) Science 230:1395-1398. Danos & Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464. Wilson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huber et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644; Kay et al. (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu et al.

(1993) J. Immunol. 150:4104-4115; Pedido de Patente norte-americana No. 4,868,116; Pedido de Patente norte-americana No. 4,980,286; Pedido de Patente PCT WO 89/07136; Pedido de Patente PCT WO 89/02468; Pedido de Patente PCT WO 89/05345; e Pedido de Patente PCT WO 92/07573).

Para ser utilizado como um vector de tratamento genético, o genoma de um adenovírus pode ser manipulado para que codifique e expresse um composto peptídico da invenção, mas é inativado enquanto à sua capacidade para se replicar num ciclo de vida vírico lítico normal. Ver por exemplo Berkner et al. (1988) BioTechniques 6:616; Rosenfeld et al. (1991) Science 252:431-434; e Rosenfeld et al. (1992) Cell 68:143-155. Os vectores adenovíricos adequados derivados da cepa de adenovírus Ad tipo 5.dl324 e outras cepas de adenovírus (por exemplo, Ad2, Ad3, Ad7 etc.) são conhecidos pelos técnicos especializados. Os adenovírus recombinantes são vantajosos porque não requerem a divisão das células para serem veículos de administração de genes eficazes e podem ser utilizados para infectar uma grande variedade de tipos de células, incluindo o epitélio das vias aéreas (Rosenfeld et al. (1992) citado *supra*), as células endoteliais (Lemarchand et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6482-6486), os hepatócitos (Herz & Gerard (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2812-2816) e as células musculares (Quantin et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2581-2584).

Um vírus adenoassociado (AAV) pode ser utilizado como um vector de tratamento genético para a administração de ADN com o fim de um tratamento genético. O AAV é um vírus de origem natural defeituoso que requer outro vírus, tal como um adenovírus ou um herpesvírus, como um vírus auxiliar para a replicação eficaz e um ciclo de vida produtivo

(Muzyczka et al. Curr. Topics in Micro. and Immunol. (1992) 158:97-129). O AAV pode ser utilizado para integrar ADN em células que não estão divididas (ver por exemplo Flotte et al. (1992) Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349-356; Samulski et al. (1989) J. Virol. 63:3822-3828; e McLaughlin et al. (1989) J. Virol. 62:1963-1973). Um vector de AAV como o descrito por Tratschin et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 pode ser utilizado para introduzir ADN nas células (ver por exemplo Hermonat et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470; Tratschin et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081; Wondisford et al. (1988) Mol. Endocrinol. 2:32-39; Tratschin et al. (1984) J. Virol. 51:611-619; e Flotte et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:3781-3790). Os vectores lentivirais de tratamento genético podem também ser adaptados para serem utilizados na invenção.

Os métodos gerais para o tratamento genético são conhecidos na técnica. Ver por exemplo, o Pedido de Patente norte-americana No. 5,399,346 de Anderson et al. Uma cápsula biocompatível para administrar material genético está descrito no Pedido de Patente PCT WO 95/05452 por Baetge et al. Os métodos de transferência de genes nas células hematopoiéticas foram também previamente providas (ver Clapp, D. W., et al., Blood 78: 1132-1139 (1991); Anderson, Science 288:627-9 (2000); e, Cavazzana-Calvo et al., Science 288:669-72 (2000).

A deficiência genética da LPL pode ser classificada em três categorias dependendo das características da proteína LPL. Os doentes hipertrigliceridémicos tipo I têm uma massa de proteína LPL de muito baixa a nenhuma. Os doentes tipo II produzem pouca proteína LPL pré-heparina mas o nível aumenta após o tratamento com heparina. Na classe tipo III, há grandes quantidades de proteína pré-heparina circulante

com uma mudança pequena nos níveis depois do desafio da heparina. Ainda que a utilidade deste sistema de classificação é limitado, com alguns doentes heterozigotos do composto que se estendem em duas destas classes, a clarificação da presença ou ausência da proteína LPL no plasma pode ser importante para decidir quais os doentes que são muito propensos a tolerar a transferência de genes sem uma reacção imunológica à LPL S447X terapêutica, sendo o espectro de doentes do tipo I, os mais propensos a desenvolver uma reacção imunológica, sendo o dos doentes tipo II, os menos propensos a desenvolver uma reacção imunológica.

#### EXEMPLO 1

##### Administração da proteína LPL S447X por tratamento genético

Um modelo de rato com deficiência da LPL humana foi criado por focalização de genes para inactivar o gene da LPL de murino. Todas as crias (-/-) homocigotas morrem 48 horas após o nascimento com quilomicronemia massiva de leite materno. Ao tentar resgatar as crias -/-, a administração intramuscular de adenovírus recombinante contendo o gene da LPL humana de tipo selvagem (Ad-LPL) sozinha não resultou num aumento significativo de massa da LPL humana no plasma pós-heparina e não resgatou a mortalidade de uma deficiência total da LPL.

A administração intramuscular de um vector de tratamento genético Ad-447 a crias recém-nascidas resultou na aparição de massa da LPL humana em níveis altos no plasma pós-heparina. Numa ninhada de 4 crias, 2 foram injectadas com Ad-447 ( $2 \times 10^8$  Pfu em 100  $\mu$ l de PBS) em 4 sítios (25  $\mu$ l/sítio) em 4 extremidades no dia do nascimento. Dois

dias depois, a heparina foi injectada a 1000 u/kg intraperitonealmente e as crias foram sacrificadas por decapitação para recolher aproximadamente 10 a 20  $\mu$ l de plasma pós-heparina para análise. Uma extremidade anterior e uma posterior foram colhidas e homogeneizadas a 100 mg/ml em tampão de extracção. Os resultados estão mostrados no quadro 1.

**Quadro 1**

	Cont'l	Ad-447
Massa da LPL no plasma pós-heparina:	61.9	5351.2
(ng/ml)	61.0	8992.6
Actividade da LPL no músculo homogeneizado:	43.2	215.6
(mU/ml)	35.8	119.7
Massa da LPL no músculo homogeneizado:	29.5	1820.7
(ng/ml)	45.3	1478.7

Estes resultados mostram que a administração intramuscular de uma LPL S447X terapêutica por transferência de genes mediada por adenovírus resultou num aumento significativo da massa da proteína da LPL humana no plasma pós-heparina. Estes resultados são indicativos dos resultados surpreendentemente vantajosos obteníveis com a utilização da LPL S447X terapêutica da invenção, em comparação com a LPL de tipo selvagem.

