

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 841**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2011** **PCT/US2011/028233**
87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011** **WO11113027**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2011** **E 11754231 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017** **EP 2545080**

54 Título: **Proteínas de fusión NPP1**

30 Prioridad:

12.03.2010 US 340066 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.08.2017

73 Titular/es:

ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
100 College Street
New Haven, CT 06510 , US

72 Inventor/es:

QUINN, ANTHONY;
HARVEY, ALEX J. y
XIA, ZHINAN

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 628 841 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión NPP1

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5

[0001] La ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 (NPP1/ENPP1/PC-1) es una glicoproteína transmembrana de tipo II que forma un homodímero. La proteína escinde una variedad de sustratos, incluyendo enlaces fosfodiéster de nucleótidos y azúcares de nucleótidos y enlaces pirofosfato de nucleótidos y azúcares de nucleótidos. La proteína NPP1 funciona para hidrolizar el nucleósido-5'-trifosfato en cualquiera de los monofosfatos correspondientes, y también hidroliza polifosfatos diadenosina. Las mutaciones en el gen de NPP1 se han asociado a la calcificación arterial idiopática infantil (CAII), resistencia a la insulina, raquitismo hipofosfatémico y osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna vertebral.

[0002] CAII, una enfermedad recesiva autosómica rara y casi siempre un trastorno mortal, se caracteriza por la calcificación de la lámina elástica interna de las arterias musculares y estenosis debida a la proliferación miointima. Existen más de 160 casos de CAII que se han notificado en todo el mundo. Los síntomas de la enfermedad suelen aparecer en la primera infancia, y la enfermedad es letal a los 6 meses de edad, en general debido a la cardiomiopatía isquémica y otras complicaciones de la arteriopatía obstructiva incluyendo estenosis de la arteria renal. En más de una docena de casos notificados de CAII, también se desarrollaron en la infancia calcificaciones periarticulares de las grandes articulaciones. Rutsch y col. (2003) notificaron que las mutaciones en ENPP1 se asocian a CAII caracterizada por las calcificaciones periarticulares y aórticas espontáneas en la vida temprana y la reducción sistémica de la actividad nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa en los individuos afectados.

[0003] Johnson y col. (Journal of Bone and Mineral Research, 2003, 13(6): 994-1004) notifican que la deficiencia extracelular de PPI promovió la deficiencia de osteopontina (OPN) y que la corrección de la deficiencia de OPN previene la hipercalcificación. Este documento no contiene enseñanza alguna para utilizar moléculas de NPP1 u OPN terapéuticamente solubles, y no hace referencia alguna en lo que respecta a las formas de NPP1 a las que se orienta selectivamente.

30

[0004] Millán y col. (Journal of Bone and Mineral Research, 2008, 23(6): 777-787) describen una terapia de reemplazo enzimático en ratones *Akp2^{-/-}*, en la que una forma de la fosfatasa alcalina humana (TNALP) recombinante orientada selectivamente al hueso se expresa y se utiliza para prevenir la hipofosfatasa murina. Este documento no hace referencia en cuanto a la actividad u orientación selectiva de las proteínas de fusión NPP1.

35

[0005] Aunque los defectos en la proteína NPP1 se han implicado en tales enfermedades graves como CAII, no existe un tratamiento disponible en la técnica para aquellos que están afectados por la enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad imperiosa de una composición, formulación y medicamento eficaces y seguros para el tratamiento de la CAII, resistencia a la insulina, raquitismo hipofosfatémico y osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna vertebral.

40

RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] La presente invención se presenta en las reivindicaciones anexas y se describe en lo sucesivo.

45

[0007] La presente descripción se dirige en general a proteínas de fusión de dominios truncados de NPP1 (es decir, un componente de NPP1) fusionados a una fracción diana. La fracción diana funciona para potenciar la eficiencia en la orientación selectiva de la proteína de fusión NPP1 a un sitio de importancia clínica o biológica (por ejemplo, sitio de la calcificación en un sujeto que necesita reducir la calcificación). Sin desear limitar la invención a teoría alguna o mecanismo de operación particular, se cree que la función del componente de NPP1 inhibe la calcificación al potenciar la formación de pirofosfato (PPI) y/o al escindir pirofosfato para producir fosfato soluble (Pi) y/o al aumentar la disponibilidad de adenosín monofosfato (AMP) y/o adenosina. Se contempla que la fracción diana puede fijarse al extremo N-terminal y/o al extremo C-terminal del componente de NPP1 en cualquier posición útil. Adicionalmente, la proteína de fusión NPP1 descrita en esta invención también puede incluir uno o más de un fragmento Fc, PEG, enlazador polipeptídico u otros polipéptidos adicionales para potenciar la actividad, estabilidad u orientación selectiva enzimática.

50

[0008] Las proteínas de fusión de la presente descripción pueden utilizarse para tratar una amplia variedad de afecciones en un sujeto. Cualquier afección que puede tratarse de forma beneficiosa por la administración de una

proteína de fusión como se describe en esta invención se incluye dentro del alcance de la descripción. Por ejemplo, el tratamiento de afecciones que pueden mejorarse mediante la reducción y/o eliminación de una o más estructuras de calcificación y/o la prevención de las estructuras de calcificación de la formación en un sujeto, tal como un mamífero, por ejemplo, un paciente humano, está dentro del alcance de la descripción. Las afecciones, tales como obstrucción arterial, se contemplan para el tratamiento mediante el empleo de proteínas de fusión de la descripción. En un caso particularmente útil, la afección a tratar se generaliza como la calcificación arterial de la infancia, también referida como calcificación arterial idiopática de la infancia y calcificación arterial de la media de la infancia. Asimismo, se contemplan afecciones, tales como resistencia a la insulina, raquitismo hipofosfatémico y osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna vertebral para el tratamiento.

[0009] Las proteínas de fusión de la descripción pueden producirse en cualquier sistema útil de expresión de proteínas, incluyendo, sin limitación, cultivo celular (por ejemplo, células CHO, células COS, células HEK203), bacterias tales como *Escherichia coli* (*E. coli*) y animales transgénicos, incluyendo, entre otros, mamíferos y aves (por ejemplo, pollos, codornices, patos y pavos).

[0010] La fabricación de composiciones farmacéuticas (o formulaciones farmacéuticas) es bien conocida en la materia y tales composiciones farmacéuticas se contemplan para su uso de acuerdo con proteínas de fusión de la descripción.

[0011] En general, la dosificación de proteínas de fusión administrada a un sujeto variará en función de factores conocidos, tales como la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, la frecuencia del tratamiento y similares. Por lo general, una dosificación de principio activo (es decir, proteína de fusión) puede comprenderse entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 50 miligramos por kilogramo de peso corporal. La dosificación precisa, la frecuencia de administración y el lapso de tiempo del tratamiento pueden determinarse por un médico experto en la materia de administración de proteínas terapéuticas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0012]

La **Figura 1** ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína NPP1 de tipo natural. Las regiones citosólicas y transmembrana están subrayadas. Los sitios potenciales de N-glicosilación están en negrita. PSCAKE en cursiva es el inicio de NPP1 soluble que incluye la región rica en cisteína.

La **Figura 2** ilustra la secuencia de aminoácidos del dominio o dominios catalíticos de la proteína NPP1 que no tiene una fracción diana unida ("sssNPP1").

La **Figura 3** ilustra la secuencia de aminoácidos de TAGsssNPP1. La fracción diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos se fusiona al extremo N-terminal de sssNPP1. El péptido señal está subrayado y la fracción diana se indica en negrita.

La **Figura 4** ilustra la secuencia de aminoácidos de TAGsssNPP1 que contiene la fracción diana de diez residuos de ácido aspártico consecutivos fusionados al extremo C-terminal de sssNPP1. El péptido señal está subrayado y la fracción diana se indica en negrita.

La **Figura 5** ilustra la secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión TAGssNPP1. La fracción diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos se fusiona al extremo N-terminal de ssNPP1.

La **Figura 6** ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión TAGssNPP1. La fracción diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos se fusiona al extremo N-terminal de ssNPP1. El péptido señal está subrayado y la fracción diana se indica en negrita.

La **Figura 7** ilustra la secuencia de ácido nucleico de ssNPP1.

La **Figura 8** ilustra la secuencia de aminoácidos de ssNPP1. El péptido señal está subrayado.

La **Figura 9** ilustra la secuencia de ácido nucleico de sNPP1.

La **Figura 10** ilustra la secuencia de aminoácidos de sNPP1. El péptido señal está subrayado.

La **Figura 11** ilustra la secuencia de ácido nucleico de TAGsNPP1. La fracción diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos se fusiona al extremo N-terminal de sNPP1.

La **Figura 12** ilustra la secuencia de aminoácidos de TAGsNPP1. La fracción diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos se fusiona al extremo N-terminal de ssNPP1. El péptido señal está subrayado y la fracción diana se indica en negrita.

La **Figura 13** ilustra la secuencia de ácido nucleico de TAGsNPP1. La fracción diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos se fusiona al extremo C-terminal de sNPP1.

La **Figura 14** ilustra la secuencia de aminoácidos de TAGsNPP1. La fracción diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos se fusiona al extremo N-terminal de sNPP1. El péptido señal está subrayado y la fracción

diana se indica en negrita.

La **Figura 15** ilustra la secuencia de aminoácidos de un péptido enlazador.

La **Figura 16** ilustra la secuencia de aminoácidos de un segmento Fc de inmunoglobulina.

La **Figura 17** ilustra la secuencia de aminoácidos de TAGsssNPP1 que contiene la fracción diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos fusionados al extremo N-terminal de sssNPP1 por un enlazador peptídico. El segmento Fc se fusiona al extremo N-terminal de la fracción diana. El péptido señal está subrayado y la fracción diana se indica en negrita. El enlazador peptídico está en cursiva.

La **Figura 18** ilustra la secuencia de aminoácidos de TAGsssNPP1 que contiene la fracción diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos fusionados al extremo C-terminal de sssNPP1 por un enlazador peptídico. El segmento Fc se fusiona al extremo N-terminal de sssNPP1. El péptido señal está subrayado y la fracción diana se indica en negrita. El enlazador peptídico está en cursiva.

La **Figura 19** es una representación esquemática de un vector de expresión (es decir, pTT22) que contiene una construcción de TAGsNPP1. La fracción diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos se fusiona al extremo C-terminal de sNPP1.

La **Figura 20** ilustra el análisis por membrana Western de TAGsNPP1. R, condición reductora; NR, condición no reductora.

La **Figura 21** demuestra la actividad enzimática de TAGsNPP1 producida y aislada a partir de células HEK293.

Las **Figuras 22A-22C** ilustran esquemas de construcciones de proteínas de fusión TAGNPP1 descritas en esta invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0013] La presente descripción proporciona proteínas de fusión NPP1 innovadoras humanas que son solubles y contienen dominio o dominios truncados y biológicamente activos de NPP1 (es decir, componentes de NPP1 que contienen al menos un dominio catalítico extracelular de NPP1 de origen natural para la actividad pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa) y una o más fracciones diana (es decir, "TAG"). Las proteínas de fusión NPP1 de la presente descripción comprenden al menos el dominio NPP1 esencial para llevar a cabo la actividad pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa. Por consiguiente, la descripción presenta proteínas de fusión aisladas que comprenden los residuos de aminoácidos A205 a L591 de la SEC. ID. N.º 1 fusionados a una o más fracciones diana. La fracción diana puede fusionarse de manera recombinante o unirse químicamente (por ejemplo, enlace covalente, enlace iónico, enlace hidrófobo y fuerza de Van der Waals) al componente de NPP1 por procedimientos bien conocidos en la materia y dirigir el componente de NPP1 a un determinado sitio diana en el que el componente de NPP1 adjunto tendrá un efecto deseable (por ejemplo, catálisis de una reacción, tal como la solubilización de un sustrato, tal como PPi o prevención de la formación de un sustrato, tal como PPi) en un sujeto al que se administra la proteína de fusión de la presente descripción.

TAGNPP1s

[0014] Todas las proteínas de fusión NPP1 ("TAGNPP1s") de la presente descripción tienen el dominio N-terminal citosólico y el dominio transmembrana de la NPP1 humana de origen natural eliminados. Opcionalmente, las proteínas de fusión TAGNPP1s de la presente descripción también pueden contener un truncamiento C-terminal de NPP1 de tipo natural en varias longitudes. La secuencia de aminoácidos de NPP1 de longitud completa de tipo natural se expone en la SEC. ID. N.º 1.

[0015] La proteína de fusión de la presente invención es una proteína de fusión que comprende un componente de NPP1 fusionado a una fracción diana, en la que el componente de NPP1 es una NPP1 truncada que comprende la región rica en cisteína y un dominio catalítico que tiene una actividad pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa pero cuyo dominio N-terminal citosólico y el dominio transmembrana se han eliminado, en la que la fracción diana es capaz de potenciar la orientación selectiva de la proteína de fusión a un sitio de calcificación, y en la que dicha fracción diana se fusiona al extremo C-terminal del componente de NPP1.

[0016] En un caso, la proteína de fusión contiene un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos A205 a L591 de la SEC. ID. N.º 1 ("sssNPP1") fusionados a TAG en el extremo N- o C-terminal del polipéptido ("TAGsssNPP1"). En un caso, la proteína de fusión comprende un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos A205 a D925 de la SEC. ID. N.º 1 ("ssNPP1") fusionados a TAG en el extremo N- o C-terminal ("TAGssNPP1"). En un caso, la proteína de fusión comprende un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos A205 a D925 de la SEC. ID. N.º 1 ("sNPP1") fusionados a TAG en el extremo C-terminal del polipéptido. Asimismo, en esta invención se describe cualquier fragmento consecutivo de sNPP1 que comprende al menos los residuos de aminoácidos A205 a L591 de la SEC. ID. N.º 1 y el fragmento polipeptídico se fusiona a TAG

en el extremo N- o C-terminal.

[0017] Cuando se expresa en un cultivo celular o en un animal transgénico, las proteínas de fusión TAGNPP1 pueden comprender además un péptido señal (o una secuencia líder) en su extremo N-terminal. El péptido señal co-traduccionally o post-traduccionally dirige el transporte de las proteínas de fusión TAGNPP1 a través de los orgánulos subcelulares de la célula que expresa las proteínas de fusión TAGNPP1 y, determina así la modificación post-traduccionally de las proteínas de fusión TAGNPP1. Queda entendido que debido a que el péptido señal se escinde en la etapa co-traduccionally o post-traduccionally de la proteína de fusión, las proteínas de fusión TAGNPP1 carecen generalmente del péptido señal cuando se secretan y aíslan. Por consiguiente, se describen en los casos en los que se dirigen a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión TAGNPP1, también se contemplan las secuencias líder como se utiliza en la presente descripción. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC. ID. N.º 2 contiene un ejemplo de la secuencia líder para TAGNPP1 en su extremo 5'.

