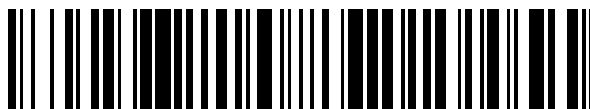


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 887 039**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2005 E 18173111 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.08.2021 EP 3404102**

54 Título: **Conjugados para administración ósea y procedimiento de uso de estos para dirigir proteínas al hueso**

30 Prioridad:

21.04.2004 US 56382804 P

23.07.2004 US 59034704 P

04.10.2004 US 61498404 P

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

21.12.2021

73 Titular/es:

ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

121 Seaport Boulevard

Boston, MA 02210, US

72 Inventor/es:

CRINE, PHILIPPE;

BOILEAU, GUY;

LEMIRE, ISABELLE y

LOISEL, THOMAS P.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 887 039 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

Conjugados para administración ósea y procedimiento de uso de estos para dirigir proteínas al hueso

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a conjugados para administración ósea y a un procedimiento para utilizar los mismos para dirigir proteínas al hueso. Más específicamente, la presente invención se refiere a composiciones para administración ósea que comprenden motivos peptídicos, modificados dentro de la estructura de una proteína a través de tecnología de ADN recombinante para promover la unión a la matriz ósea.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los avances tecnológicos en biología molecular, la producción de proteínas recombinantes y la purificación de proteínas a gran escala han permitido la producción de grandes cantidades de proteínas que ahora se utilizan como productos biofarmacéuticos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales y las formas solubles del receptor TNF- α se han utilizado en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tales como la enfermedad de Crohn o varias formas de psoriasis (1). Otro ejemplo de uso de proteína recombinante es la terapia de reemplazo enzimático (ERT). La ERT se ha utilizado para tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico. Este grupo de trastornos genéticos se caracteriza por la pérdida de la función de las enzimas lisosómicas, lo que produce patologías somáticas, y a veces neuronales, graves. En la ERT para estas enfermedades, los pacientes reciben una infusión con grandes dosis de enzimas normales. Estas enzimas infundidas después se interiorizan desde la circulación a través de los receptores de la superficie celular (receptor de manosa-6 fosfato) e ingresan en la vía endocítica en el camino hacia el sitio de acción, el lisosoma. No todos los intentos de tratar los trastornos genéticos a través de la ERT han resultado exitosos.

La hipofosfatasa es un tipo raro y hereditario de raquitismo u osteomalacia que ocurre con una incidencia de 1 por cada 100.000 nacimientos para la forma más grave de la enfermedad. Las formas más leves son más frecuentes. En este defecto del metabolismo innato, las mutaciones inactivan el gen que codifica la isoenzima no específica del tejido de la fosfatasa alcalina. Se caracteriza bioquímicamente por una actividad subnormal de la fosfatasa alcalina en suero. La deficiencia de fosfatasa alcalina en los osteoblastos y condrocitos deteriora la mineralización esquelética, lo que produce raquitismo u osteomalacia.

Existe una gama muy amplia de expresividad de la hipofosfatasa, que va desde una forma perinatal que a menudo causa el nacimiento de bebés muertos debido a un esqueleto sin mineralizar, hasta una forma más suave que solo presenta la pérdida prematura de los dientes. Los bebés y los niños gravemente afectados heredan la hipofosfatasa como un rasgo autosómico recesivo. Existen cuatro formas principales de la enfermedad: perinatal, infantil, de la niñez y adulta. La hipofosfatasa perinatal se manifiesta durante la gestación y la mayoría de los recién nacidos afectados sobreviven por poco tiempo. La hipofosfatasa infantil se manifiesta clínicamente antes de los 6 meses de edad. Aproximadamente el 50 % de los pacientes muere en un año. La hipofosfatasa de la niñez varía enormemente en cuanto a la gravedad, pero la mayoría de estos pacientes sufrirán síntomas esqueléticos a lo largo de su vida. La hipofosfatasa en adultos aparece durante la mediana edad, con síntomas tales como fracturas dolorosas por esfuerzos recurrentes que tienen una curación deficiente.

Los osteoblastos y los condrocitos son normalmente ricos en fosfatasa alcalina no específica del tejido donde se adhiere a la superficie celular. En la hipofosfatasa, la falta de actividad de la fosfatasa alcalina provoca la acumulación extracelular de tres compuestos de fósforo que se cree que son sustratos de la enzima: fosfoetanolamina (PEA), pirofosfato inorgánico (PPI) y piridoxal 5'-fosfato (PLP). El PPI es un inhibidor del crecimiento de cristales de hidroxiapatita, y la acumulación de PPI en la enfermedad explica el deterioro de la mineralización esquelética. En consecuencia, el suministro de enzimas activas a los pacientes que sufren de hipofosfatasa disminuye los niveles de PPI extracelular y mejora la mineralización esquelética.

Actualmente, no existe una terapia médica establecida para la hipofosfatasa. Los ensayos de reemplazo de enzimas mediante infusiones intravenosas de fosfatasa alcalina han fracasado. Parece que la actividad de la fosfatasa alcalina se debe aumentar no en la circulación sino en el esqueleto mismo. Esta hipótesis se confirmó recientemente por el trasplante de médula ósea. Lamentablemente, los beneficios del trasplante solo duraron un período corto debido a un injerto deficiente.