Um vector de adenovírus da invenção para o tratamento genético pode ser produzido por exemplo utilizando o kit Adeno-Quest™ comercializado por Quantum Biotechnologies Inc. (Montreal, QC, Canada). Num exemplo desta abordagem, os ADNcs foram clonados no plasmídeo transbordador pQBI-AdCMV5, que contém o promotor CMV5 e intensificador e uma poli A de globina. Os ADNcs da LPL (tipo selvagem e S447X)

foram digeridos por duplicado com HindIII e XbaI e inseridos no sítio de BamHI via ligação sem corte da extremidade. O gene da LPL humana foi inserido 1.5 unidades de mapa (mu) a jusante desde a extremidade 5' do genoma do adenovírus e foi seguido de 9.4-15.5 mu de Ad5 permitindo a recombinação homóloga. O vector transbordador e a extremidade direita digerida por ClaI, o fragmento deletado com E3 do genoma Ad5 foi co-transfectado em 293 células por precipitação de fosfato de cálcio e coberto com 0.8% de agarose em DMEM/5% de FBS. Depois da purificação em placas, um clone de alta expressão foi seleccionado e amplificado. No dia 9 e 14, as placas *in vitro* foram rastreadas para a actividade LPL. Dois clones com a actividade LPL máxima foram escolhidos, a placa foi purificada uma segunda vez e amplificada numa cultura celular de 293A em placas de 15 cm. A purificação dos vírus recombinantes de alta titulação ( $\sim 3 \times 10^{10}$  Pfu/ml) foi executada por ciclos duplos de ultracentrifugação com gradiente de densidade CsCl. As reservas dos vírus purificados foram dializadas contra 4 mudanças de solução salina tamponada com HEPES (HBS, 20mM de HEPES, 150 mM de NaCl, pH 7.3) com 10% de glicerol durante 16-18 horas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Como o acima descrito. Os títulos das reservas víricas foram determinados por ensaio em placas utilizando 293 células. O título foi calculado como unidades de formação de placas por mililitro (Pfu/ml) e foi  $1-3 \times 10^{10}$  Pfu/ml. As preparações do vírus foram quantificadas pelo ensaio de proteína de Lowry a consistência revelou  $\sim 50$  partículas por Pfu de todas as preparações de Ad-LPL e Ad-447.

## EXEMPLO 2

Um adenovírus de serótipo 5 contendo um gene da LPL S447X sobre o controlo do promotor CMV foi desenvolvido (Ad-447

como o descrito no exemplo 1), e o seu efeito foi comparado com os efeitos de uma LPL tipo selvagem contendo adenovírus. O modelo animal empregue foi o modelo de rato *knockout* da LPL +/- (Coleman et al., 1995, The Journal of Biological Chemistry 270[21], 12518-12525).

Os estudos preliminares *in vitro* feitos nas células HepG2 indicaram uma relação de resposta às doses para actividade LPL para o vírus Ad-447 de uma magnitude similar ao do adenovírus que contém a LPL de tipo selvagem. Houve, no entanto, uma diferença marcada na quantidade de massa imunoreactiva da LPL. A massa imunoreactiva da LPL nas células tratadas com Ad-447, a uma MOI de 50 que infecta essencialmente 100% das células, foi aproximadamente 4 vezes superior que aquela de Ad-LPL.

Quando a relação da resposta a doses do vírus Ad-447 foi analisada numa pequena coorte de ratos via injeção intravenosa, foram obtidos resultados inesperados. O nível de actividade LPL não foi responsivo a multiplicações do vírus ( $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  ou  $2 \times 10^9$  Pfu/rato). O nível da actividade foi similar ao observado no coorte de ratos dando  $5 \times 10^8$  Pfu de Ad-LPL. No entanto, o nível da proteína LPL observado nestes ratos foi excepcionalmente alto. Apesar da actividade aparentemente começar a decrescer ao 7º. dia, a massa imunoreactiva continuou a aumentar nas três doses a um nível de aproximadamente 35-40,000 ng/ml. Foi observado que a maioria desta proteína no 7º dia no plasma pré-heparina e a pequena variação na actividade lipolítica indicou que estava amplamente numa forma inactiva. Aproximadamente 5000ng/ml foram encontrados exclusivamente no plasma pós-heparina. Passados 70 dias, os níveis da actividade LPL nos ratos a que foi administrado Ad-447 seguiam os da Ad-LPL de perto e voltaram aos níveis

de base de referência entre 6 e 10 semanas pós-injecção. No entanto, os níveis de proteína imunoreactiva LPL foram significativamente elevados nos ratos que receberam Ad-LPL ou Ad-447 com níveis na coorte de Ad 447 mantendo níveis profundamente elevados no grupo de Ad-LPL do tipo selvagem. Os níveis de TG foram significativamente reduzidos nas três doses de Ad-447 de modo similar a  $5 \times 10^8$  Pfu Ad-LPL. Tanto o colesterol total como o colesterol HDL foram significativamente reduzidos até ao dia 14.

Para demonstrar resposta às doses, os ratos com +/- LPL (n=5/grupo) foram subministrados com  $5 \times 10^7$  ou  $5 \times 10^8$  Pfu de Ad 447 ou de Ad-LPL (uma dose  $5 \times 10^7$  Pfu é equivalente a aproximadamente  $5 \times 10^9$  partículas). A uma dose de  $5 \times 10^8$  Pfu de Ad-LPL ou de Ad-447 por rato, houve um aumento significativo de 2, 7 vezes na actividade LPL no plasma acompanhado por um aumento significativo nos níveis de proteína LPL no 5º dia pós-transferência de genes. Os níveis correspondentes de TG, HDL-C e Total-C também desceram significativamente. A esta dose, a única diferença significativa entre o adenovector contendo o ADNc da LPL tipo selvagem contra o Ad-447 foi o nível de proteína LPL no plasma, que foi elevado no grupo Ad-447. Ainda que os níveis de proteína LPL pós-heparina foram significativamente elevados em ambos grupos sobre a base de referência ou ratos de controlo, estes foram ainda mais profundamente elevados no grupo Ad-447 ( $p < 0.03$ ). As diferenças mais provocativas foram somente observadas na dose inferior e estavam nas medidas de TG e de colesterol. 3 dias após a transferência dos genes, os níveis de TG estavam significativamente diminuídos nos dois grupos Ad-LPL e Ad-447, indicando a eficácia da LPL transferida nos dois grupos de ratos. No entanto, houve um aumento significativo no HDL-C e no Total-C somente no grupo Ad-447

( $p < 0.01$  e  $p < 0.03$  respectivamente, em comparação com o tratamento de referência ou de Ad-LPL). A magnitude destas alterações, quando comparadas com os níveis de referência, indica que a maioria do aumento em Total-C está na fracção HDL-C. Nesta mesma dose na coorte Ad-LPL, houve uma ligeira diminuição no Total-C e no HDL-C com apenas a redução em Total-C adquirindo importância ( $p = 0.04$ ). Isto ilustra um teor de HDL-C aumentado após a transferência de genes mediada por adenovírus do gene da LPL S447X humana nos ratos. Uma elevação similar significativa da fracção de HDL-C foi observada no 7º. dia, resolvendo-se no dia 14.

### EXEMPLO 3

Este exemplo ilustra que a massa e a actividade LPL está associada com a gravidade da isquemia e angina de peito, indicando que a terapêutica com S447X da presente invenção pode ser utilizada para tratar condições deste tipo elevando a massa ou actividade da LPL.

Neste exemplo, os níveis pós-heparina da actividade e da massa da LPL foram medidos numa grande coorte de doentes de CHD masculinos que participaram no estudo REGRESS, um ensaio de regressão redutora de lípidos (Jukema et al., 1995, *Circulation* 91: 2528-2540). Adicionalmente foram analisadas as relações entre a actividade e a massa da LPL e a gravidade de angina de peito de acordo com a classificação NYHA e a isquemia silenciosa num controlo ambulatorio (A)ECG de 24 horas. Os resultados indicaram que os doentes em diferentes quartis da actividade e da massa da LPL tiveram uma gravidade diferente de angina; um total do 47% de doentes no quartil da LPL inferior indicou uma angina de classe 3 ou 4. Contrariamente, só 29% no quartil da actividade máxima ( $p = 0.002$ ) teve uma angina severa.