[0018] Cada una de las proteínas de fusión descritas en esta invención se contempla con una o más fracciones diana ("TAG"). El componente de TAG de acuerdo con la presente descripción comprende cuatro o más aminoácidos cargados negativamente, tales como ácido aspártico y ácido glutámico. El componente de TAG puede ser una extensión de residuos de aminoácidos cargados negativamente, por ejemplo, ácidos aspártico y/o ácidos glutámico que se comprenden entre aproximadamente 4 y aproximadamente 20 residuos de aminoácidos de longitud. El TAG puede fusionarse al extremo N- o C-terminal del componente de NPP1. El TAG también puede fusionarse a ambos extremos N- y C-terminales del componente de NPP1. Por consiguiente, la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión TAGsNPP1, por ejemplo, incluye PSCAKE al extremo C-terminal del componente de NPP1 y una o más fracciones diana (por ejemplo, etiqueta de ácido poliglutámico o etiqueta de ácido poliaspártico) en los extremos N- y/o C-terminal del componente de NPP1. La proteína de fusión que comprende el componente de NPP1 que tiene TAG fusionado al extremo C-terminal es un caso particularmente útil. En un caso muy específico, TAG que tiene una extensión de ocho ácidos aspárticos se emplea como puede apreciarse en las secuencias ejemplares para TAGsNPP1 y TAGssNPP1 en las Figuras, aunque se puede utilizar cualquier número útil de residuos de aminoácidos cargados negativamente (por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, o 18). El componente de TAG se indica como "A" en las Figuras.

[0019] La descripción también abarca polinucleótidos que codifican diversas proteínas de fusión TAGNPP1 descritas en esta invención. Por consiguiente, cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de cualquier proteína de fusión TAGNPP1 se puede utilizar para generar moléculas recombinantes que expresan la proteína de fusión TAGNPP1 correspondiente. En un caso particular, la descripción abarca el polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC. ID. N.º 2 como se muestra en la Fig. 2.

[0020] En ciertos casos específicos, la proteína de fusión comprende múltiples polipéptidos como se describe en esta invención, o comprende al menos un polipéptido como se describe en esta invención y una secuencia no relacionada. Un determinado polipéptido preferente puede, por ejemplo, ayudar en la dimerización y la estabilidad o minimizar la agregación de las proteínas de fusión. Por ejemplo, el polipéptido adicional puede ser la región Fc de la inmunoglobulina G1 para aumentar la estabilidad en suero. El uso del segmento Fc es bien conocido en la materia y se describe en la patente de Estados Unidos n.º 7.902.151 y en la patente de Estados Unidos n.º 7.858.297. La región rica en cisteína de NPP1 de tipo natural (es decir, PSCAKE a NEPQCP; la secuencia de aminoácidos de P99 a P204 de la SEC. ID. N.º 1) se puede emplear para facilitar la dimerización de las proteínas de fusión TAGNPP1.

[0021] En otro caso, el polietilenglicol (PEG) se pueden conjugar con las proteínas de fusión TAGNPP1. Otros polipéptidos pueden seleccionarse a efectos de minimizar la agregación y la inmunogenicidad para aumentar la solubilidad de la proteína o para permitir que la proteína se oriente selectivamente a los sitios deseados de importancia clínica o biológica.

[0022] TAGNPP1 puede también fusionarse o conjugarse con un enlazador polipeptídico apropiado u otra secuencia para facilitar su identificación, síntesis, o purificación de la proteína de fusión o para preservar mejor la estructura nativa del componente de NPP1 que puede potenciar la actividad y la orientación selectiva de TAGNPP1. Específicamente, una secuencia enlazadora peptídica puede emplearse para separar el primer y el segundo componentes polipeptídicos por una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliegue en sus estructuras secundaria y terciaria. Dicha secuencia enlazadora peptídica se incorpora en la proteína de fusión entre el componente de NPP1 y el componente de TAG utilizando técnicas estándares bien conocidas en la materia. Las secuencias enlazadoras peptídicas adecuadas pueden elegirse basándose en su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible y su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que podría interactuar con

la porción funcional en NPP1, TAG u otros polipéptidos secundarios descritos en esta invención (por ejemplo, Fc). Las secuencias enlazadoras peptídicas preferentes contienen residuos de Gly, His, Asn y Ser. Los enlazadores peptídicos útiles incluyen, sin limitación, poli-Gly, poli-His, poli-Asn o poli-Ser. Otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala también se pueden utilizar en la secuencia enlazadora. Las secuencias de aminoácidos que se pueden emplear de forma útil como enlazadores incluyen las descritas en Maratea y col, Gene 40:39-46, 1985; Murphy y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 83:8258-8262, 1986; patente de Estados Unidos n.º 4.935.233 y patente de Estados Unidos n.º 4.751.180. La secuencia enlazadora puede comprender de 1 a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos de longitud. Preferentemente, el enlazador polipeptídico comprende entre aproximadamente 8 y aproximadamente 12 aminoácidos de longitud. En un caso preferente, el enlazador peptídico utilizado en la invención es GGGGSGGGGS (SEC. ID. N.º 15), aunque se puede emplear cualquier combinación funcional de Gly, Ser, His o Asn.

[0023] Las proteínas de fusión también pueden comprender TAGNPP1 de la presente descripción junto con un polipéptido no relacionado. Preferentemente, el polipéptido no relacionado es capaz de potenciar la orientación selectiva de la proteína de fusión al sitio de importancia clínica o biológica (por ejemplo, sitio de calcificación). Por ejemplo, los péptidos que tienen una elevada afinidad al hueso se describen en la patente de Estados Unidos n.º 7.323.542.

[0024] TAGNPP1 se puede preparar utilizando procedimientos estándares, incluyendo técnicas recombinantes o conjugación química bien conocidas en la materia. Las técnicas útiles para el aislamiento y la caracterización de los ácidos nucleicos y proteínas de la presente descripción son bien conocidas por los expertos en la materia y la biología molecular estándar y pueden consultarse los manuales de bioquímica para seleccionar protocolos adecuados para su uso sin experimentación indebida. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor. Brevemente, las secuencias de ADN que codifican los componentes polipeptídicos pueden ensamblarse por separado y ligarse a un vector de expresión apropiado. Por ejemplo, el extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica el componente NPP1 se liga, con o sin un enlazador peptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente polipeptídico, tal como TAG PEG, o Fc de modo que los marcos de lectura de las secuencias están en fase. Esto permite la traducción en una única proteína de fusión que retiene la actividad biológica de ambos polipéptidos componentes. Las secuencias de ADN ligadas se vinculan operativamente a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados incluyendo un promotor. Los elementos reguladores responsables de la expresión de ADN se localizan sólo en 5' en la secuencia de ADN que codifica el primer polipéptido, tal como la secuencia líder que codifica un péptido señal. De manera similar, los codones de terminación requeridos para finalizar las señales de terminación de la traducción y de la transcripción sólo están presentes en 3' en la secuencia de ADN que codifica el segundo polipéptido.

[0025] La presente descripción también abarca variantes de TAGNPP1. Una variante de TAGNPP1 preferente es una que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de 80 %, 85 %, 90 %, 95 % y más preferentemente 96 % con respecto a la secuencia de aminoácidos A205 a L591 de la SEC. ID. N.º 1. Una variante de TAGNPP1 más preferente es una que tiene identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 97 % con respecto a la secuencia de aminoácidos A205 a L591 de la SEC. ID. N.º 1.

[0026] La descripción también se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende el complemento de la SEC. ID. N.º 2 o variantes de la misma. Además, la presente descripción también cuenta con secuencias polinucleotídicas que se hibridan en condiciones rigurosas a la SEC. ID. N.º 2 y cuya secuencia antisentido es 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la SEC. ID. N.º 2. Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (Tf) del ácido nucleico unido a un complejo o sonda, como se enseña en Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987; Methods Enzymol. 152:399-407) y Kimmel, A. R. (1987; Methods Enzymol. 152:507-511), y se puede utilizar en una rigurosidad definida.

[0027] La descripción contempla adicionalmente secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos peptídicos (ANP), fragmentos, porciones o moléculas antisentido de los mismos.

[0028] Aunque las secuencias nucleotídicas que codifican TAGNPP1 y sus variantes son preferentemente capaces de hibridarse a la secuencia nucleotídica de TAGNPP1 en condiciones de rigurosidad apropiadamente seleccionadas, puede resultar ventajoso producir secuencias nucleotídicas que codifican TAGNPP1 o sus derivados que poseen un uso de codón sustancialmente diferente. Los codones se pueden seleccionar para aumentar la tasa a la que la expresión del péptido se produce en un huésped procariota o eucariota particular de acuerdo con la frecuencia con la que los codones particulares son utilizados por el huésped. Otras razones para alterar

sustancialmente la secuencia de nucleótidos que codifica TAGNPP1 y sus derivados sin alterar las secuencias de aminoácidos codificadas incluyen la producción de transcritos de ARN que tienen propiedades más deseables, tales como una mayor semivida.

- 5 **[0029]** Las secuencias alteradas de ácido nucleico que codifican TAGNPP1 abarcadas por la descripción incluyen delecciones, inserciones, o sustituciones de diferentes nucleótidos que resultan en un polinucleótido que codifica el mismo o un equivalente funcional de TAGNPP1. La proteína codificada también puede contener delecciones, inserciones, o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y resultan en un equivalente funcional de TAGNPP1. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos pueden efectuarse sobre la
- 10 base de similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos, siempre que se retenga la actividad biológica de TAGNPP1. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos cargados positivamente incluyen Lys y Arg; los residuos de aminoácidos cargados negativamente incluyen Asp y Glu; y los aminoácidos con grupos principales polares no cargados que tienen hidrofiliidad similar pueden incluir Leu, Ile, y Val; Gly y Ala; Asp y Gln; Ser y Thr; Phe y Tyr.

15 Vector de expresión

- [0030]** Los procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la materia se pueden utilizar para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican TAGNPP1 y elementos de control
- 20 transcripcionales y traduccionales apropiados. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas, y recombinación genética in vivo. Tales técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook, J. y col. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y., y Ausubel, F. M. y col. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y..

- 25 **[0031]** Una variedad de sistemas de vector de expresión /huésped puede utilizarse para contener y expresar secuencias que codifican TAGNPP1. Estos incluyen, entre otros, microorganismos, tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN bacteriófagos recombinantes, plasmídicos, o cósmidos; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insecto infectados por vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus) o por vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o
- 30 pBR322); o sistemas de células animales (por ejemplo, vector pTT22).

- [0032]** Los elementos de control o secuencias reguladoras pueden incluir aquellas regiones no traducidas de vector-potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3' que interactúan con proteínas celulares del huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Tales elementos pueden variar en su fuerza y especificidad.
- 35 Dependiendo del sistema de vector y huésped utilizados, se puede utilizar cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo, promotores específicos del tejido, promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden utilizarse promotores inducibles, tales como el promotor lacZ híbrido del fagomidio Bluescript™ (Stratagene, LaJolla, California) o plásmido pSport1™ (Gibco BRL) y similares. En los sistemas de células de mamíferos, se prefieren promotores de genes de mamífero o
- 40 de virus de mamíferos. Si es necesario generar una estirpe celular que contenga múltiples copias de una secuencia que codifica TAGNPP1, se pueden utilizar vectores basados en SV40 o VEB con un marcador de selección apropiado. Cuando se utiliza un sistema de expresión aviar, los vectores adecuados para la expresión de diversas construcciones de TAGNPP1 se describen en la patente de Estados Unidos n.º 6.730.822; patente de Estados Unidos n.º 6.825.396; patente de Estados Unidos n.º 6.875.588; patente de Estados Unidos n.º 7.294.507; patente
- 45 de Estados Unidos n.º 7.521.591; patente de Estados Unidos n.º 7.534.929; y solicitud de patente de Estados Unidos número de serie 11/376.023. Brevemente, cuando se emplea un sistema de expresión aviar para expresar TAGNPP1, se contemplan promotores específicos adecuados de oviducto, por ejemplo, y sin limitación, promotores ovomucoide, promotores de ovoalbúmina, promotores de lisozima, promotores de conalbúmina, promotores de ovomucina, promotores de ovotransferrina y porciones funcionales de cada uno de estos promotores. Los
- 50 promotores no específicos adecuados pueden incluir, por ejemplo y sin limitación, promotores de citomegalovirus (CMV), promotores de MDOT y promotores del virus del sarcoma de Rous (VSR), promotores del virus de la leucemia murina (VLM), promotores del virus del tumor mamario de ratón (VTMR) y promotores SV40 y porciones funcionales de cada uno de estos promotores. Ejemplos no limitantes de otros promotores que pueden ser útiles incluyen, sin limitación, promotores Pol III (por ejemplo, promotores Pol III de tipo 1, tipo 2 y tipo 3), tales como
- 55 promotores H1, promotores U6, promotores de ARNt, promotores MPR de RNasa y porciones funcionales de cada uno de estos promotores. Normalmente, las secuencias de terminación funcionales se seleccionan para su uso en la presente descripción de acuerdo con el promotor que se emplea.

Células huésped

[0033] La presente descripción incluye la producción de TAGNPP1 soluble en un sistema aviar transgénico (por ejemplo, pollo transgénico) como es bien conocido en la materia, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 7.534.929. La producción del sistema aviar (por ejemplo, en el oviducto aviar) de un componente de NPP1 con o sin una fracción diana (por ejemplo, ssNPP1, sNPP1, TAGsNPP1 y TAGssNPP1) está dentro del alcance de la descripción. Además, TAGNPP1 producido en cualquier sistema de expresión de proteínas útil, incluyendo, sin limitación, aves transgénicas, mamíferos transgénicos, cultivo celular (por ejemplo, células CHO, células HEK293 y células COS), bacterias tales, como *E. coli*, animales transgénicos, tales como mamíferos y aves (por ejemplo, pollos, codornices, patos y pavos) y en sistemas vegetales que incluyen lentejas de agua, se contempla en esta invención.