Estes parâmetros foram suportados pelos resultados de AECG; em que a carga total isquêmica no quartil da actividade LPL inferior foi 36.5 (104,1) mm.min, *versus* 14.8 (38.8) mm.min no quartil mais alto da actividade LPL ( $p=0.001$ ). Os níveis da actividade LPL estiveram fortemente correlacionados com a massa da LPL ( $r=0.70$ ;  $p<0.0001$ ). Uma associação significativa foi também demonstrada entre a massa da proteína LPL e a classe NYHA ( $p=0.012$ ). Estes resultados demonstram uma relação significativa entre a massa e a actividade LPL e a gravidade da isquemia como a definida pela classe de angina e AECG, indicando que a LPL S447X terapêutica que ajusta uma massa ou actividade LPL eficaz pode ser utilizada para tratar a isquemia e a angina de peito.

#### EXEMPLO 4

Este exemplo ilustra que a proteína LPL S447X está relacionada com a protecção contra a cardiopatia coronária, indicando que a S447X terapêutica da presente invenção pode ser utilizada para tratar esta condição. De forma aleatória foi constatado que um total de 1114 homens e 1144 mulheres a partir do Framingham Offspring Study (FOS) tinham presença do gene da LPL S447X. A frequência do veículo do alelo da LPL S447X foi 17%, e no estado portador do homem foi associado com os níveis totais de colesterol mais alto (TC) ( $\Delta=6.2$  mg/dl,  $p=0.03$ ), HDL-C mais alto ( $\Delta=2.3$  mg/dl,  $p=0.01$ ) e triglicerídeo inferior (TG) ( $\Delta=-19.4$  mg/dl,  $p=0.02$ ). Além disso, nos homens o alelo da LPL S447X conferiu protecção significativa contra CHD (estimativa de risco relativo: 0.43;  $p=0.04$ ).

#### EXEMPLO 5

Este exemplo demonstra a utilidade da LPL S447X terapêutica num modelo alternativo da doença humana. O modelo animal empregue foi o modelo de rato *knockout* completamente deficitário de (-/-) ApoE. O efeito terapêutico de um serótipo 5 de adenovírus que contém um gene da LPL S447X sobre o controlo do promotor CMV (vírus Ad-447) foi comparado com o efeito terapêutico de um adenovírus que contém a LPL do tipo selvagem (Ad-LPL), e com uma fosfatase alcalina de controlo (AP) contendo adenovírus (Ad-AP).

A injeção intravenosa na veia da cauda de  $5 \times 10^8$  Pfu de Ad-447 ou Ad-LPL tipo selvagem resultou numa grande redução dos níveis de TG no plasma e um grande aumento na actividade da LPL e nos níveis de massa de proteína no plasma pós-heparina, em comparação com os ratos Ad-AP injectados com controlo, revelando a eficácia surpreendente da LPL S447X terapêutica nos tratamentos alternativos que envolvem a modulação da actividade ou da massa da LPL.

Quadro 2

Vírus	N	Plasma pré-heparina		Plasma pós-heparina		
		TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	T-C (mg/dl)	Actividade LPL (mU/ml)	Massa da LPL (ng/ml)
Controlo	2	34 ± 7	12 ± 1	192 ± 1	784 ± 222	13 ± 22
Ad-447	1	0	14	178	1395	9810
Ad-LPL	2	5 ± 3	13 ± 4	178 ± 3	1335 ± 39	5511 ± 3447

O quadro 2 ilustra as medidas da LPL e dos lípidos 3 dias após a administração de  $5 \times 10^8$  Pfu de Ad-LPL, Ad-447 ou fosfatase alcalina de controlo a ratos deficitários de ApoE. De acordo com os dados obtidos nos ratos heterozigotos deficitários da LPL, os triglicerídeos do plasma foram diminuídos enquanto que a actividade LPL e os níveis de massa proteica foram aumentados nos ratos que receberam Ad-LPL ou Ad-447, com Ad-447 provendo

comparativamente uma maior redução de TG, maior actividade da LPL e um aumento da massa da LPL muito significativa.

Um protocolo exemplar para analisar o efeito da administração intravenosa e intramuscular de uma LPL S447X terapêutica num modelo de doença animal são os seguintes. Um serótipo 5 de adenovírus que contém um gene da LPL S447X segundo o controlo do promotor CMV (Ad-447) pode ser comparado com os efeitos de uma LPL tipo selvagem contendo adenovírus, Ad-LPL. O modelo animal pode ser o modelo do rato *knockout* +/- LPL (Coleman et al., 1995, The Journal of Biological Chemistry 270[21], 12518-12525). Por exemplo, uma dose total de  $5 \times 10^8$  Pfu pode ser diluída em 120ul com uma solução de solução salina estéril e dividida em 4 partes iguais. Um volume de 30ul pode ser injectado directamente no tibial anterior e o gastrocnémio das duas patas de cada rato para uma dose total de  $5 \times 10^8$  Pfu por rato. O sangue pode ser obtido nos 3º. e 7º. dias pós-tratamento e as categorias musculares podem ser isoladas 14 dias pós-tratamento para a análise do tecido.

## CONCLUSÃO

Apesar de que várias formas de realizar a invenção estão descritas aqui, muitas adaptações e modificações podem ser feitas dentro do âmbito da invenção de acordo com o conhecimento comum geral dos técnicos especializados. Estas modificações incluem a substituição de equivalentes conhecidos para qualquer aspecto da invenção para obter o mesmo resultado substancialmente da mesma maneira. As variações numéricas incluem os números que definem a variação. Na especificação, a palavra "compreendendo" é utilizada como um termo indefinido, substancialmente equivalente à frase "incluindo, mas não limitado a", e a

palavra "compreende" tem um significado correspondente. A citação das referências na presente invenção não deve ser interpretada como uma admissão de que estas referências representam a técnica anterior à presente invenção.

## LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Amsterdam Molecular Therapeutics B.B. The University of British Columbia Academic Hospital at the University of Amsterdam

<120> Tratamento com a variante da LPL

<130> BO 44950 EP

<140> EP 00943499.4

<141> 2000-06-23

<150> EP 99202048.7

<151> 1999-06-24

<160> 4

<170> Versão Patentin 3.1

<210> 1

<211> 446

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

---

Thr Asn Lys Lys Val Asn Arg Ile Thr Gly Leu Asp Pro Ala Gly Pro  
 145 150 155 160

Asn Phe Glu Tyr Ala Glu Ala Pro Ser Arg Leu Ser Pro Asp Asp Ala  
 165 170 175

Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr Phe Thr Arg Gly Ser Pro Gly Arg  
 180 185 190

Ser Ile Gly Ile Gln Lys Pro Val Gly His Val Asp Ile Tyr Pro Asn  
 195 200 205

Gly Gly Thr Phe Gln Pro Gly Cys Asn Ile Gly Glu Ala Ile Arg Val  
 210 215 220

Ile Ala Glu Arg Gly Leu Gly Asp Val Asp Gln Leu Val Lys Cys Ser  
 225 230 235 240

His Glu Arg Ser Ile His Leu Phe Ile Asp Ser Leu Leu Asn Glu Glu  
 245 250 255

Asn Pro Ser Lys Ala Tyr Arg Cys Ser Ser Lys Glu Ala Phe Glu Lys  
 260 265 270

Gly Leu Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Asn Leu Gly Tyr  
 275 280 285

Glu Ile Asn Lys Val Arg Ala Lys Arg Ser Ser Lys Met Tyr Leu Lys  
 290 295 300

Thr Arg Ser Gln Met Pro Tyr Lys Val Phe His Tyr Gln Val Lys Ile  
 305 310 315 320

His Phe Ser Gly Thr Glu Ser Glu Thr His Thr Asn Gln Ala Phe Glu  
 325 330 335

Ile Ser Leu Tyr Gly Thr Val Ala Glu Ser Glu Asn Ile Pro Phe Thr  
 340 345 350

Leu Pro Glu Val Ser Thr Asn Lys Thr Tyr Ser Phe Leu Ile Tyr Thr  
 355 360 365

Glu Val Asp Ile Gly Glu Leu Leu Met Leu Lys Leu Lys Trp Lys Ser  
 370 375 380

Asp Ser Tyr Phe Ser Trp Ser Asp Trp Trp Ser Ser Pro Gly Phe Ala  
 385 390 395 400

Ile Gln Lys Ile Arg Val Lys Ala Gly Glu Thr Gln Lys Lys Val Ile  
 405 410 415

Phe Cys Ser Arg Glu Lys Val Ser His Leu Gln Lys Gly Lys Ala Pro  
 420 425 430

Ala Val Phe Val Lys Cys His Asp Lys Ser Leu Asn Lys Lys  
 435 440 445

<210> 2

<211> 475

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

---

145		150		155		160									
Gly	Ala	His	Ala	Ala	Gly	Ile	Ala	Gly	Ser	Leu	Thr	Asn	Lys	Lys	Val
			165						170					175	
Asn	Arg	Ile	Thr	Gly	Leu	Asp	Pro	Ala	Gly	Pro	Asn	Phe	Glu	Tyr	Ala
			180					185					190		
Glu	Ala	Pro	Ser	Arg	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Ala	Asp	Phe	Val	Asp	Val
		195					200					205			
Leu	His	Thr	Phe	Thr	Arg	Gly	Ser	Pro	Gly	Arg	Ser	Ile	Gly	Ile	Gln
	210					215					220				
Lys	Pro	Val	Gly	His	Val	Asp	Ile	Tyr	Pro	Asn	Gly	Gly	Thr	Phe	Gln
225					230					235					240
Pro	Gly	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Ala	Ile	Arg	Val	Ile	Ala	Glu	Arg	Gly
				245					250					255	
Leu	Gly	Asp	Val	Asp	Gln	Leu	Val	Lys	Cys	Ser	His	Glu	Arg	Ser	Ile
		260						265					270		
His	Leu	Phe	Ile	Asp	Ser	Leu	Leu	Asn	Glu	Glu	Asn	Pro	Ser	Lys	Ala
	275						280					285			
Tyr	Arg	Cys	Ser	Ser	Lys	Glu	Ala	Phe	Glu	Lys	Gly	Leu	Cys	Leu	Ser
	290					295					300				
Cys	Arg	Lys	Asn	Arg	Cys	Asn	Asn	Leu	Gly	Tyr	Glu	Ile	Asn	Lys	Val
305					310					315				320	
Arg	Ala	Lys	Arg	Ser	Ser	Lys	Met	Tyr	Leu	Lys	Thr	Arg	Ser	Gln	Met
				325					330					335	
Pro	Tyr	Lys	Val	Phe	His	Tyr	Gln	Val	Lys	Ile	His	Phe	Ser	Gly	Thr
			340					345					350		
Glu	Ser	Glu	Thr	His	Thr	Asn	Gln	Ala	Phe	Glu	Ile	Ser	Leu	Tyr	Gly
		355					360					365			
Thr	Val	Ala	Glu	Ser	Glu	Asn	Ile	Pro	Phe	Thr	Leu	Pro	Glu	Val	Ser
	370					375					380				
Thr	Asn	Lys	Thr	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Tyr	Thr	Glu	Val	Asp	Ile	Gly
385					390					395				400	

Glu Leu Leu Met Leu Lys Leu Lys Trp Lys Ser Asp Ser Tyr Phe Ser  
405 410 415

Trp Ser Asp Trp Trp Ser Ser Pro Gly Phe Ala Ile Gln Lys Ile Arg  
420 425 430

Val Lys Ala Gly Glu Thr Gln Lys Lys Val Ile Phe Cys Ser Arg Glu  
435 440 445

Lys Val Ser His Leu Gln Lys Gly Lys Ala Pro Ala Val Phe Val Lys  
450 455 460

Cys His Asp Lys Ser Leu Asn Lys Lys Ser Gly  
465 470 475

---

<210> 3

<211> 448

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

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

Leu Gly Tyr Ser Leu Gly Ala His Ala Ala Gly Ile Ala Gly Ser Leu  
 130 135 140

Thr Asn Lys Lys Val Asn Arg Ile Thr Gly Leu Asp Pro Ala Gly Pro  
 145 150 155 160

Asn Phe Glu Tyr Ala Glu Ala Pro Ser Arg Leu Ser Pro Asp Asp Ala  
 165 170 175

Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr Phe Thr Arg Gly Ser Pro Gly Arg  
 180 185 190

Ser Ile Gly Ile Gln Lys Pro Val Gly His Val Asp Ile Tyr Pro Asn  
 195 200 205

Gly Gly Thr Phe Gln Pro Gly Cys Asn Ile Gly Glu Ala Ile Arg Val  
 210 215 220

Ile Ala Glu Arg Gly Leu Gly Asp Val Asp Gln Leu Val Lys Cys Ser  
 225 230 235 240

His Glu Arg Ser Ile His Leu Phe Ile Asp Ser Leu Leu Asn Glu Glu  
 245 250 255

Asn Pro Ser Lys Ala Tyr Arg Cys Ser Ser Lys Glu Ala Phe Glu Lys  
 260 265 270

Gly Leu Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Asn Leu Gly Tyr  
 275 280 285

Glu Ile Asn Lys Val Arg Ala Lys Arg Ser Ser Lys Met Tyr Leu Lys  
 290 295 300

Thr Arg Ser Gln Met Pro Tyr Lys Val Phe His Tyr Gln Val Lys Ile  
 305 310 315 320

His Phe Ser Gly Thr Glu Ser Glu Thr His Thr Asn Gln Ala Phe Glu  
 325 330 335

Ile Ser Leu Tyr Gly Thr Val Ala Glu Ser Glu Asn Ile Pro Phe Thr  
 340 345 350

Leu Pro Glu Val Ser Thr Asn Lys Thr Tyr Ser Phe Leu Ile Tyr Thr  
 355 360 365

Glu Val Asp Ile Gly Glu Leu Leu Met Leu Lys Leu Lys Trp Lys Ser

370						375									380
Asp	Ser	Tyr	Phe	Ser	Trp	Ser	Asp	Trp	Trp	Ser	Ser	Pro	Gly	Phe	Ala
385						390				395					400
Ile	Gln	Lys	Ile	Arg	Val	Lys	Ala	Gly	Glu	Thr	Gln	Lys	Lys	Val	Ile
				405					410					415	
Phe	Cys	Ser	Arg	Glu	Lys	Val	Ser	His	Leu	Gln	Lys	Gly	Lys	Ala	Pro
			420					425					430		
Ala	Val	Phe	Val	Lys	Cys	His	Asp	Lys	Ser	Leu	Asn	Lys	Lys	Ser	Gly
	435						440					445			