[0034] Una cepa de célula huésped puede elegirse por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la TAGNPP1s expresada de la manera deseada. Tales modificaciones del polipéptido de TAGNPP1 incluyen, sin limitación, acetilación, carboxilación, sialilación, glicosilación, fosforilación, lipidación, y acilación. Diferentes células huésped, tales como CHO, COS, HeLa, MDCK, HEK293, y W138, que tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades post-traduccionales, se pueden elegir para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína de fusión de la presente descripción. La estirpe celular tumoral aviar también se contempla como una célula huésped para expresar el polipéptido de la presente descripción. Ejemplos de estirpes celulares aviar útiles (por ejemplo, una estirpe celular tumoral en oviducto aviar) que se pueden emplear en la presente descripción se describen en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2009/0.253.176.

Producción de TAGNPP1

[0035] TAGNPP1 puede producirse utilizando cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas. TAGNPP1 codificada por secuencias de ADN, como se describe anteriormente, se puede preparar con facilidad a partir de las secuencias de ADN utilizando cualquiera de una variedad de vectores de expresión descritos en esta invención o bien conocidos por los expertos en la materia. La expresión puede lograrse en cualquier célula huésped apropiada que ha sido transformada o transfectada con un vector de expresión que contiene una molécula de ADN que codifica un polipéptido recombinante de la presente descripción. Los sobrenadantes de sistemas de huésped/vector adecuados que secretan una proteína de fusión recombinante o polipéptido en medios de cultivo pueden en primer lugar concentrarse utilizando un filtro disponible comercialmente. Después de la concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación adecuada, tal como una matriz de afinidad o una resina de intercambio iónico. Una o más etapas de HPLC en fase inversa pueden emplearse para purificar adicionalmente un polipéptido recombinante.

[0036] Para la producción de proteínas recombinantes de alto rendimiento, se prefiere la expresión estable. Las estirpes celulares que expresan de forma estable TAGNPP1 se pueden transformar utilizando vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación y/o elementos de expresión endógenos y/o un gen marcador seleccionable en el mismo o en un vector separado. Tras la introducción del vector, las células pueden cultivarse durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a un medio selectivo. El fin del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan satisfactoriamente las secuencias introducidas. Los clones resistentes de células transformadas de manera estable pueden proliferar utilizando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo de célula. Los procedimientos para producir proteína exógena en estirpes celulares de mamífero son bien conocidos en la materia. Los ejemplos ilustrativos de este y otros aspectos y casos de la presente divulgación para la producción de polipéptidos heterólogos, tales como proteínas de fusión TAGNPP1 en células aviares, se describen completamente en la solicitud de patente de Estados Unidos número de serie 09/877.374, depositada el 8 de junio de 2001, publicada como el documento US 2002/0108132-A1 el 8 de agosto de 2002, y la solicitud de patente de Estados Unidos número de serie 10/251.364, depositada el 18 de septiembre de 2002. Ejemplos de la producción de proteínas exógenas en estirpes celulares tumorales aviares también se describen en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2009/0.253.176.

[0037] Se contempla específicamente la producción de las proteínas TAGNPP1 descritas en esta invención en un sistema aviar transgénico. En un caso particularmente útil, la descripción se representa con respecto a la producción de TAGNPP1 que puede producirse en el oviducto de un ave transgénica, tal como un pollo. Ejemplos de la producción de proteínas exógenas en el sistema de expresión aviar transgénica también se describen en la patente de Estados Unidos n.º 6.730.822. Brevemente, un vector aviar adecuado descrito anteriormente que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión TAGNPP1, vinculado operativamente

a un promotor específico de tejido o constitutivo que estimula la expresión de la secuencia codificante en el oviducto de pollo se introduce en las células embrionarias de pollo en etapa X. Las células embrionarias transformadas se incuban en condiciones que conducen a incubar pollos vivos. Los pollos vivos se crían en un pollo quimérico maduro que se apareó con un pollo no transgénico de forma natural o por inseminación artificial. Un pollo transgénico se identifica mediante identificación sistemática de la progenie para la incorporación de la línea germinal de la secuencia que codifica la proteína. La progenie transgénica puede aparearse con otro pollo transgénico o un pollo no transgénico para producir huevos que contienen la proteína de fusión TAGNPP1. A continuación, se aísla TAGNPP1 y se purifica por procedimientos bien conocidos en la materia. Por consiguiente, la descripción proporciona proteínas de fusión TAGNPP1 recombinantes que se han producido por aves transgénicas.

Composición farmacéutica

[0038] La presente descripción también presenta composiciones farmacéuticas que comprenden TAGNPP1 aislada y sustancialmente purificada o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. La composición farmacéutica de la presente descripción también puede incluir un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable del mismo. Las composiciones que comprenden tales vehículos, incluyendo moléculas de compuestos, se formulan por procedimientos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 14^a Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa.). El vehículo puede comprender un diluyente. En un caso, el vehículo farmacéutico puede ser un líquido y la proteína de fusión pueden estar en forma de una solución. El vehículo farmacéutico puede ser cera, grasa o alcohol. En otro caso, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido en forma de polvo, un polvo liofilizado, o un comprimido. En un caso, el vehículo puede comprender un liposoma o una microcápsula.

[0039] Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de un polvo liofilizado estéril para inyección después de la reconstitución con un diluyente. El diluyente puede ser agua para inyección, agua bacteriostática para inyección o solución salina estéril. El polvo liofilizado puede ser producido liofilizando una solución de la proteína de fusión para producir la proteína en forma seca. Como se conoce en la materia, la proteína liofilizada ha aumentado en general la estabilidad y posee una vida útil más larga que una solución líquida de la proteína.

Definiciones:

[0040] Como se utiliza en esta invención, el término "aceptable" con respecto a una formulación, composición o ingrediente, tal como se utiliza en esta invención, significa que no tiene efecto perjudicial persistente sobre la salud general del sujeto que está siendo tratado.

[0041] Como se utiliza en esta invención, el término "administración" o "administrar" se refiere a proporcionar una proteína de fusión de la descripción a un sujeto en necesidad de tratamiento.

[0042] "Alteraciones", como se utiliza en esta invención, comprenden cualquier alteración en la secuencia de polinucleótidos que codifica TAGNPP1 incluyendo delecciones, inserciones y mutaciones puntuales que pueden detectarse utilizando ensayos de hibridación.

[0043] El término "animal" se utiliza en esta invención para incluir todos los animales vertebrados, incluyendo aves y mamíferos, tales como rata, ratón y ser humano. También incluye un animal individual en todas las etapas del desarrollo, incluyendo etapas embrionarias y fetales.

[0044] Cuando "secuencia de aminoácidos" se recita en esta invención para referirse a una secuencia de aminoácidos de una molécula de proteína de fusión, "secuencia de aminoácidos" y términos similares, tales como "polipéptido" o "proteína" no tienen por objeto limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos completa asociada a la molécula de proteína o de polipéptido recitado.

[0045] El término "aviar", como se utiliza en esta invención, se refiere a cualquier especie, subespecie o cepa de organismo de clase aviar taxonómica, tal como, entre otros, organismos tales como pollos, pavos, patos, gansos, codornices, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos y ratites incluyendo avestruz, emú y casuario. El término incluye las diversas cepas conocidas de la especie Gallus gallus, o pollos, (por ejemplo, White Leghorn, Brown Leghorn, Barred-Rock, Sussex, New Hampshire, Rhode Island, Australorp, Menorca, Amro, California Gray, perdiz coloreada italiana), así como cepas de pavos, faisanes, codornices, patos, avestruces y otras aves de corral criadas habitualmente en cantidades comerciales.

[0046] La expresión "basado en" o "derivado de" al igual que en un vector retroviral se basa en o se deriva de un retrovirus particular o se basa en una secuencia nucleotídica de un retrovirus particular, significa que el genoma del vector retroviral contiene una porción sustancial de la secuencia nucleotídica del genoma del retrovirus particular. La porción sustancial puede ser un gen particular o secuencia nucleotídica, tal como la secuencia nucleotídica que codifica las proteínas gag, pol y/o env u otra secuencia nucleotídica estructural o funcional del genoma del virus, tal como secuencias que codifican las RTLs o puede ser sustancialmente el genoma de retrovirus completo, por ejemplo, la mayor parte (por ejemplo, más de 60 % o más de 70 % o más de 80 % o más de 90 %) o la totalidad del genoma de retrovirus, como resultará evidente a partir del contexto en la memoria descriptiva como el conocimiento de un experto en la materia. Los ejemplos de vectores retrovirales que se basan en o derivan de un retrovirus son los vectores retrovirales NL (por ejemplo, NLB) que se basan en el retrovirus ALV como se describe en Cosset y col., Journal of Virology (1991) vol. 65, págs. 3388-3394.

[0047] La expresión "biológicamente activa", como se utiliza en esta invención, se refiere a una proteína de fusión que tiene funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas de pirofosfatasa/fosfodiesterasa de una proteína NPP1 de origen natural.

[0048] El término "construcción", como se utiliza en esta invención, se refiere a una secuencia nucleotídica lineal o circular, tal como ADN que se ha ensamblado a partir de más de un segmento de la secuencia nucleotídica que se ha aislado de una fuente natural o se ha sintetizado químicamente, o combinaciones del mismo.

[0049] El término "complementario", como se utiliza en esta invención, se refiere a dos moléculas de ácido nucleico que pueden formar interacciones específicas entre sí. En las interacciones específicas, una base adenina en una cadena de un ácido nucleico puede formar dos enlaces hidrógeno con timina en una segunda cadena de ácido nucleico cuando las dos cadenas de ácido nucleico presentan polaridades opuestas. También en las interacciones específicas, una base de guanina en una cadena de un ácido nucleico puede formar tres enlaces hidrógeno con citosina en una segunda cadena de ácido nucleico cuando las dos cadenas de ácido nucleico presentan polaridades opuestas. Los ácidos nucleicos complementarios referidos en esta invención pueden comprender además bases modificadas en las que una adenina modificada puede formar enlaces hidrógeno con una timina o timina modificada y una citosina modificada puede formar enlaces hidrógeno con una guanina o una guanina modificada.

[0050] Una "delección", como se utiliza en esta invención, se refiere a un cambio en cualquiera de las secuencia de aminoácidos o nucleotídica en la que uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, están ausentes.

[0051] El término "expresado" o "expresión", como se utiliza en esta invención, se refiere a la transcripción de un gen para dar una molécula de ácido nucleico de ARN al menos complementaria en parte a una región de una de las dos cadenas de ácido nucleico del gen. El término "expresado" o "expresión", como se utiliza en esta invención, también puede referirse a la traducción del ARN para producir una proteína o péptido.

[0052] La expresión "vector de expresión", como se utiliza en esta invención, se refiere a un vector de ácido nucleico que comprende una región de control de la expresión génica, tal como un promotor o componente promotor vinculado operativamente a una secuencia nucleotídica que codifica al menos un polipéptido.

[0053] "Porción funcional" o "fragmento funcional" se utiliza de forma intercambiable y, como se utiliza en esta invención, significa una porción o fragmento de un todo capaz de realizar, en su totalidad o en parte, una función del conjunto. Por ejemplo, una porción biológicamente funcional de una molécula significa una porción de la molécula que realiza una función biológica de la molécula completa o molécula intacta. Por ejemplo, una porción funcional de una región de control de la expresión génica es un fragmento o porción de la región de control de la expresión génica especificada, en su totalidad o en parte, que regula o controla la expresión génica (por ejemplo, facilita en su totalidad o en parte) en un sistema biológico (por ejemplo, un promotor). Las porciones funcionales pueden ser de cualquier tamaño útil.

[0054] La expresión "región de control de la expresión génica", como se utiliza en esta invención, se refiere a secuencias nucleotídicas que se asocian a una secuencia codificante y que regulan, en su totalidad o en parte, la expresión de la secuencia codificante, por ejemplo, regulan, en su totalidad o en parte, la transcripción de la secuencia codificante. Las regiones de control de la expresión génica pueden aislarse a partir de una fuente de origen natural o puede sintetizarse químicamente y pueden incorporarse en un vector de ácido nucleico para permitir la transcripción regulada en células apropiadas. Las "regiones de control de la expresión génica" pueden preceder,

pero no se limitan a preceder, la región de una secuencia de ácido nucleico que está en la región 5' del extremo de una secuencia codificante que puede transcribirse en ARNm.

[0055] Los términos "heterólogo", "exógeno" y "extraño" se utilizan indistintamente en esta invención y en general se refieren a una biomolécula, tal como un ácido nucleico o una proteína que no se encuentra normalmente en un determinado organismo o en una célula determinada, tejido u otro componente contenido o producido por un organismo. Por ejemplo, una proteína que es heteróloga o exógena a un huevo es una proteína que no se encuentra normalmente en el huevo. Como se utiliza en esta invención, los términos "heterólogo", "exógeno" y "extraño" con referencia a los ácidos nucleicos, tales como ADN y ARN, se utilizan indistintamente y se refieren a un ácido nucleico que no se produce naturalmente como parte de un cromosoma, un genoma o célula en la que está presente o que se encuentra en un emplazamiento o emplazamientos y/o en cantidades que difieren del emplazamiento o emplazamientos y/o cantidades en las que se produce en la naturaleza. Puede ser ácido nucleico que no es endógeno al genoma, cromosoma o célula y se ha introducido de manera exógena en el genoma, cromosoma o célula. Ejemplos de ADN heterólogo incluyen, entre otros, un ADN que comprende una región de control de la expresión génica y el ADN que codifica un producto o productos, por ejemplo, ARN o producto proteico. Ejemplos de ADN heterólogo incluyen, entre otros, las regiones de control de la expresión génica o promotores descritos en esta invención, una vez aislados de aves y como se utiliza a partir de entonces, por ejemplo, después de la reintroducción en un genoma aviar.

[0056] La expresión "ácido nucleico aislado", como se utiliza en esta invención, incluye, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de una molécula genómica de origen natural pero no está flanqueada por al menos una de las secuencias que flanquean esa parte de la molécula en el genoma de las especies en las que se produce de forma natural; (b) un ácido nucleico que se ha incorporado en un vector o en el ADN genómico de una procarionota o eucarionota de una manera tal que el vector resultante o ADN genómico no es idéntico al ADN de origen natural a partir del cual se obtuvo ácido nucleico; (c) una molécula separada, tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por reacción en cadena de la polimerasa (RCP), reacción en cadena de la ligasa (RCL) o síntesis química, o un fragmento de restricción; (d) una secuencia nucleotídica recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión, y (e) una secuencia nucleotídica recombinante que forma parte de una secuencia híbrida que es de origen no natural. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente descripción pueden incluir, por ejemplo, variantes alélicas naturales, así como moléculas de ácido nucleico modificadas por deleciones, inserciones, inversiones o sustituciones de nucleótidos,.