<210> 4

<211> 3549

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

ccccctcttcc	tctctctca	gggaaagctg	cccacttcta	gctgcccctgc	cctccccctt	60
aaagggcgac	ttgctcagcg	ccaaaacggg	gctccagccc	tctccagcct	ccggctcagc	120
cggtctcatca	gtgggtccgc	gccttgcagc	tctccagag	ggagcgccc	cgagatggag	180
agcaaagccc	tgctcgtgct	gactctggcc	gtgtggctcc	agagtctgac	cgccctccgc	240
ggaggggtgg	ccgccgccc	ccaaagaaga	gattttatcg	acatcgaaag	taaatttgcc	300
ctaaggaccc	ctgaagacc	agctgaggac	acttgccacc	tcattcccg	agtagcagag	360
tccgtggcta	cctgtcattt	caatcacagc	agcaaacct	tcattggtgat	ccatggctgg	420
acgggtaccg	gaatgtatga	gagttgggtg	ccaaaacttg	tggccgccc	gtacaagaga	480
gaaccagact	ccaatgtcat	tgtggtggac	tggtgtcac	gggctcagga	gcattaccca	540
gtgtccggcg	gctacaccaa	actggtggga	caggatgtgg	ccgggtttat	caaotggatg	600
gaggaggagt	ttaactacc	tctggacaat	gtccatctct	tgggatacag	ccttggagcc	660
catgctgctg	gcattgcagg	aagtctgacc	aataagaaag	tcaacagaat	tactggcctc	720
gctccagctg	gacctaacct	tgagtatgca	gaagcccgga	gtcgtcttcc	tctgatgat	780
gcagattttg	tagacgtctt	acacacattc	accagagggg	cccctggctg	aagcattgga	840
atocagaaac	cagttgggca	tgttgacatt	tacccgaatg	gaggtacttt	tcagccagga	900
tgtaacattg	gagaagctat	ccgctgatt	gcagagagag	gacttgaga	tgtggaccag	960
ctagtgaagt	gtcccaaga	ggctccatt	cctctcttca	tgaactctct	gttgaatgaa	1020
gaaaatccaa	gtaaggccta	cagggtcagt	tccaaggaag	cctttgagaa	agggctctgc	1080

ttgagttgta gaaagaacog ctgcaacaat ctgggctatg agatcaataa agtcagagcc	1140
aaaagaagca gcaaaatgta cctgaagact cgttctcaga tgccctacaa agtcttccat	1200
taccaagtaa agattccatt ttctgggact gagagtgaaa cccatccaa tcaggccctt	1260
gagatttctc tytctggcgc cytggcogag agtgagaaca tcccatccac totgcctgaa	1320
gtttccacaa ataagacctc ctcttctcta atttacacag aggtagatat tggagaacta	1380
ctcatgttga agctcaaatg gaagagtgat tcatacttta gctggtcaga ctgggtggagc	1440
agtcocggct togcattca gaagatcaga gtaaaagcag gagagatca gaaaaaggtg	1500
atctttctgt ctaggagaaa agtgtctcat ttgcagaaag gaaaggccac tgggtattt	1560
gtgaaatgcc atgacaagtc totgaataag aagtcaygc gaaactgggc gaactctacg	1620
aacaaagaac ggcattgtgaa ttctgtgaag aatgaagtgg aggaagtaac ttttacaaa	1680
catacccaat gtttggggtg tttcaaaagt ggattttct gaactattaat ccagcccta	1740
cccttgtag ttattttagg agacagtcct aagcactaaa aagtggctaa ttcaatttat	1800
gggttatagt ggcaaatag cacatccctc aacgttaaaa gacagtggat catgaaaagt	1860
gtgtttttgt ccttgagaa agaaataatt gtttgagcgc agagtataat aaggctcctt	1920
catgtggcgt attgggcct agcctataat tggtagaac ctctatatt aattggaatt	1980
ctggatcttt cggactgag ccttctcaaa ctttactcta agtctccaag aatacagaaa	2040
atgcttttcc ggggcacgaa tcagactcat ctacacagca gtatgaalga tgttttagaa	2100
tgattccctc ttgctatttg aatgtggtcc agacgtcac caggacatg taacttgag	2160
agggacgaag aaagggtctg ataaacacag aggtttttaa cagtccctac cattggcctg	2220
catcatgaca aagttacaaa ttcaaggaga tataaaatct agatcaatta attcttaata	2280
ggctttatcg tttattgctt aatccctctc tccccctct tttttgtctc aagattatat	2340
tataataatg ttctctgggt aggtgttgaa aatgagcctg taatccctcag ctgacacata	2400
atttgaatgg tgcagaaaaa aaaaagatac cgtaatttta ttattagatt ctocaaatga	2460
tttccatcaa tttaaatca ttcaatatct gacagttaact cttcagtttt aggettacct	2520
tggctcatgct tcagttgtac ttccagtgcg tctcttttgt tctggccttt gacatgaaa	2580
gataggtttg agttcaaat ttgcattgtg tgagcttcta cagattttag acsaggaccg	2640
tttttactaa gtaaaagggt ggagaggttc ctgggggtga ttctaagca gtgcttgtaa	2700
accatcgct gcaatgagcc agatggagta ccatgagggt tgttatttgt tgtttttaac	2760
aactaatcaa gagtgaalga acaactattt ataaactaga tctctattt ttcagaatgc	2820
tcttctacgl ataatatga aalgataaay atgtcaata tctcagagyc tatagctggg	2880
aaccogactg tgaagtatg tgatatctga acacatacta gaaagctctg catgtgtgtt	2940

gtccttcagc ataattcggg agggaaaaca gtcgatcaag ggatgtattg gaacatgtcg	3000
gagtagaaat tgttcctgat gtgacagaac ttgcaccott tctctgagag agatgatcgt	3060
gcctataaat agtaggacca atgttgtgat taacatcaic aggccttgga tgaattctct	3120
ctaaaaataa aatgatgtat gatttgttgt tggcatcccc ttattaatt cattaattt	3180
ctggatttgg gttgtgaccc agggcgcatt aacttaaaag attcactaaa gcagcacata	3240
gcaotgggaa ctctggctcc gaaaaacttt gttctatata tcaaggatgt tctggttta	3300
cattttattt attagctgta aatacatgtg tggatgtgta aatggagctt gtacatattg	3360
gaaaggctat tgtggctatc tgcatttata aatgtgtggt gctaactgta tgtgtcttta	3420
tcagtgatgg tctcacagag ccaactcact cttatgaaat ggcctttaac aaaacaagaa	3480
agaaacgtac ttaactgtgt gaagaaatgg aatcagcttt taataaaatt gacaacattt	3540
tattaccac	3549

Lisboa,

## REIVINDICAÇÕES

1. A utilização de uma LPL S447X terapêutica para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de uma condição responsiva à LPL num sujeito, em que a LPL S447X terapêutica é seleccionada do grupo composto por:

a) uma proteína LPL S447X que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO:3 quando optimamente alinhada, e em que a proteína LPL S447X carece de aminoácidos correspondentes aos aminoácidos 447 e 448 da SEQ ID NO:3 quando optimamente alinhados;

b) uma molécula de ácido nucleico isolado que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína LPL S447X tal e como é definida em a); e,

c) um ácido nucleico da LPL S447X que codifica a proteína da LPL S447X como o definido em a); e,

caracterizada por a condição responsiva à LPL ser seleccionado do grupo composto por: deficiência da LPL completa, quilomicronemia, hiperlipidemia, deficiência da LPL parcial, pancreatite, hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia (colesterol HDL baixo), doença cardiovascular, cardiopatia coronária, arteriopatia coronária, arteriosclerose, angina de peito, hipertensão, doença cerebrovascular, restenose coronária, doença periférica vascular, diabetes, caquexia e obesidade.