[0057] Un "inserción" o "adición", como se utiliza en esta invención, se refiere a un cambio en una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que resulta en la adición de uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, en comparación con la molécula de TAGNPP1.

[0058] La expresión "ácido nucleico", como se utiliza en esta invención, se refiere a cualquier conjunto lineal o secuencial de nucleótidos y nucleósidos, por ejemplo ADNc, ADN genómico, ARNm, ARNt, oligonucleótidos, oligonucleósidos y derivados de los mismos. Para facilitar la discusión, los ácidos nucleicos de origen no natural pueden referirse en esta invención como construcciones. Los ácidos nucleicos pueden incluir vectores plasmídicos bacterianos que incluyen vectores de expresión, de clonación, cósmidos y de transformación, tales como, vectores virales animales, tales como, entre otros, adenovirus modificados, virus de la gripe, virus de la polio, virus de la viruela, retrovirus, tales como virus de la leucosis aviar (VLA) vector retroviral, un vector retroviral del virus de la leucemia murina (VLM), y un vector lentivirus, y similares, y fragmentos de los mismos. Además, el ácido nucleico puede ser una RTL de un vector retroviral del virus de la leucosis aviar (VLA), un vector retroviral del virus de la leucemia murina (VLM), o un vector lentivirus y fragmentos de los mismos. Los ácidos nucleicos también pueden incluir vectores NL, tales como NLB, NLD y NLA y fragmentos de los mismos y oligonucleótidos sintéticos, tales como ADN o ARN sintetizado químicamente. Los ácidos nucleicos pueden incluir nucleótidos y nucleósidos modificados o derivatizados, tales como, entre otros, nucleótidos halogenados, tales como, pero no sólo, 5-bromouracilo, y nucleótidos derivatizados, tales como nucleótidos marcados con biotina.

[0059] "Secuencia de ácido nucleico", como se utiliza en esta invención, se refiere a un oligonucleótido, nucleótido, o polinucleótido, y fragmentos o porciones de los mismos, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser mono o bicatenario, y representa la cadena codificante o no codificante.

[0060] La expresión "vinculado operativamente" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados de modo que realizan su función habitual. Las regiones de control de la expresión génica o promotores (por ejemplo, componentes promotores) vinculados operativamente a una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. Las secuencias de control

no tienen que ser contiguas a la secuencia codificante, siempre que funcionen para dirigir la expresión de las mismas. Así, por ejemplo, las secuencias intermedias no traducidas pero transcritas pueden estar presentes entre una secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora todavía puede considerarse "vinculada operativamente" a la secuencia codificante.

5

[0061] La expresión "promotor específico de oviducto", como se utiliza en esta invención, se refiere a promotores y componentes promotores que son funcionales, es decir, proporcionan la transcripción de una secuencia codificante, en gran medida, por ejemplo, principalmente (es decir, más del 50 % del producto de transcripción producido en el animal por un tipo de promotor particular que se produce en células de oviducto) o

10

exclusivamente en las células de oviducto de un ave. Ejemplos de promotores específicos de oviducto útiles incluyen, sin limitación, el promotor de ovoalbúmina, el promotor de ovomucoide, el promotor ovoinhibidor, el promotor de la lisozima y el promotor de ovotransferrina y porciones funcionales de estos promotores, por ejemplo, componentes promotores.

15

[0062] Las expresiones "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia nucleotídica" y "secuencia de ácido nucleico" se pueden utilizar indistintamente en esta invención e incluyen, entre otros, secuencias de codificación, es decir, polinucleótido o polinucleótidos o secuencia o secuencias de ácido nucleico que se transcriben y traducen en un polipéptido in vitro o in vivo cuando se colocan bajo el control de secuencias reguladoras o de control apropiadas; secuencias de control, por ejemplo, codones de inicio y codones de terminación de la traducción, secuencias

20

promotoras, sitios de unión al ribosoma, señales de poliadenilación, sitios de unión de factores de transcripción, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores aguas arriba y aguas abajo, potenciadores, silenciadores, secuencias de ADN a las que un factor o factores de transcripción se unen y alteran la actividad del promotor de un gen, ya sea positiva (inducción) o negativamente (represión) y similares. No se sugiere limitación en cuanto a la longitud o al origen sintético por los términos descritos en esta invención.

25

[0063] Como se utiliza en esta invención, los términos "polipéptido" y "proteína" se pueden utilizar indistintamente y se refieren a un polímero de aminoácidos de tres o más aminoácidos en un conjunto de serie, vinculado a través de enlaces peptídicos. El término "polipéptido" incluye proteínas, tales como proteínas de fusión, fragmentos de proteínas, análogos de proteínas, oligopéptidos y similares. El término "polipéptido" incluye

30

polipéptidos como se define anteriormente que están codificados por los ácidos nucleicos, producidos a través de tecnología recombinante (por ejemplo, aislados de un ave transgénica), o sintetizados químicamente.

[0064] Como se utiliza en esta invención, el término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN útil para iniciar el comienzo de la transcripción por una ARN polimerasa en una célula aviar. Un "componente promotor" es una secuencia de ADN que puede, por sí misma o, en combinación con otras secuencias de ADN efectuar o facilitar la transcripción. Los componentes promotores específicos, tales como componentes promotores de ovoalbúmina, componentes promotores ovomucoide y componentes promotores de la lisozima y otros promotores y componentes promotores descritos y reivindicados en esta invención no describen una secuencia promotora específica. Más bien, abarcan cualquier secuencia o fragmento de la secuencia del promotor respectivo que es útil para efectuar o facilitar la transcripción de una secuencia codificante. Por ejemplo, un componente promotor ovomucoide incluye, sin limitación, los promotores ovomucoides de aproximadamente 1,8 kb, aproximadamente 3,9 kb y aproximadamente 10 kb descritos en la publicación de Estados Unidos n.º 11/649.543, publicada el 17 de mayo de 2007. "Componentes promotores" también pueden abarcar las regiones de control de la expresión del gen reordenado que funcionan para iniciar la transcripción de ARN y las moléculas de ADN híbridas compuestas de secuencias de ADN

40

45

de origen natural y/o secuencias de ADN sintéticas que funcionan para iniciar la transcripción del ARN.

[0065] Las expresiones "ácido nucleico recombinante" y "ADN recombinante", como se utilizan en esta invención, se refieren a combinaciones de al menos dos secuencias de ácido nucleico que no se encuentran de forma natural en una célula eucariota o procariota. Las secuencias de ácido nucleico pueden incluir, entre otros, vectores de ácido nucleico, elementos reguladores de la expresión génica, orígenes de replicación, secuencias génicas adecuadas que, cuando se expresan, confieren resistencia a los antibióticos, secuencias de codificación de proteínas y similares. Se tiene por objeto que la expresión "polipéptido recombinante" o "proteína recombinante" incluye un polipéptido producido por técnicas de ADN recombinante, de manera tal que es distinto de un polipéptido de origen natural, ya sea en su emplazamiento, pureza o estructura. Generalmente, un polipéptido recombinante de este tipo estará presente en una célula en una cantidad diferente a la que se observa normalmente en naturaleza.

50

55

[0066] La expresión "condiciones rigurosas", como se utiliza en esta invención, es la "rigurosidad", que se produce en un intervalo de aproximadamente $T_f - 5^\circ\text{C}$ (5°C por debajo de la temperatura de fusión (T_f) de la sonda) a aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de T_f . Como se entenderá por los expertos en la materia, la

rigurosidad de la hibridación puede ser alterada con el fin de identificar o detectar secuencias polinucleotídicas idénticas o relacionadas.

[0067] Como se utiliza en esta invención, el término "sujeto" o "paciente" abarca mamíferos y no mamíferos. Ejemplos de mamíferos incluyen, entre otros, seres humanos, chimpancés, simios, monos, ganado, caballos, ovejas, cabras, cerdos, conejos, perros, gatos, ratas, ratones, cobayas, y similares. Ejemplos de no mamíferos incluyen, entre otros, aves, peces y similares.

[0068] Una "sustitución", como se utiliza en esta invención, se refiere al reemplazo de uno o más aminoácidos o nucleótidos por diferentes aminoácidos o nucleótidos, respectivamente.

[0069] Como se utiliza en esta invención, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a cualquier cantidad de un compuesto que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, da como resultado un tratamiento mejorado, curación, prevención, o mejora de una enfermedad, trastorno, o efecto secundario, o una disminución en la velocidad de avance de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para potenciar la función fisiológica normal.

[0070] Como se utiliza en esta invención, las expresiones "TAGNPP1", "proteína de fusión", "polipéptido de TAGNPP1" y "componente de NPP1 fusionado a una fracción diana" se utilizan indistintamente.

[0071] Como se utiliza en esta invención, el término "tratar", "tratando" o "tratamiento" se refiere a procedimientos para aliviar, remitir o mejorar síntomas de una enfermedad o afección, prevenir los síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas subyacentes de los síntomas, inhibir la enfermedad o afección, detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, provocar la regresión de la enfermedad o afección, aliviar una condición causada por la enfermedad o afección, o detener los síntomas de la enfermedad o afección, ya sea profiláctica y/o terapéuticamente.

[0072] Una "variante" de TAGNPP1, como se utiliza en esta invención, se refiere a una secuencia de aminoácidos que está alterada por uno o más aminoácidos. Preferentemente, una variante contiene sustituciones conservadoras. Una "sustitución conservadora" es una en la que un aminoácido es sustituido con otro aminoácido con propiedades similares, de manera que un experto en la materia de la química peptídica esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido esté sustancialmente inalterada. Las sustituciones de aminoácidos pueden efectuarse generalmente sobre la base de similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, aminoácidos cargados negativamente incluyen Asp y Glu; aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y aminoácidos con grupos principales polares no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similar incluyen Leu, Ile y Val; Gly y Ala; Asp y Gln; y Ser, Thr, Phe y Tyr. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservadores incluyen: Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr; (2) Cys, Ser, Tyr, Thr; (3) Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; (4) Lys, Arg, His; y (5) Phe, Tyr, Trp, His. Una variante puede también, o alternativamente, contener cambios no conservadores. En un caso preferido, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia nativa por sustitución, delección o adición de cinco aminoácidos o menos, o, por ejemplo, reemplazo de Gly por Trp. Las variantes pueden también (o alternativamente) modificarse mediante, por ejemplo, la delección o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima en la inmunogenicidad, estructura secundaria y naturaleza hidropática del componente de NPP1. La guía para determinar qué residuos de aminoácidos pueden sustituirse, insertarse o eliminarse sin abolir la actividad biológica o inmunológica puede encontrarse utilizando programas informáticos bien conocidos en la materia.

[0073] La expresión "vector" y "vector de ácido nucleico", como se utiliza en esta invención, se refiere a un plásmido monocatenario o bicatenario natural o sintético o molécula de ácido nucleico viral que puede transfectarse o transformarse en células y replicarse independientemente, o dentro del genoma de la célula huésped. Un vector bicatenario circular se puede linealizar por el tratamiento con una enzima de restricción apropiada basándose en la secuencia de nucleótidos del vector. Un ácido nucleico se puede insertar en un vector cortando el vector con enzimas de restricción y ligando las piezas deseadas entre sí.

[0074] El término "porción", como se utiliza en esta invención, con respecto a una proteína de fusión se refiere a fragmentos de esa proteína. Los fragmentos pueden variar en tamaño a partir de cuatro residuos de aminoácidos con respecto a la secuencia completa de aminoácidos sin aminoácido. De este modo, una proteína "que comprende al menos una porción de la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 1" abarca TAGNPP1 de longitud completa y fragmentos de la misma.

[0075] "Transformación" o "transfección", como se utiliza en esta invención, describe un procedimiento por el cual el ADN exógeno entra y cambia una célula receptora utilizando diversos procedimientos bien conocidos en la materia. La transformación puede basarse en cualquier procedimiento conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico extraño en una célula huésped procariota o eucariota. El procedimiento se selecciona basándose en la célula huésped que está siendo transformada y puede incluir, entre otros, electroporación, bombardeo de partículas, infección viral y lipofección. Tales células "transformadas" incluyen células en las que el ADN insertado es capaz de replicarse, ya sea como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma huésped. También incluyen células que expresan transitoriamente el ADN o ARN insertado durante periodos limitados de tiempo.

EJEMPLOS

[0076] La presente invención se ejemplifica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos tienen un fin meramente ilustrativo y no tienen por objeto, ni deben interpretarse como limitantes de la invención de modo alguno.

Ejemplo I

[0077] La construcción TAGsNPP1 que contiene la fracción diana que tiene ocho ácidos aspártico consecutivos fusionados a sNPP1 se ligó en un vector pTT22 utilizando sitios EcoRI y HindIII (pTT22-sNPP1.D8; Fig. 19). pTT22-sNPP1.D8 se transfectó en células HEK203E y los transformantes se cultivaron para expresar TAGsNPP1. TAGsNPP1 se aisló de los medios de cultivo y se purificó parcialmente como es bien conocido en la materia. Después de la purificación, se midió la actividad pirofosfasa/fosfodiesterasa de TAGsNPP1 por su capacidad para hidrolizar p-nitrofenil éster de timidina 5'-monofosfato. Brevemente, TAGsNPP1 se diluyó a 1 ng/μl en Tris 50 mM, NaCl 250 mM, pH 9,5. En una placa que contiene 50 μl de 1 ng/μl de TAGsNPP1, se añadieron 50 μl de sustrato de 10 mM de p-nitrofenil éster de timidina 5'-monofosfato (Sigma™, catálogo n.º T4510). La actividad enzimática de TAGsNPP1 se midió a 405 nm (absorbancia) en modo cinético durante 5 minutos. Como se muestra en la Fig. 21, se detectó la actividad de TAGsNPP1 por encima del nivel observado en el control que no contiene TAGsNPP1. En particular, TAGsNPP1 producido a partir de HEK203D6 exhibió el nivel más elevado de la actividad enzimática. Estos resultados sugieren encarecidamente que la NPP1 troncada fusionada a una fracción diana (es decir, D8) mantiene suficientemente su función normal como nucleasa.