2. A utilização de uma LPL S447X terapêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por a proteína LPL S447X

ter actividade LPL maior do que uma LPL tipo selvagem da SEQ ID NO:3.

3. A utilização da LPL S447X terapêutica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada por a LPL S447X terapêutica ser o ácido nucleico da LPL S447X, e o ácido nucleico da LPL S447X compreender uma sequência codificante de ADN que codifica um ARN que tem pelo menos 90% de identidade de sequência aos nucleotídeos 256 a 1599 da SEQ ID NO:4.

4. A utilização da LPL S447X terapêutica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada por a LPL S447X terapêutica ser o ácido nucleico da LPL S447X, e o ácido nucleico da LPL S447X compreender uma sequência codificante de ADN que hibridiza em condições severas aos nucleotídeos 256 a 1599 da SEQ ID NO:4.

5. A utilização da LPL S447X terapêutica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada por a LPL S447X terapêutica ser a proteína LPL S447X, em que a LPL S447X tem uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade de sequência com a SEQ ID NO:1.

6. A utilização da LPL S447X terapêutica de acordo com a reivindicação 1, 2, 3 ou 4, caracterizada por a LPL S447X terapêutica ser o ácido nucleico da LPL S447X, e a composição farmacêutica compreender um vector de tratamento genético.

7. A utilização da LPL S447X terapêutica de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por o vector de tratamento genético compreender um vector vírico.

8. A utilização da LPL S447X terapêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizada por o sujeito ser um humano.

9. Uma LPL S447X terapêutica para ser utilizada como uma substância activa farmacêutica, caracterizada por a LPL S447X terapêutica ser seleccionada do grupo composto por:

a) uma proteína LPL S447X que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO:3 quando optimamente alinhada, e em que a proteína LPL S447X carece de aminoácidos correspondentes aos aminoácidos 447 e 448 da SEQ ID NO:3 quando optimamente alinhada;

b) uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína LPL S447X como o definido em a); e,

c) um ácido nucleico da LPL S447X que codifica a proteína LPL S447X como o definido em a).

10. A LPL S447X terapêutica de acordo com a reivindicação 9, caracterizada por a proteína LPL S447X ter actividade LPL maior do que uma LPL tipo selvagem da SEQ ID NO:3.

11. A LPL S447X terapêutica de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizada por a LPL S447X terapêutica ser o ácido nucleico da LPL S447X, e o ácido nucleico da LPL S447X compreender uma sequência codificante de ADN que codifica um ARN que tem pelo menos 90% de identidade de sequência aos nucleotídeos 256 a 1599 da SEQ ID NO:4.

12. A LPL S447X terapêutica de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizada por a LPL S447X terapêutica ser o ácido nucleico da LPL S447X, e o ácido nucleico da LPL S447X compreender uma sequência codificante de ADN que hibridiza sobre condições severas aos nucleotídeos 256 a 1599 da SEQ ID NO:4.

13. A LPL S447X terapêutica de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizada por a LPL S447X terapêutica ser a proteína LPL S447X, em que a proteína LPL S447X tem uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade de sequência com a SEQ ID NO:1.

14. A LPL S447X terapêutica de acordo com a reivindicação 9, 10, 11 ou 12, caracterizada por a LPL S447X terapêutica ser o ácido nucleico da LPL S447X, e a composição farmacêutica compreender um vector de tratamento genético.

15. A LPL S447X terapêutica de acordo com a reivindicação 14, caracterizada por o vector de tratamento genético compreender um vector vírico.

16. Um vector de tratamento genético que compreende um ácido nucleico da LPL S447X que codifica uma proteína LPL S447X que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO:3 quando optimamente alinhada, e caracterizado por a proteína LPL S447X carecer dos aminoácidos correspondentes aos aminoácidos 447 e 448 da SEQ ID NO:3 quando está optimamente alinhada.

17. O vector de tratamento genético de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por a proteína LPL S447X

ter actividade LPL maior do que uma LPL tipo selvagem da SEQ ID NO:3.

18. O vector de tratamento genético de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por o ácido nucleico da LPL S447X compreender uma sequência codificante de ADN que codifica um ARN que tem pelo menos 90% de identidade de sequência aos nucleotídeos 256 a 1599 da SEQ ID NO:4.

19. O vector de tratamento genético de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por o ácido nucleico da LPL S447X compreender uma sequência codificante de ADN que hibridiza sobre condições severas aos nucleotídeos 256 a 1599 da SEQ ID NO:4.

20. O vector de tratamento genético de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por a sequência de aminoácidos ter pelo menos 95% de identidade da sequência à SEQ ID NO:1.

21. O vector de tratamento genético de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por o vector de tratamento genético compreender um vector vírico.

Lisboa,

*Documentos de Pedidos de Patente citados na descrição*

- WO 9527512 A [0004]
- US 5658729 A [0005]
- US 4554101 A [0018]
- US 5166320 A [0058]
- US 4868116 A [0059]
- US 4980286 A [0059]
- WO 8907136 A [0059]
- WO 8902468 A [0059]
- WO 8905345 A [0059]
- WO 9207573 A [0059]
- US 5399346 A, Anderson [0062]
- WO 9505452 A, Baetge [0062]
- EP 44950 A [0080]
- EP 00943499 A [0080]
- EP 99202048 A [0080]

*Literatura citada na descrição que não é Pedido de Patente*

- REYMER et al. *Nat.Genet.*, 1995, vol. 10, 28-33 [0005]
- GAGNÉ et al. *Arterioscl. Thromb.*, 1994, vol. 14 (8), 1250-1257 [0005] [0005]
- HOKANSON *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 1997, vol. 27, 24-34 [0005]
- MATTU et al. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 1994, vol. 14, 1090-1097 [0005]
- KUIVENHOVEN et al. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1997, vol. 17, 595-599 [0005]
- GROENEMEIJER et al. *Circulation*, 1997, vol. 95, 2628-2635 [0005] [0005] [0013]
- FISHER et al. *Atherosclerosis*, 1997, vol. 135, 145-159 [0005]
- GAGNE et al. *Clin. Genet.*, 1999, vol. 55 ( 6), 450-454 [0005] [0013]
- HENDERSON et al. *Journal of Lipid Research*, 1999, vol. 40, 735-43 [0005]

- FISHER et al. *Atherosclerosis*, 1997, vol. 135, 145-59 [0005]
- MURTHY V.; JULIEN P.; GAGNÉ C. Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene *Pharmacol.Ther.*, 1996, vol. 70 (2), 101-135 [0006]
- WION *Science*, 1987, vol. 235 (4796), 1638-1641 [0013] [0013]
- SPARKES et al. *Genomics*, 1987, vol. 1 (2), 138-144 [0013] [0013]
- MATTEI et al. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1993, vol. 63 (1), 45-46 [0013] [0013]
- ZECHNER *Curr. Opin. Lipidol.*, 1997, vol. 8 (2), 77-88 [0013] [0013]
- FISHER et al. *Atherosclerosis*, 1997, vol. 135(2),145-159 [0013] [0013]
- BEISIEGEL *Eur. Heart J.*, 1998, vol. 19, A20-A23 [0013] [0013]
- MONSALVE et al. *J. Clin. Invest.*, 1990, vol. 86 (3),728-734 [0014]
- MA et al. *Genomics*, 1992, vol. 13, 649-653 [0014]
- SMITH; WATERMAN *Adv. Appl. Math*, 1981, vol. 2, 482- [0015]
- NEEDLEMAN; WUNSCH *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443- [0015]
- PEARSON; LIPMAN *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 2444- [0015]
- ALTSCHUL et al. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-10 [0015]
- HENIKOFF; HENIKOFF *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 10915-10919 [0015]
- WESS, G. et al. *Tetrahedron Letters*, 1993, vol. 34, 817-822 [0044]

- WESS, G. et al. *Tetrahedron Letters*, 1992, vol. 33, 195-198 [0044]
- KRAMER, W. et al. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 18598-18604 [0044]
- MOSS, J. Peptide-Based Drug Design: Controlling Transport and Metabolism 1995. [0047]
- BODANSKY, M. Principles of Peptide Synthesis Springer Verlag, 1993. [0048]
- Synthetic Peptides: A User's Guide W. H. Freeman and Company 1992. [0048]
- CLARK-LEWIS, I. DEWALD, B.; LOETSCHER, M.; MOSER, B.; BAGGIOLINI, M. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 16075-16081 [0048]
- GREENE, T. W.; WUTS, P. G. M. Protective Groups in Organic Synthesis John Wiley and Sons, Inc. 1991. [0048]
- HENDERSON et al. *Journal of Clinical Investigation*, 1991, vol. 87, 2005-2011 [0049]
- ZHANG et al. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, vol. 1302, 159-166 [0049]
- GOEDDEL Gene Expression Technology: Methods in Enzymology Academic Press, 1990. 185 [0052] [0053]
- BALDARI et al. *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 229-234 [0053]
- KURJAN; HERSKOWITZ *Cell*, 1982, vol. 30, 933-943 [0053]
- SCHULTZ et al. *Gene*, 1987, vol. 54, 113-123 [0053]
- SMITH et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1983, vol. 3, 2156-2165 [0053]
- LUCKLOW, V. A.; SUMMERS, M. D. *Virology*, 1989, vol. 170, 31-39 [0053]
- SEED, B. *Nature*, 1987, vol. 329, 840 [0053]
- KAUFMAN et al. *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 187-195 [0053]
- SAMBROOK et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989. [0056]

- ACSADI et al. *Nature*, 1991, vol. 332, 815-818 [0058]
- WOLFF et al. *Science*, 1990, vol. 247, 1465-1468 [0058]
- WU, G.; WU, C. H. *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 14621 [0058]
- WILSON. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 963-967 [0058]
- CURIEL *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 8850 [0058]
- CRISTIANO et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2122-2126 [0058]
- MILLER, A. D. *Blood*, 1990, vol. 76, 271 [0059]
- Current Protocols in Molecular Biology Greene Publishing Associates, 1989. [0059]
- EGLITIS et al. *Science*, 1985, vol. 230, 1395-1398 [0059]
- DANOS; MULLIGAN *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 6460-6464 [0059]
- WILSON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 3014-3018 [0059]
- ARMENTANO et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6141-6145 [0059]
- HUBER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 8039-8043 [0059]
- FERRY et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 8377-8381 [0059]
- CHOWDHURY et al. *Science*, 1991, vol. 254, 1802-1805 [0059]
- VAN BEUSECHEM et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 7640-7644 [0059]
- KAY et al. *Human Gene Therapy*, 1992, vol. 3, 641-647 [0059]
- DAI et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 10892-10895 [0059]
- HWU et al. *J. Immunol.*, 1993, vol. 150, 4104-4115 [0059]

- BERKNER et al. *Bio Techniques*, 1988, vol. 6, 616 [0060]
- ROSENFELD et al. *Science*, 1991, vol. 252, 431-434 [0060]
- ROSENFELD et al. *Cell*, 1992, vol. 68, 143-155 [0060]
- LEMARCHAND et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 6482-6486 [0060]
- HERZ; GERARD *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2812-2816 [0060]
- QUANTIN *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 2581-2584 [0060]
- MUZYCZKA et al. *Curr. Topics in Micro. and Immunol.*, 1992, vol. 158, 97-129 [0061]
- FLOTTE et al. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1992, vol. 7, 349-356 [0061]
- SAMULSKI et al. *J. Virol.*, 1989, vol. 63, 3822-3828 [0061]
- MCLAUGHLIN et al. *J. Virol.*, 1989, vol. 62, 1963-1973 [0061]
- TRATSCHIN et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 3251-3260 [0061]
- HERMONAT et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6466-6470 [0061]
- TRATSCHIN et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 4, 2072-2081 [0061]
- WONDISFORD et al. *Mol. Endocrinol.*, 1988, vol. 2, 32-39 [0061]
- TRATSCHIN et al. *J. Virol.*, 1984, vol. 51, 611-619 [0061]
- FLOTTE et al. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 3781-3790 [0061]
- CLAPP, D. W. et al. *Blood*, 1991, vol. 78, 1132-1139 [0062]
- ANDERSON *Science*, 2000, vol. 288, 627-9 [0062]

- CAVAZZANA-CALVO et al. *Science*, 2000, vol. 288, 669-72 [0062]
- COLEMAN et al. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, vol. 270 (21), 12518-12525 [0068] [0078]
- JUKEMA et al. *Circulation*, 1995, vol. 91, 2528-2540 [0073]

## LPL S447X peptídeo 1-446:

```
          adq rrdfidiesk falrtpedta edtchlipgv 33
aevatchfn hsktftmvih gwtvtgmyes wvplkvaaly krepsdnviv vdwlrsraeh 93
ypvsagytkl vggdvarfin wmeefnypl dnvhllygysl gahaagiags ltnkkvnrit 153
gldpagpnfe yaeapsrlsp ddadfdvdlh tftrgspgrs igiqkpvghv diypnggtfq 213
pgcnigeair viaerglgdv dqlvkcsheh sihlfidsl1 neenpskayr csskeafekg 273
lciscrknrc nnlgyeinkv rakrsskmyl ktrsqmpykf fhyqvkihfs gtesethtnq 333
afeislygtv aesenipftl pevstnktys fliytevdig ellmlklkwk sdsyfswsdw 393
wsspgfaiqk irvkaetqk kvifcsrekv shlqkgkapa vfvkchdksl nkk 446
```

Figura 1

## LPL madura peptídeo 1-446:

```
          adq rrdfidiesk falrtpedta edtchlipgv 33
aevatchfn hssktfmvih gwtvtgmyes wvpklvaaly krepdsnviw vdwlrsraqeh 93
ypvsagytkl vggdvarfin wmeefnypl dnvhlhgysl gahaagiags ltnkkvnrit 153
gldpagpnfe yaeapsrlsp ddadfdvdlh tftrgspgrs igiqkpvghv diypnggtfq 213
pgcnigeair viaerglgdv dqlvkcsheh sihlfidsl1 neenpskayr csskeafekg 273
lclscrknrc nnlgyeinkv rakrsskmyl ktrsqmipyv fhyqvkihfs gtesethtnq 333
afeislygtv aesenipftl pevstnktys fliytevdig ellmlklkwk sdsyfswsdw 393
wsspgfaiqk irvkagetqk kvifcsrekv shlqkgkapa vfvkchdksl nkksg      448
```