Ejemplo II

[0078] Este ejemplo profético no limitante describe cómo tratar la calcificación arterial idiopática infantil mediante la administración de una formulación que comprende una proteína de fusión TAGNPP1.

[0079] Un médico clínico utiliza un ensayo de diagnóstico para verificar que un paciente tiene altos niveles de calcificación en la arteria. Un ensayo genético también se puede realizar para defectos de NPP1 como se describe en Rutsch y col. (2003), Nature Genetics 34:379-81.

[0080] Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se administran preferentemente por vía intravenosa, aunque se emplean administración interadérmica, intramuscular u oral en ciertas circunstancias.

[0081] El médico clínico determina una dosis que puede variar dependiendo del sexo, la edad, la salud, y el peso del paciente. La determinación de la dosificación o vía de administración apropiada está bien dentro de la habilidad de un médico ordinario.

[0082] La formulación que contiene TAGNPP1 puede ser infundida semanalmente, entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 1.000 mg/kg por semana. 10-30 mg/kg se pueden administrar una vez. Durante el periodo de infusión, los pacientes son observados de cerca y se realiza la intervención clínica en caso de un evento adverso. El tratamiento tiene una duración de al menos 1 mes o durante la vida del paciente. Una ventana de 48 horas puede permitirse para cada infusión. Una pauta de infusión en la que la tasa de infusión aumentada con el tiempo reduce o elimina eventos adversos. Las infusiones para lactantes se pueden administrar de acuerdo con la siguiente pauta: 5-10 cc/h durante 60 minutos en cada intervalo.

[0083] Por otra parte, cuando se desea la administración intravenosa continua, un ejemplo típico de sistemas de liberación lenta comprende que 1-100 mg/kg de proteínas TAGNPP1 eficaces pueden liberarse de forma continua durante más de 1 día.

[0084] Si bien esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones de ejemplo de las mismas, se entenderá por los expertos en la materia que diversos cambios en forma y detalles pueden efectuarse en la misma sin apartarse del alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende un componente de NPP1 fusionado a una fracción diana, en la que el componente de NPP1 es una NPP1 truncada que comprende la región rica en cisteína y un dominio catalítico que tiene una actividad pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa pero cuyo dominio N-terminal citosólico y el dominio transmembrana se han eliminado, en la que la fracción diana es capaz de potenciar la orientación selectiva de la proteína de fusión a un sitio de calcificación, y en la que dicha fracción diana se fusiona al extremo C-terminal del componente de NPP1.
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que dicha fracción diana se vincula químicamente a dicho componente de NPP1.
3. La proteína de fusión de la reivindicación 1 que comprende un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos P99 a D925 de la SEC. ID. N.º 1 como se muestra en la Figura 1.
4. La proteína de fusión de la reivindicación 1 que comprende un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 80 % con respecto a la secuencia de aminoácidos A205 a L591 de la SEC. ID. N.º 1 como se muestra en la Figura 1.
5. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que dicha fracción diana es un péptido que comprende al menos cuatro residuos de aminoácidos cargados negativamente.
6. La proteína de fusión de la reivindicación 1 que comprende los residuos de aminoácidos A205 a L591 de la SEC. ID. N.º 1 como se muestra en la Figura 1, en la que dicha fracción diana es un péptido que comprende entre cinco y quince residuos de aminoácidos cargados negativamente.
7. La proteína de fusión de la reivindicación 5, en la que dichos residuos de aminoácidos cargados negativamente comprenden al menos un ácido aspártico o ácido glutámico, o comprenden al menos cuatro residuos de ácido aspártico, o comprenden al menos cuatro residuos de ácido glutámico o comprenden ocho residuos de ácido aspártico consecutivos.
8. La proteína de fusión de la reivindicación 1, que comprende además un enlazador polipeptídico entre el componente de NPP1 y la fracción diana.
9. La proteína de fusión de la reivindicación 1, que comprende además una región Fc de inmunoglobulina, o que comprende además un péptido señal.
10. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que dicha proteína de fusión forma un homodímero, o en la que dicha proteína de fusión es un monómero.
11. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína de fusión de la reivindicación 1.
12. Un vector de replicación o de expresión que lleva el ácido nucleico aislado de la reivindicación 11.
13. Una célula huésped transformada con el vector de replicación o de expresión según la reivindicación 12, opcionalmente en la que dicha célula huésped se selecciona entre el grupo que consiste en células CHO, células HEK293 o células COS, u opcionalmente en la que dicha célula huésped es una célula tumoral aviar.
14. Un animal transgénico no humano que produce la proteína de fusión de la reivindicación 1, opcionalmente en el que dicho animal transgénico no humano es mamífero o aviar.
15. Un procedimiento de producción de dicha proteína de fusión de la reivindicación 1, el procedimiento comprende el cultivo de la célula huésped transformada con un vector de expresión según la reivindicación 13.
16. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la reivindicación 1 para su uso en terapia.
17. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 16, en la que dicha composición es para su uso en el tratamiento de un sujeto que es un mamífero, opcionalmente en la que dicho mamífero es un ser

humano.

18. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno que es calcificación arterial, resistencia a la insulina, raquitismo hipofosfatémico u
5 osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna vertebral.

19. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 18, en la que dicho trastorno es la calcificación arterial, opcionalmente en la que el tratamiento reduce la calcificación en la arteria, opcionalmente en la que la calcificación arterial es la calcificación arterial generalizada de la infancia.

10

NPP1 (tipo natural)

MERDGCAGGGSRGGEGRAPREGPAGNGRDRGRSHAAEAPGDPQAAASLLAPMDVGEEPLEKAARA
RTAKDPNTYKVLSLVLSVCVLTTLGCI**FGLKPS**CAKEVK**SCK**GRCFERTFGNCRCDAA**CV**ELGNCCLDYQET
 CIEPEHIWTCNK**FRC**GEKRLTRSLCACSD**DDCKDKG**DCCINYS**SVCQ**GEKSWVEEP**CES**INEPQCP**AGFETP**
 PTL**LF**SLDGFRAEYLHTWGGLLPV**ISK**LKKCGTYTKNM**RPV**YPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDP
 KM**NAS**FLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMY**NGS**VPFEE**RI**LAV
 LQWLQ**LPK**DERPHFYTYL**EEP**DSSGHSYGPVSSEVIKALQ**RVD**GMVGM**LM**DGLKELNLHRCLNLILISD
 HGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKN**IK**VIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEG**IARN**LS**CR**EPNQHF**KPY**LKHF
 L**PK**RLHFAKSDRIEPLTFYLD**PQWQLALNP**SERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVG**YG**PGFKHGIEADTF
 ENIEVYN**LMCDLLNL**TPAPN**NG**THGSLNHLLKNPVYTPKH**PK**EVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSC**NPS**ILPI
 EDFQTQFNLTVAEEKI**KH**ETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDR**NDS**FS**TE**
 DFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYK**NNT**KVSYGFLSPPQLNK**NSS**GIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHD
 TLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCD**SL**ENLRQKRRVIRNQEILIP**TH**FFIVLT**SCK**DT**SQ**TPLHCENL
 DTLAFILPHRTD**NS**ESCVHGKHDS**SW**VEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLK**TH**LPTFSQ
 ED (SEQ ID NO:1)

Fig. 1

sssNPP1 (dominio catalítico de NPP1 sin TAG)

AGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPV**ISK**LKKCGTYTKNM**RPV**YPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDN
 KMYDPKM**NAS**FLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMY**NGS**VPF
 EERILAVLQWLQ**LPK**DERPHFYTYL**EEP**DSSGHSYGPVSSEVIKALQ**RVD**GMVGM**LM**DGLKELNLHRCL
 NLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKN**IK**VIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEG**IARN**LS**CR**EPNQHF**K**
 PYLKHF**LPK**RLHFAKSDRIEPLTFYLD**PQWQLALNP**SERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVG**YG**PGFKHG
 IEADTFENIEVYN**LMCDLLNL**TPAPN**NG**THGSL (SEQ ID NO:2)

Fig. 2

TAGsssNPP1 (extremo N-terminal D8)

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASM**DDDDDDDD**AGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCG
TYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKY
QGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYG
PVSSEVIKALQRVDGMVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPA
ARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPPQWQLALNPSE
RKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSL (SEQ
ID NO:3)

Fig. 3

TAGsssNPP1 (extremo C-terminal D10)

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPV
YPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKYQGLKSGTFF
WPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKAL
QRVDGMVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVP
DKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPPQWQLALNPSE
RKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSL**DDDDDDDDDD**
(SEQ ID NO:4)

Fig. 4

TAGssNPP1 (extremo N-terminal D8)

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCA
 TGGATGACGATGATGACGACGATGACGCAGGGTTTGAAACGCCTCCTACACTCTTGTTTTCTTGGATGGATT
 CAGGGCAGAAATATTTGCACACTTGGGGTGGACTTCTTCTGTTATTAGCAAACCTCAAAAAATGTGGAACATAT
 ACTAAAAACATGAGACCGGTGTATCCAACAAAACTTTCCCAATCACTACAGCATTGTCACCGGATTGTATCC
 AGAATCTCATGGCATAATCGACAATAAGATGTATGATCCCAAAATGAATGCTTCCTTTTCACTTAAAAGTAAAG
 AGAAATTTAATCCGGAGTGGTACAAAGGAGAACCAATTTGGGTACAGCTAAGTATCAAGGCCTCAAGTCTG
 GCACATTTTTCTGGCCAGGATCAGATGTGGAAATTAACGGAATTTCCAGACATCTATAAAATGTATAATGGT
 TCAGTGCCATTTGAAGAAAGGATTTTGGCTGTTCTTCAGTGGCTGCAGCTTCCAAAAGATGAAAGACCACACT
 TTTACACTTTGTATTTGGAAGAACCAGATTCTTCAGGTCATTCATATGGACCAGTCAGCAGTGAAGTCATCAAA
 GCCTTGCAAGGGTTGATGGTATGGTTGGTATGCTGATGGATGGTCTGAAAGAGCTGAACTTGACAGATGC
 CTGAACCTCATCCTTATTTAGATCATGGCATGGAACAAGGCAGTTGTAAGAAATACATATATCTGAATAAGTA
 TTTGGGGGATGTTAAAAATATTAAGTTATCTATGGACCTGCAGCTCGATTGAGACCCTCTGATGTCCCAGATA
 AATACTATTCATTTAACTATGAAGGCATTGCCCGAAATCTTTCTTGCCGGAACCAAACCAGCACTTCAAACCT
 TATCTGAAACATTTCTGCCTAAGCGTTTGCACTTTGCTAAGAGTGATAGAATTGAGCCCTTGACATTCTATTTG
 GACCCTCAGTGGCAACTTGCATTGAATCCCTCAGAAAGGAAATATTGTGGAAGTGGATTTTCATGGCTCTGACA
 ATGTGTTTTCAAATATGCAAGCCCTCTTTGTTGGCTATGGACCTGGATTCAAGCATGGCATTGAGGCTGACACC
 TTTGAAAACATTGAAGTCTATAACTTGATGTGTGATTTGCTGAATTTGACACCGGCTCCTAATAACGGAACCTCA
 TGGAAGTCTTAACACCTTCTGAAGAATCCTGTTTATACGCCAAAGCATCCCAAAGAAGTGACCCCCCTGGTGC
 AGTGCCCTTCACAAGAAACCCAGAGATAACCTTGGCTGCTCATGTAACCCTTCATTTTGCCGATTGAGGAT
 TTTCAAACACAGTTCAATCTGACCGTGGCAGAAGAGAAGATTATTAAGCATGAACTTTGCCCTATGGAAGAC
 CTAGAGTTCTCCAGAAGGAAAACACCATCTGTCTTCTTTCCAGCACCAGTTTATGAGTGGATACAGCCAAGAC
 ATCTTGATGCCCCCTTTGGACATCCTATACCGTGGACAGAAATGACAGTTTCTCTACGGAAGACTTCTCCAACCTG
 TCTGTACCAGGACTTTAGAATTCCTCTTAGTCCTGTCCATAAATGTTCATTTTATAAAAAATAACACCAAAGTGAG
 TTACGGGTTCTCTCCCCACCACAACCTGAATAAGAATTCAAGTGGAATATATTCTGAAGCCTTGCTTACTACAA
 ATATAGTGCCAATGTACCAGAGTTTTCAAGTTATATGGCGCTACTTTCATGACACCCTCTTGCGAAAGTATGCA
 GAAGAAAGAAATGGTGTCAATGTCGTCAGTGGTCTGTGTTGACTTTGATTATGATGGACGTTGTGATTCTCT
 TGGAGAATTTGAGGCAAAAAAGAAGAGTCATCCGTAACCAAGAAATTTGATTCCAACCTATTTCTTCATTGTG
 CTGACAAGCTGTAAAGATACATCTCAGACGCCTTTGCACTGTGAAAACCTGGACACCTTGGCTTTCATTTTGCC
 TCACAGGACTGATAACAGCGAGAGCTGTGTGCATGGGAAGCATGACTCCTCATGGGTTGAAGAATTGTTGAT
 GTTGACAGAGCACGGATCACAGACGTCGAGCACATCACTGGACTCAGCTTTTATCAACAAAGAAAAGAGCC
 AGTTTCAGACATTTTGAAGTTGAAAACACATTTGCCAACCTTTAGCCAAGAAGATTGA (SEQ ID NO:5)

Fig. 5

TAGssNPP1 (extremo N-terminal D8; secuencia de péptido señal subrayada y fracción diana en negrita)

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASM**DDDDDDDD**AGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCG
 TYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKY
 QGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDYKMYNGSVPFEEILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYG
 PVSSEVIKALQRVDGMVGMLMDGLKELNLHRCLNLILSDHGMEQGSCKKIYLNKYLGDVKNIKVIYGP
 AARLRPSDVDPKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNP
 SERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLN
 HLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRV
 LQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTK
 VSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDFDYD
 GRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSS
 WVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQED (SEQ ID NO:6)

Fig. 6

ssNPP1 (2.238 pb)

ATGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCA
 TGGCAGGGTTTGAAACGCCTCCTACACTCTTGTTTTCTTTGGATGGATTGAGGGCAGAATATTTGCACACTTGG
 GGTGGACTTCTTCCTGTTATTAGCAAACCTCAAAAAATGTGGAACATATACTAAAAACATGAGACCGGTGTATC
 CAACAAAACTTTCCCAATCACTACAGCATTGTCACCGGATTGTATCCAGAATCTCATGGCATAATCGACAAT
 AAGATGTATGATCCCAAAATGAATGCTTCCTTTTCACTTAAAAGTAAAGAGAAATTTAATCCGGAGTGTTACA
 AAGGAGAACCAATTTGGGTCACAGCTAAGTATCAAGGCCTCAAGTCTGGCACATTTTTCTGGCCAGGATCAGA
 TGTGGAAATTAACGGAATTTTCCAGACATCTATAAAATGTATAATGGTTCAGTGCCATTTGAAGAAAGGATTT
 TGGCTGTTCTTCAGTGGCTGCAGCTTCCAAAAGATGAAAGACCACACTTTTACACTTTGTATTTGGAAGAACCA
 GATTCTTCAGGTCATTTCATATGGACCAGTCAGCAGTGAAGTCATCAAAGCCTTGACAGAGGGTTGATGGTATGG
 TTGGTATGCTGATGGATGGTCTGAAAGAGCTGAACTTGACACAGATGCCTGAACCTCATCCTTATTTTCAGATCAT
 GGCATGGAACAAGGCAGTTGTAAGAAATACATATATCTGAATAAGTATTTGGGGGATGTTAAAAATATTAAA
 GTTATCTATGGACCTGCAGCTCGATTGAGACCCTCTGATGTCCAGATAAATACTATTCAATTAACATGAAGG
 CATTGCCCGAAATCTTTCTTGCCGGGAACCAAAACCAGCACTTCAAACCTTATCTGAAACATTTCTTGCCTAAGC
 GTTTGCACTTTGCTAAGAGTGATAGAATTGAGCCCTTGACATTCTATTTGGACCCTCAGTGGCAACTTGCATTG
 AATCCCTCAGAAAGGAAATATTGTGGAAGTGGATTTTCATGGCTCTGACAATGTGTTTTCAAATATGCAAGCCC
 TCTTTGTTGGCTATGGACCTGGATTCAAGCATGGCATTGAGGCTGACACCTTTGAAAACATTGAAGTCTATAAC
 TTGATGTGTGATTGCTGAATTTGACACCGGCTCCTAATAACGGAACCTCATGGAAGTCTTAACCACCTTCTGAA
 GAATCCTGTTTATACGCCAAAGCATCCCAAAGAAGTGCACCCCTGGTGCAGTGCCCTTCACAAGAAACCCC
 AGAGATAACCTTGGCTGCTCATGTAACCCCTCCATTTTGCCGATTGAGGATTTTCAAACACAGTTCAATCTGAC
 CGTGGCAGAAGAGAAGATTATTAAGCATGAAACTTTGCCCTATGGAAGACCTAGAGTTCTCCAGAAGGAAAA
 CACCATCTGTCTTCTTTCCAGCACCAGTTTATGAGTGGATACAGCCAAGACATCTTGATGCCCTTTGGACATC
 CTATACCGTGGACAGAAATGACAGTTTCTCTACGGAAGACTTCTCCAAGTGTCTGTACCAGGACTTTAGAATTC
 CTCTAGTCCTGTCCATAAATGTTCAATTTATAAAAAATAACACCAAAGTGAGTTACGGGTTCTCTCCCCACCAC
 AACTGAATAAGAATTCAAGTGAATATATTCTGAAGCCTTGCTTACTACAAATATAGTGCCAATGTACCAGAG
 TTTTCAAGTTATATGGCGCTACTTTCATGACACCCTCTTGCGAAAGTATGCAGAAGAAAGAAATGGTGTCAAT
 GTCGTCAAGTGGTCTGTGTTGACTTTGATTATGATGGACGTTGTGATTCCTTGGAGAATTTGAGGCAAAAAA
 GAAGAGTCATCCGTAACCAAGAAATTTGATTCCAAGTCAATTTCTTATTGTGCTGACAAGCTGTAAAGATACA
 TCTCAGACGCCTTTGCACTGTGAAAACCTGGACACCTTGGCTTTTCAATTTGCCTCACAGGACTGATAACAGCGA
 GAGCTGTGTGCATGGGAAGCATGACTCCTCATGGGTTGAAGAATTGTTGATGTTGCACAGAGCACGGATCAC
 AGACGTCGAGCACATCACTGGACTCAGCTTTTATCAACAAAGAAAAGAGCCAGTTTCAGACATTTTGAAGTTG
 AAAACACATTTGCCAACCTTTAGCCAAGAAGAT (SEQ ID NO:7)

Fig. 7

ssNPP1 (secuencia de péptido señal subrayada)

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMMAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPV
 YPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPWEYKGEPWVTAKYQGLKSGTFF
 WPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEIRILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKAL
 QRVDMVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDV
 PDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYCGSG
 FHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTP
 KHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLS
 QHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQL
 NKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDFDYDGRCDLENLRQ
 KRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRA
 RITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQED (SEQ ID NO:8)

Fig. 8

sNPP1

ATGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTT GCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCA
 TGCCAAGTTGTGCCAAAGAAGTTAAAAAGTTGCAAAGGTCGCTGTTTCGAGAGAACATTTGGGAACTGTCGCT
 GTGATGCTGCCTGTGTTGAGCTTGAAAAGTCTGTTTGGATTACAGGAGACGTGCATAGAACAGAACATAT
 ATGGACTTGCAACAAATTCAGGTGTGGTGAGAAAAGATTGACCAGAAGCCTCTGTGCCTGTTGAGATGATTGC
 AAGGACAAGGGCGACTGCTGCATCAACTACAGTTTCAAGGTGAGAAAAGTTGGGTGGAAGAACC
 ATGTGAGAGCATTATGAGCCACAGTGCCAGCAGGGTTTGAAACGCCTCTTACACTCTTGTCTTTGGATG
 GATTGAGGGCAGAAATTTGCACACTTGGGGTGGACTTCTTCTGTTATTAGCAAACCTCAAAAAATGTGGAAC
 ATATACTAAAAACATGAGACCGGTGTATCCAACAAAACTTTCCCAATCACTACAGCATTGTCACCGGATTGT
 ATCCAGAATCTCATGGCATAATCGACAATAAGATGTATGATCCCAAAATGAATGCTTCTTTTCACTTAAAGT
 AAAGAGAAATTTAATCCGGAGTGGTACAAAGGAGAACCAATTTGGGTCACAGCTAAGTATCAAGGCCTCAAG
 TCTGGCACATTTTTCTGGCCAGGATCAGATGTGGAAATTAACGGAATTTTCCAGACATCTATAAAATGTATAA
 TGGTTCAGTGCCATTTGAAGAAAGGATTTGGCTGTTCTTCAGTGGCTGCAGCTTCCAAAAGATGAAAGACCA
 CACTTTTACACTTTGATTTTGAAGAACCAGATTCTTCAGGTCAATCATATGGACCAGTCAGCAGTGAAGTCAT
 CAAAGCCTTGCAAGGGTTGATGGTATGGTGGTATGCTGATGGATGGTCTGAAAGAGCTGAACTTGCACAG
 ATGCCTGAACCTCATCTTATTTAGATCATGGCATGGAACAAGGCAGTTGTAAGAAATACATATATCTGAATA
 AGTATTTGGGGGATGTTAAAAATATTAAGTTATCTATGGACCTGCAGCTCGATTGAGACCCTCTGATGTCCCA
 GATAAATACTATTCAATTAAGTATGAAGGCATTGCCCCGAAATCTTTCTTGCCGGGAACCAAACAGCACTTCAA
 ACCTTATCTGAAACATTTCTTGCTAAGCGTTTGCATTTGCTAAGAGTGATAGAATTGAGCCCTTGACATTCTA
 TTTGGACCCTCAGTGGCAACTTGCAATGAATCCCTCAGAAAGGAAATATTGTGGAAGTGGATTTTATGGCTCT
 GACAATGTGTTTTCAATATGCAAGCCCTCTTGTGGCTATGGACCTGGATTCAAGCATGGCATTGAGGCTG
 ACACCTTTGAAAACATTGAAGTCTATAACTTGATGTGTGATTGCTGAATTTGACACCGGCTCCTAATAACGGA
 ACTCATGGAAGTCTTAACACCTTCTGAAGAATCCTGTTTATACGCCAAAGCATCCCAAAGAAGTGACCCCCCT
 GGTGCAAGTGGCCCTTCAAGAAACCCAGAGATAACCTTGGCTGCTCATGTAACCTTCCATTTTCCGATTG
 AGGATTTTCAAACACAGTTCAATCTGACCGTGGCAGAAGAGAAGATTATTAAGCATGAACTTTGCCCTATGG
 AAGACCTAGAGTTCTCCAGAAGGAAAAACCATCTGTCTTCTTCCAGCACCAGTTTATGAGTGGATACAGCC
 AAGACATCTTGATGCCCTTTGGACATCCTATACCGTGGACAGAAATGACAGTTTCTCTACGGAAGACTTCTCC
 AACTGTCTGTACCAGGACTTTAGAATTCCTCTTAGTCCTGTCCATAAATGTTCAATTTATAAAAAATAACACCAA
 GTGAGTTACGGGTTCTCTCCCCACCACAAGTGAATAAGAATTCAAGTGAATATATTCTGAAGCCTTGCTTAC
 TACAAATATAGTCCAATGTACCAGAGTTTCAAGTTATATGGCGCTACTTTCATGACACCCTCTTGCGAAAGT
 ATGCAGAAGAAAGAAATGGTGTCAATGTCGTGAGTGGTCCTGTGTTTGACTTTGATTATGATGGACGTTGTGA
 TTCCTTGGAGAATTTGAGGCAAAAAAGAAGATCATCCGTAACCAAGAAATTTTGATTCCAACCTATTCTTCA
 TTGTGCTGACAAGCTGTAAAGATACATCTCAGACGCCTTTGCACTGTGAAAACCTGGACACCTTGGCTTTCATT
 TTGCCTCACAGGACTGATAACAGCGAGAGCTGTGTGCATGGGAAGCATGACTCCTCATGGGTTGAAGAATTG
 TTGATGTTGCACAGAGCACGGATCACAGACGTCGAGCACATCACTGGACTCAGCTTTTATCAACAAAGAAAAG
 AGCCAGTTTCAGACATTTTGAAGTTGAAAACACATTTGCCAACCTTAGCCAAGAAGAT (SEQ ID NO:9)

Fig. 9

sNPP1

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPE
 HIWTCNKFRFCGEKRLTRSLCACSDDCCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLF
 SLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMN
 ASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQ
 WLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHG
 MEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPK
 RLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGIEADTFENI
 EVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIED
 FQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDF
 SNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTL
 LRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDSENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLD
 TLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQE
 D (SEQ ID NO:10)

Fig. 10

TAGsNPP1 (extremo N-terminal D8)

ATGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCA
 TGGATGACGATGATGACGACGATGACCCAAGTTGTGCCAAAGAAGTTAAAAGTTGCAAAGGTCGCTGTTTCG
 AGAGAACATTTGGGAACTGTCGCTGTGATGCTGCCTGTGTTGAGCTTGAAAAGTCTGTTTGGATTACCAGGA
 GACGTGCATAGAACCAGAACATATATGGACTTGCAACAAATTCAGGTGTGGTGAGAAAAGATTGACCAGAAG
 CCTCTGTGCCTGTTTCTGATGATTGCAAGGACAAGGGCGACTGCTGCATCAACTACAGTTCAGTGTGTCAAGGT
 GAGAAAAGTTGGGTGGAAGAACCATTGTGAGAGCATTAAATGAGCCACAGTGCCAGCAGGGTTTGAAACGCC
 TCCTACACTCTTGTTCCTTTGGATGGATTGAGGGCAGAAATATTTGCACACTTGGGGTGGACTTCTTCCTGTTAT
 TAGCAAACCTCAAAAAATGTGGAACATATACTAAAAACATGAGACCGGTGTATCCAACAAAACTTTCCCAAT
 CACTACAGCATTGTCACCGGATTGTATCCAGAATCTCATGGCATAATCGACAATAAGATGTATGATCCCAAAAT
 GAATGCTTCCTTTTCACTTAAAAAGTAAAGAGAAAATTTAATCCGGAGTGGTACAAAGGAGAACCAATTTGGGTC
 ACAGCTAAGTATCAAGGCCTCAAGTCTGGCACATTTTCTGGCCAGGATCAGATGTGGAAATTAACGGAATTT
 TCCCAGACATCTATAAAATGTATAATGGTTCAGTGCCATTTGAAGAAAGGATTTTGGCTGTTCTTCAGTGGCTG
 CAGCTTCAAAAAGATGAAAGACCACACTTTTACACTTTGTATTTGGAAGAACCAGATTCTTCAGGTCAATCATA
 TGGACCAGTCAGCAGTGAAGTCATCAAGCCTTGACAGAGGGTTGATGGTATGGTTGGTATGCTGATGGATGG
 TCTGAAAGAGCTGAACTTGACAGATGCCTGAACCTCATCCTTATTTAGATCATGGCATGGAACAAGGCAGT
 TGTAAGAAATACATATATCTGAATAAGTATTTGGGGGATGTTAAAAATATTAAAGTTATCTATGGACCTGCAG
 CTCGATTGAGACCTCTGATGTCCAGATAAATACTATTCAATTAAGTATGAAGGCATTGCCCAGAAATCTTCTT
 GCCGGGAACCAAAACCAGCACTTCAACCTTATCTGAAACATTTCTTGCCTAAGCGTTTGCACTTTGCTAAGAGT
 GATAGAATTGAGCCCTTGACATTCTATTGGACCCTCAGTGGCAACTTGCAATTGAATCCCTCAGAAAGGAAAT
 ATTGTGGAAGTGGATTTTATGGCTCTGACAATGTGTTTTCAAATATGCAAGCCCTCTTGTGGCTATGGACCT
 GGATTCAAGCATGGCATTGAGGCTGACACCTTTGAAAACATTGAAGTCTATAACTTGATGTGTGATTGCTGA
 ATTTGACACCGGCTCCTAATAACGGAACCTCATGGAAGTCTTAACCACTTCTGAAGAATCCTGTTTATACGCCA
 AAGCATCCCAAAGAAGTGACCCCTGGTGCAGTGCCCTTCACAAGAAACCCAGAGATAACCTTGGCTGCT
 CATGTAACCTTCCATTTTGCCGATTGAGGATTTTCAAACACAGTTCAATCTGACCGTGGCAGAAGAGAAGATT
 ATTAAGCATGAACTTTGCCCTATGGAAGACCTAGAGTCTCCAGAAGGAAAACACCATCTGTCTTCTTTCCCA
 GCACCAGTTTATGAGTGGATACAGCCAAGACATCTTGATGCCCTTTGGACATCCTATACCGTGGACAGAAAT
 GACAGTTTCTCTACGGAAGACTTCTCCAAGTGTCTGTACCAGGACTTTAGAATTCCTCTTAGTCTGTCCATAAA
 TGTTCAATTTATAAAAAATAACACCAAAGTGAGTTACGGGTTCTCTCCCCACCACAACTGAATAAGAATTCAAG
 TGAATATATTCTGAAGCCTTGCTTACTACAAATATAGTGCCAATGTACCAGAGTTTTCAAGTTATATGGCGCT
 ACTTTCATGACACCCTCTTGCGAAAGTATGCAGAAGAAAGAAATGGTGTCAATGTCGTGAGTGGTCCTGTGTT
 TGACTTTGATTATGATGGACGTTGTGATTCCTTGAGAAATTTGAGGCAAAAAAGAGATCATCCGTAACCAA
 GAAATTTTGATTCCAACCTATTCTTCATTGTGCTGACAAGCTGTAAAGATACATCTCAGACGCCTTTGCACTGT
 GAAAACCTGGACACCTTGCTTTTCAATTTGCCTCACAGGACTGATAACAGCGAGAGCTGTGTGCATGGGAAGC
 ATGACTCCTCATGGGTTGAAGAATTGTTGATGTTGCACAGAGCACGGATCACAGACGTCGAGCACATCACTGG
 ACTCAGCTTTTATCAACAAAGAAAAGAGCCAGTTTCAGACATTTTGAAGTTGAAAACACATTTGCCAACCTTTA
 GCCAAGAAGAT (SEQ ID NO:11)