Figura 2

Peptídeo pré-LPL: Peptídeo sinal 1-27 (no quadro) e peptídeo maduro 28-475:

```
1 meskallvlt lavwlqslta srggvaaadq rrdfidiesk falrtpecta edtchlipgv
61 aesvatchfn hssktfmvih gwtvtgmyes wvplvaaly krepsdnvfv vdwlsraqeh
121 ypvsgaytkl vgqddvarfin wmeefnypl dnvhllygysl gahaagiags ltnkkvnrit
181 gldpagpnfe yaeapsrlsp ddadfdvdlh tftgrgspgrs igiqkpvghv diypnggtfq
241 pgcnigeair viaerglgdv dqlvkcsheh sihlfidsl1 neenpskayr csskeafekg
301 lclscrknrc nnlgyeinkv rakrsskmyl ktrsqmpykv fhyqvkihfs gtesethtnq
361 afeislygtv aesenipftl pevstnktys fliytevdig ellmlklkwk sdsyfswsdw
421 wsspgfaiqk irvkagetqk kvifcsrekv shlqkgkapa vfvkchdksl nkksq
```

Figura 3

## ARNm da LPL

```

1 cccctcttcc tctctctcaa gggaaagctg cccacttcta gctgccctgc catccccctt
61 aaagggcgac ttgctcagcg ccaaaccgcg gctccagccc tctccagcct ccggctcagc
121 cggtcatca gtgggtccgc gccttgacgc tctccagag ggacgcgcc cgagatggag
181 agcaaagccc tgctcgtgct gactctggcc gtgtggctcc agagtctgac cgcctccgc
241 ggaggggtgg ccgccccga ccaaagaaga gattttatcg acatcgaaag taaatttgcc
301 ctaaggaccc ctgaagacac agctgaggac acttgccacc tcattcccg agtagcagag
361 tccgtggeta cctgtcattt caatcacagc agcaaaacct tcatggtgat ccatggtgg
421 acggtaacag gaatgtatga gagtgggtg ccaaaacttg tggccgccct gtacaagaga
481 gaaccagact ccaatgtcat tgtggtggac tggctgtcac gggctcagga gcattacca
541 gtgtccggcg gctacaccaa actggtggga caggatgtgg ccgggtttat caactggatg
601 gaggaggagt ttaactaccc tctggacaat gtccatctct tgggatacac cctggagcc
661 catgtcgtcg gcattgcagg aagtctgacc aataagaaag tcaacagaat tactggcctc
721 gatccagctg gacctaaact tgagtatgca gaagccccga gtcgtctttc tctgatgat
781 gcagattttg tagactctt acacacattc accagagggg ccctggctcg aagcattgga
841 atccagaaac cagttgggca tgttgacatt taccgaatg gaggtacttt tcagccagga
901 tgtaacattg gagaagctat ccgctgatt gcagagagag gacttggaga tgtggaccag
961 ctagtgaagt gctccacga gcgtccatt catctcttca tcgactctct gttgaatgaa
1021 gaaaatccaa gtaaggccta caggtgcagt tccaaggaa cctttgagaa agggctctgc
1081 ttgagtgtga gaaagaaccg ctgcaacaat ctgggctatg agatcaataa agtcagagcc
1141 aaaagaagca gcaaaatgta cctgaagact cgttctcaga tgccctacaa agtcttccat
1201 tacciaagta agattcattt ttctgggact gagagtgaag ccataccaa tcaggccttt
1261 gtagttcttc tgtatggcac cgtggccgag agtgagaaca tccattcaca tctgctgaa
1321 gtttccacaa ataagaccta ctcttctcta atttacacag aggtagatat tggagaacta
1381 ctcatgttga agctcaaatg gaagagtgat tcatacttta gctggtcaga ctggtggagc
1441 agtcccggtc tcgccattca gaagatcaga gtaaaagcag gagagactca gaaaagggtg
1501 atcttctgtt ctaggagaa agtgtctcat ttgcagaaag gaaaggcacc tgcggtattt
1561 gtgaaatgcc atgacaagtc tctgaataag aagtcaggct gaaactgggc gaactctacg
1621 aacaaagaac ggcattgtga ttctgtgaag aatgaagtgg aggaagtaac tttacaaaa
1681 cataccaggt gtttgggtg tttcaaaagt ggattttcct gaatattaat cccagcccta
1741 cccttgttag ttattttagg agacagtctc aagcactaaa aagtggctaa ttcaatttat
1801 ggggtatagt ggccaaatag cacatcctcc aacgttaaaa gacagtggat catgaaaagt
1861 gctgttttgt cctttgagaa agaaataatt gtttgagcgc agagtaaaat aaggctcctt
1921 catgtggcgt attgggcat agcctataat tggttagaac ctctattttt aattggaatt
1981 ctggatcttt cggactgagg cttctcaaaa ctttactcta agtctccaag aatacagaaa
2041 atgcttttcc gcggcacgaa tcagactcat ctacacagca gtatgaatga tgttttagaa
2101 tgattccctc ttgctattgg aatgtggctc agacgtcaac caggaacatg taacttgag
2161 agggacgaag aaagggctcg ataaacacag aggttttaaa cagtccctac cattggcctg
2221 catcatgaca aagttacaaa ttcaaggaga tataaatct agatcaatta attcttaata
2281 ggctttatcg tttattgctt aatccctctc tccccctct tttttgtctc aagattatat
2341 tataataatg ttctctgggt aggtgttgaa aatgagcctg taatcctcag ctgacacata
2401 atttgaatgg tgcagaaaaa aaaaagatac cgtaatttta ttattagatt ctccaaatga
2461 ttttcatcaa tttaaaatca ttcaatatct gacagttact cttcagtttt aggttacct
2521 tggctatgct tcagttgtac ttccagtgcg tctcttttgt tcttggtttt gacatgaaaa
2581 gataggtttg agttcaaatt ttgcattgtg tgagcttcta cagattttag acaaggaccg
2641 tttttactaa gtaaaagggt ggagaggttc ctgggtgga ttctaagca gtgcttgtaa
2701 accatcgctg caatgagcc agatggagta ccatgagggt tgttatttgt tgttttaac
2761 aactaatcaa gagtgaatga acaactattt ataaactaga tctctattt ttcagaatgc
2821 tcttctacgt ataaatatga aatgataaag atgtcaataa tctcagaggc tatagctggg
2881 aaccgactg tgaaagtatg tgatatctga acacatacta gaaagctctg catgtgtgtt
2941 gtccttcagc ataattcgga agggaaaaca gtcgatcaag ggatgtattg gaacatgtcg
3001 gagtagaaat tgttctctgat gtgccagaac ttcgaccctt tctctgagag agatgatcgt
3061 gcctataaat agtaggacca atgtgtgat taacatcacc aggttgga tgaattctct

```

Figura 4

```

3121 ctaaaaataa aatgatgtat gatttggtgt tggcatcccc tttattaatt cattaaattt
3181 ctggatttgg gttgtgaccc aggggtgcatt aacttaaaaag attcactaaa gcagcacata
3241 gcactgggaa ctctggctcc gaaaaacttt gttatatata tcaaggatgt tctggcttta
3301 ctttttattt attagctgta aatacatgtg tggatgtgta aatggagctt gtacatatg
3361 gaaaggatcat tgtggctatc tgcatttata aatgtgtggt gctaactgta tgtgtcttta
3421 tcagtgatgg tctcacagag ccaactcact cttatgaaat gggctttaac aaaacaagaa
3481 agaaacgtac ttaactgtgt gaagaaatgg aatcagcttt taataaaatt gacaacattt
3541 tattaccac

```

Figura 4 Continuação