Fig. 11

TAGsNPP1 (extremo N-terminal D8)

IGVLLTQRTLLSVLALLFPSMASM**DDDDDDDD**PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCL
 DYQETCIEPEHIWTCNKFRGKRLTRSLCACSDDCCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCP
 AGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIID
 NKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDYKMYNGSV
 PFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLH
 RCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNO
 HFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGF
 KHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNL
 GCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYT
 VDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQS
 FQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCK
 DTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSD
 ILKLKTHLPTFSQED (SEQ ID NO:12)

Fig. 12

TAGsNPP1 (extremo C-terminal D8)

GTGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCA
 TGCCAAGTTGTGCCAAAGAAGTTAAAAGTTGCAAAGGTCGCTGTTTCGAGAGAACATTTGGGAACTGTCGCT
 GTGATGCTGCCTGTGTTGAGCTTGAAACTGCTGTTTGGATTACCAGGAGACGTGCATAGAACCAGAACATAT
 ATGGACTTGCAACAAATTCAGGTGTGGTGAGAAAAGATTGACCAGAAGCCTCTGTGCCTGTTGAGATGATTGC
 AAGGACAAGGGCGACTGCTGCATCAACTACAGTTCAGTGTGTCAAGGTGAGAAAAGTTGGGTGGAAGAACC
 ATGTGAGAGCATTAAATGAGCCACAGTGCCCAGCAGGGTTTGAAACGCCTCCTACACTCTTGTTTCTTTGGATG
 GATTCAGGGCAGAATATTTGCACACTTGGGGTGGACTTCTTCCTGTTATTAGCAAACCTCAAAAATGTGGAAC
 ATATACTAAAAACATGAGACCGGTGTATCCAACAAAACTTTCCCAATCACTACAGCATTGTCACCGGATTGT
 ATCCAGAATCTCATGGCATAATCGACAATAAGATGTATGATCCCAAAATGAATGCTTCCTTTTCACTTAAAAGT
 AAAGAGAAATTTAATCCGGAGTGGTACAAAGGAGAACCAATTTGGGTACAGCTAAGTATCAAGGCCTCAAG
 TCTGGCACATTTTTCTGGCCAGGATCAGATGTGGAAATTAACGGAATTTCCAGACATCTATAAAATGTATAA
 TGGTTCACTGCCATTTGAAGAAAGGATTTTGGCTGTTCTTCAGTGGCTGCAGCTTCCAAAAGATGAAAGACCA
 CACTTTTACACTTTGTATTTGGAAGAACCAGATTCTTCAGGTCATTATCATATGGACCAGTCAGCAGTGAAGTCAT
 CAAAGCCTTGCAAGGGGTTGATGGTATGGTTGGTATGCTGATGGATGGTCTGAAAGAGCTGAACCTGCACAG
 ATGCCTGAACCTCATCTTATTTAGATCATGGCATGGAACAAGGCAGTTGTAAGAAATACATATATCTGAATA
 AGTATTTGGGGGATGTTAAAAATATTAAGTTATCTATGGACCTGCAGCTCGATTGAGACCCTCTGATGTCCCA
 GATAAATACTATTCAATTAAGTATGAAGGCATTGCCCGAAATCTTTCTTGCCGGAACCAAAACCAGCACTTCAA
 ACCTTATCTGAAACATTTCTTGCTTAAGCGTTTGCACTTTGCTAAGAGTGATAGAATTGAGCCCTTGACATTCTA
 TTTGGACCCTCAGTGGCAACTTGCAATTGAATCCCTCAGAAAGGAAATATTGTGGAAGTGGATTTCATGGCTCT
 GACAATGTGTTTTCAAATATGCAAGCCCTCTTGTGGCTATGGACCTGGATTCAAGCATGGCATTGAGGCTG
 ACACCTTTGAAAACATTGAAGTCTATACTTGATGTGTGATTTGCTGAATTTGACACCGGCTCCTAATAACGGA
 ACTCATGGAAGTCTTAACCACCTTCTGAAGAATCCTGTTTATACGCCAAAGCATCCCAAGAAGTGCACCCCT
 GGTGCAGTGCCCTTCAACAAGAAACCCAGAGATAACCTTGGCTGCTCATGTAACCTTCCATTTGCCGATTG
 AGGATTTTCAAACACAGTTCAATCTGACCGTGGCAGAAGAGAAGATTATTAAGCATGAAACTTTGCCCTATGG
 AAGACCTAGAGTTCTCCAGAAGGAAAACACCATCTGTCTTCTTCCAGCACCAAGTTTATGAGTGGATACAGCC
 AAGACATCTTGATGCCCCTTTGGACATCCTATACCGTGGACAGAAATGACAGTTTCTCTACGGAAGACTTCTCC
 AACTGTCTGTACCAGGACTTTAGAATTCCTCTTAGTCCTGTCCATAAATGTTCAATTTATAAAAATAACACCAA
 GTGAGTTACGGGTTCTCTCCCCACCACAACCTGAATAAGAATTCAAGTGAATATATTCTGAAGCCTTGCTTAC
 TACAAATATAGTGCCAATGTACCAGAGTTTCAAGTTATATGGCGCTACTTTCATGACACCCTCTTGCGAAAAGT
 ATGCAGAAGAAAGAAATGGTGTCAATGTCGTCACTGGTCCTGTGTTTGACTTTGATTATGATGGACGTTGTGA
 TTCCTTGGAGAATTTGAGGCAAAAAGAAGAGTCATCCGTAACCAAGAAATTTGATTCCAACCTCATTTCTTCA
 TTGTGCTGACAAGCTGTAAAGATACATCTCAGACGCCTTTGCACTGTGAAAACCTGGACACCTTGGCTTTCATT
 TTGCCTCACAGGACTGATAACAGCGAGAGCTGTGTGCATGGGAAGCATGACTCCTCATGGGTGGAAGAATTG
 TTGATGTTGCACAGAGCACGGATCACAGACGTCGAGCACATCACTGGACTCAGCTTTTATCAACAAAGAAAAG
 AGCCAGTTTCAGACATTTTGAAGTTGAAAACACATTTGCCAACCTTTAGCCAAGAAGATGATGACGATGATGA
 CGACGATTGA (SEQ ID NO:13)

Fig. 13

TAGsNPP1 (extremo C-terminal D8; secuencia de péptido señal subrayada y fracción diana en negrita)

QGVLLTQRTLTLVLALLFPSMASMPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCN
KFRCGEKRLTRSLCACSDDCDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHT
WGGLLPVISKLLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKG
EPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGH
SYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARL
RPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYCGSGFH
GSDNVFSNMQALFVGYPGFGKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHP
LVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDIL
MPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMY
QSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTQ
PLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFS
QE**DDDDDDDD** (SEQ ID NO:14)

Fig. 14

Péptido enlazador

GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:15)

Fig. 15

La secuencia de aminoácidos de la región Fc

EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:16)

Fig. 16

**La secuencia de aminoácidos de TAGsssNPP1 (extremo N-terminal D8) + Fc +
enlazador**

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK **DDDDDDDD**
GGGGSGGGGSAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVT
GLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDI
YKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMD
GLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYESGIARNL
SCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPPQWQLALNPSEKCYGSGFHGSDNVFSNMQALF
VGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSL (SEQ ID NO:17)

Fig. 17

**La secuencia de aminoácidos de TAGsssNPP1 (extremo C-terminal D8) + Fc +
enlazador**

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTW
GGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPE
WYKGEPWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYT
LYLEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMLMDGLKELNLHRCLNLILSDHGMEQGSCKKIYLNKY
LGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYL
DPQWQLALNPSEKCYGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGPGFKHGEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAP
NNGTHGSLGGGGSGGGGS **DDDDDDDD** (SEQ ID NO: 18)

Fig. 18

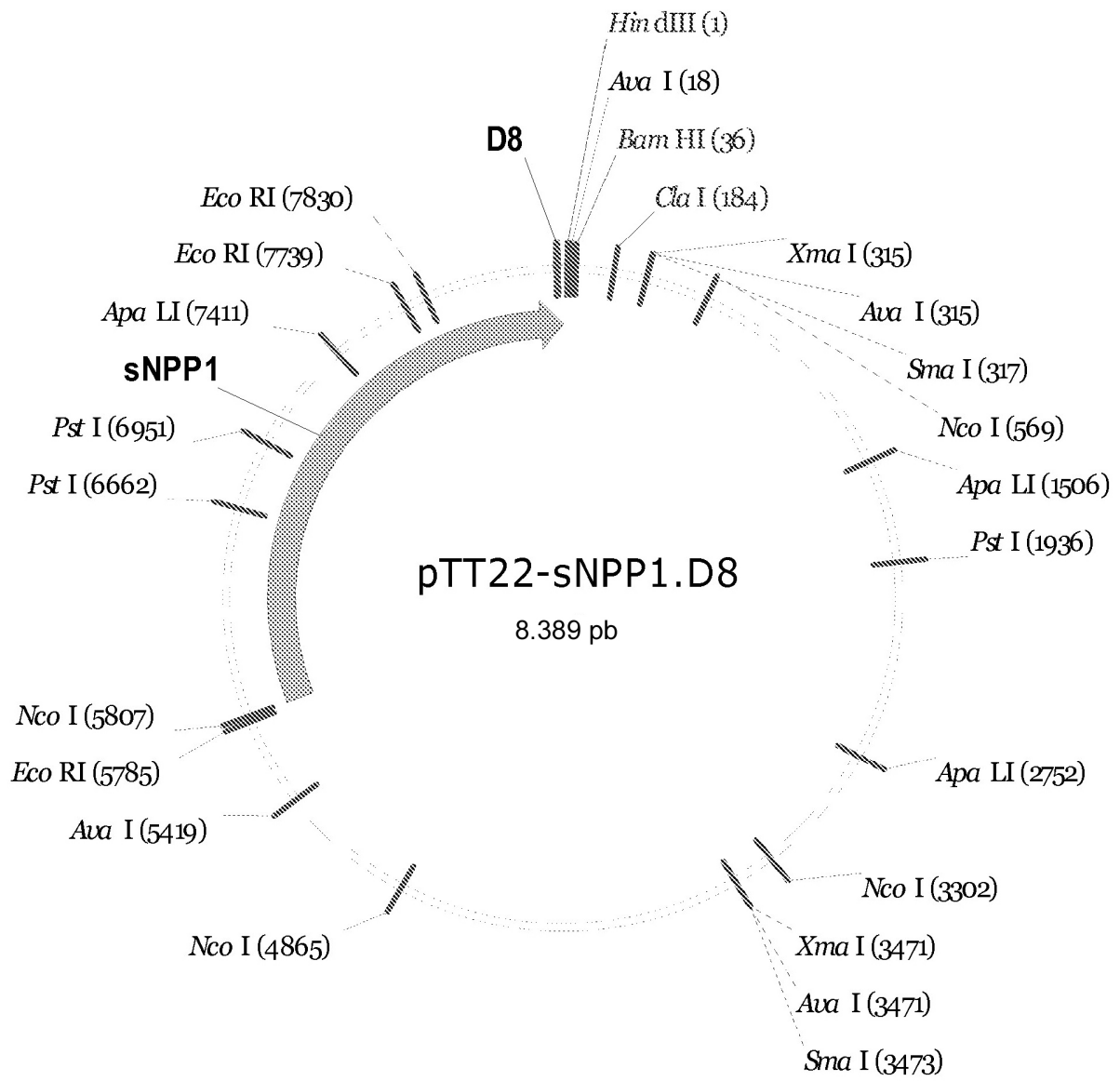


Fig. 19

Análisis por Western

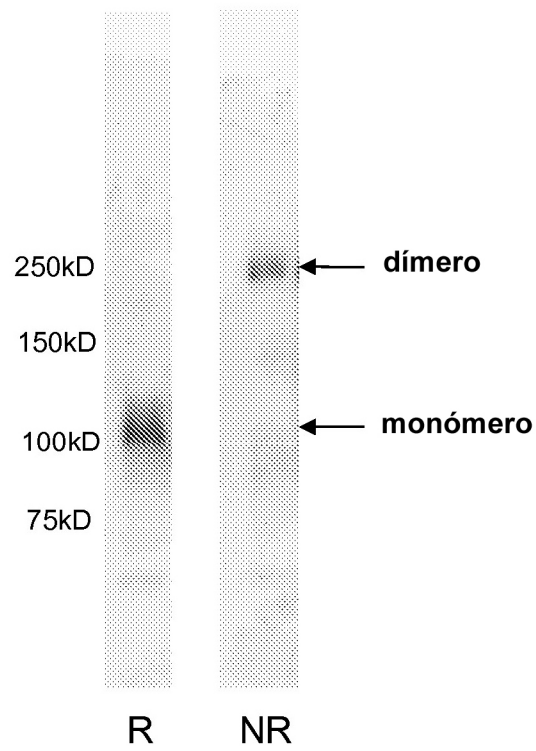


Fig. 20

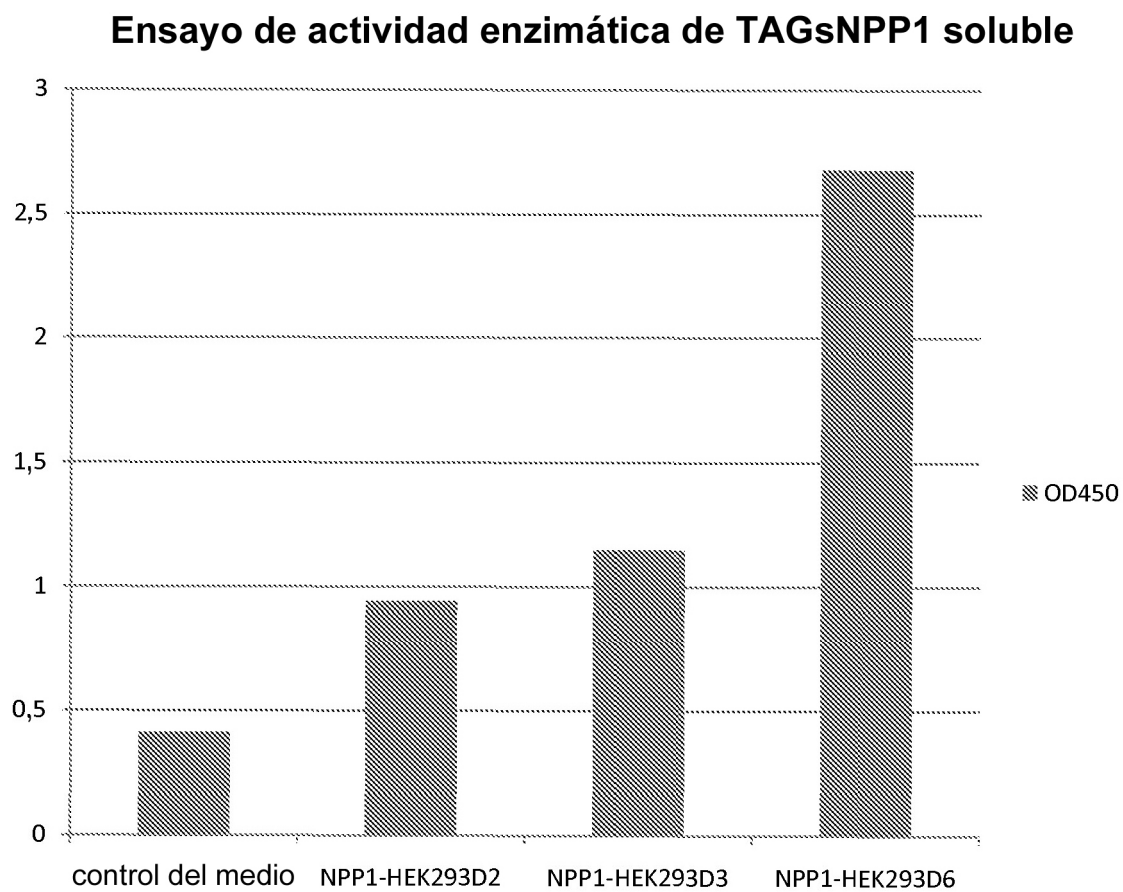


Fig. 21

Proteínas de fusión NPP1 recombinantes

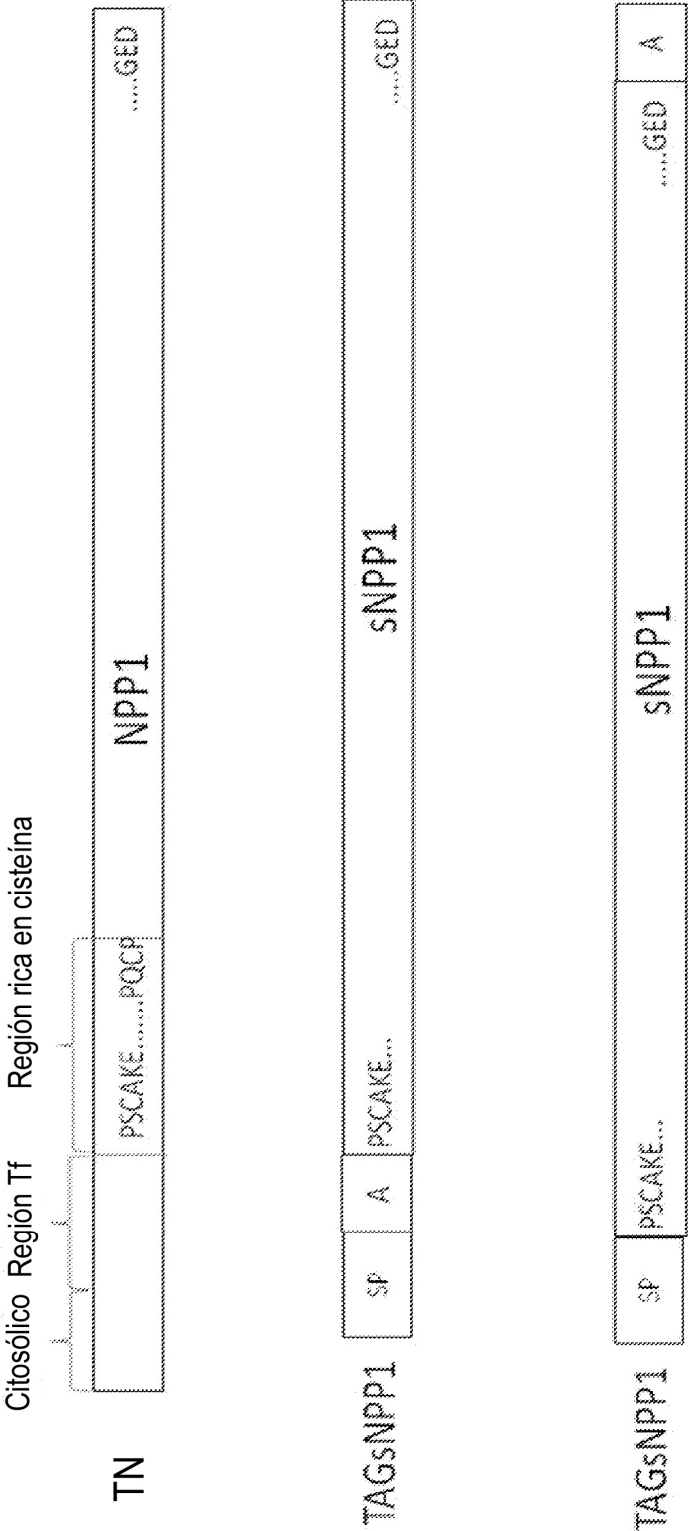


Fig. 22A

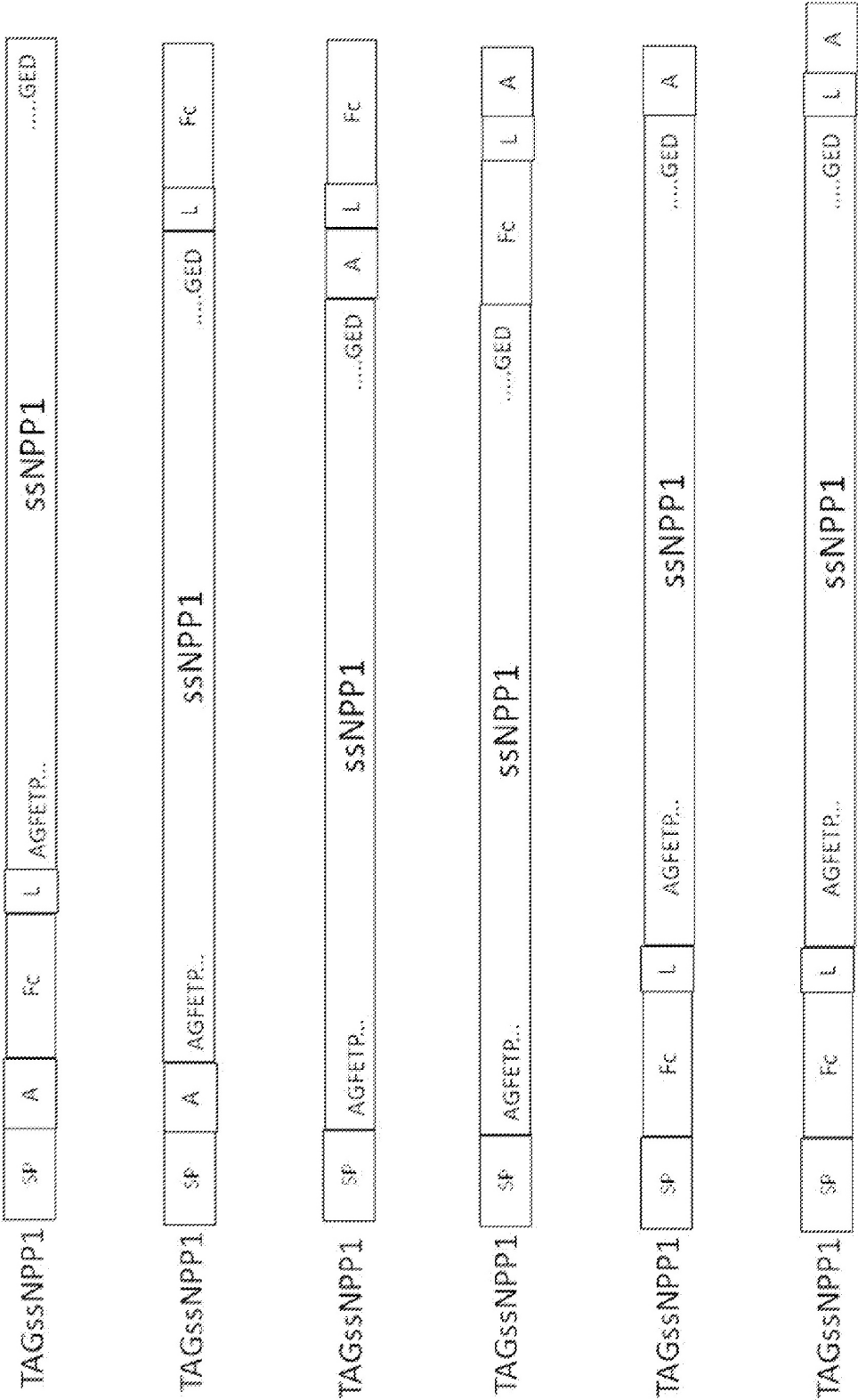


Fig. 22B

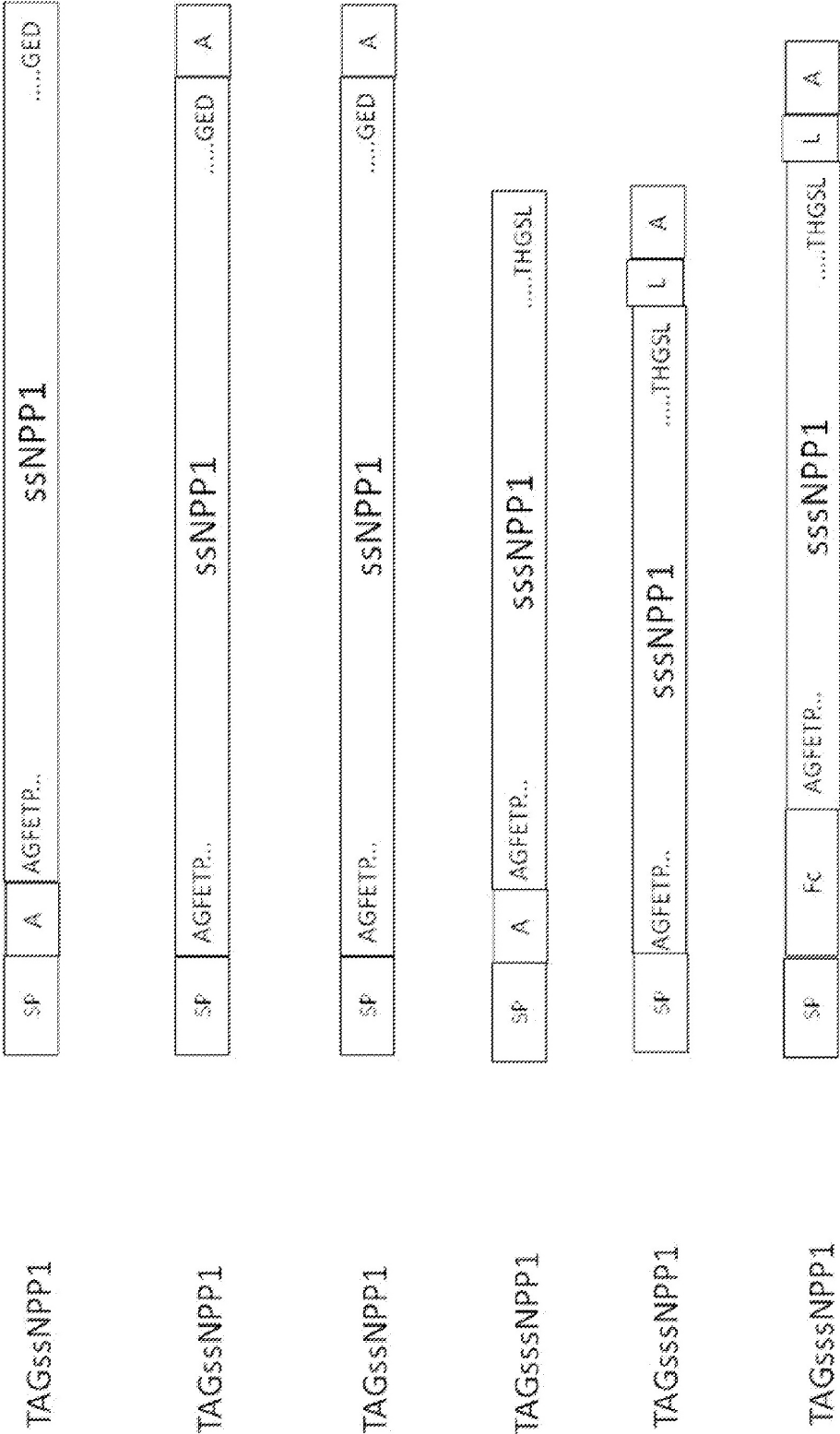


Fig. 22C