Por lo tanto, es necesario proporcionar un enfoque de terapia de reemplazo enzimático para proporcionar enzimas activas al esqueleto de los pacientes que sufren hipofosfatasa.

Las proteínas dirigidas a los huesos podrían ser útiles no solo para el tratamiento o la prevención de la hipofosfatasa (pérdida de la función de la fosfatasa alcalina), sino también para el tratamiento o la prevención de otras enfermedades genéticas caracterizadas por una actividad enzimática defectuosa implicada en el metabolismo óseo, tal como raquitismo hipofosfatémico ligado a X (XLH) (pérdida de la función del gen regulador del fosfato con homología a endopeptidasas en el cromosoma X (PHEX)).

El XLH es la más prevalente de las hipofosfatemias familiares (OMIM 307800, 307810). Se caracteriza por una reducción de la reabsorción de fosfato en el riñón, hipofosfatemia, normocalcemia, niveles plasmáticos de 1,25-dihidroxitamina D3 (1,25(OH)₂D, calcitriol) de normales a bajos, función normal de la glándula paratiroides y actividad elevada de la fosfatasa alcalina plasmática. Estos cambios están asociados con el retraso del crecimiento, la deformidad de las extremidades inferiores, la evidencia radiológica e histomorfológica del raquitismo y la osteomalacia. Esta enfermedad parece ser el resultado de la combinación de defectos renales en la reabsorción de fosfato tubular y el metabolismo de la vitamina D, así como un trastorno funcional en los huesos y los dientes. El XLH es el resultado de la inactivación de mutaciones en el gen PHEX, un miembro de la familia de la metalopeptidasa de zinc de las glicoproteínas de membrana integral tipo II. Estas mutaciones impiden la expresión de una enzima PHEX funcional en la superficie celular de los osteoblastos. Hasta ahora, el tratamiento de los pacientes con XLH se limita a la suplementación con complementos de fosfato inorgánico (Pi) orales en cuatro o cinco dosis divididas por día, y la coadministración de 1,25(OH)₂D para compensar la síntesis inadecuada de 1,25(OH)₂D. Estas altas dosis de fosfato con frecuencia provocan intolerancias gastrointestinales, particularmente diarrea, lo que lleva al incumplimiento del paciente. Por un lado, la carga de fosfato conlleva el riesgo de provocar un hiperparatiroidismo secundario (que puede ser lo suficientemente grave como para requerir una paratiroidectomía) mientras que, por otro, la administración de un exceso de 1,25(OH)₂D puede provocar hipercalcemia, hipercalcemia y nefrocalcinosis.

Por lo tanto, la ERT útil para el XLH trataría de reemplazar la enzima PHEX defectuosa en pacientes con XLH por una enzima funcional obtenida a través de tecnología de ADN recombinante. Como la enzima PHEX normal está anclada en la membrana plasmática de los osteoblastos por un péptido hidrofóbico, la forma natural de PHEX no puede ser producida y purificada en cantidades suficientes para su uso en un preparado farmacéutico. Para evitar el problema, se diseñó y se produjo una forma soluble de PHEX recombinante (o sPHEX) en cultivos celulares, se purificó y se formuló para administración intravenosa (IV) (WO 00/50580). sPHEX se inyectó posteriormente en ratones *Hyp*, un modelo de ratón para el XLH, tal como se describe en la solicitud estadounidense pendiente de aprobación n.º 10/362.259. Se observó una mejora de diversos parámetros séricos relacionados con el hueso, incluida una reducción de los niveles anormalmente altos de fosfatasa alcalina sérica. Aunque estos experimentos fueron exitosos, se creyó que la eficacia del sPHEX terapéutico podría aumentar si la proteína recombinante se modificaba para promover su unión a los minerales óseos.

Por lo tanto, se necesitan medios para dirigir con éxito las proteínas a la matriz ósea.

Se sabe que los bifosfonatos presentan una unión de afinidad alta con la hidroxiapatita (HA), y se han utilizado para dirigir moléculas pequeñas (4) y proteínas (5) a los huesos. Sin embargo, esta estrategia requiere modificaciones químicas de las proteínas purificadas y presenta varias desventajas, entre ellas una posible interferencia con la actividad de las proteínas y etapas de purificación adicionales.

Otra estrategia para dirigir moléculas pequeñas a los huesos ha sido conjugar estas entidades con péptidos ácidos como el poli-Asp (6). Esta estrategia se desarrolló tras la observación de que diversas proteínas sintetizadas por osteoblastos, las células formadoras de huesos, se unen a la matriz ósea a través de secuencias particularmente ricas en residuos de aminoácidos ácidos (Asp y Glu). Este es el caso de la osteopontina (7) y la sialoproteína ósea, dos proteínas no colagenosas. Por lo tanto, se utilizaron péptidos ácidos (E₂₋₁₀ y D₂₋₁₀) para dirigir moléculas pequeñas (es decir, metotrexato, FITC, Fmoc, biotina, estradiol) a la hidroxiapatita *in vitro*. Se utilizaron péptidos ácidos (E₆ y O₆₋₁₀) para dirigir moléculas pequeñas (es decir, FITC, Fmoc, estradiol) a la hidroxiapatita *in vivo*. Por último, se demostró que E₆ confiere a BSA, hemoglobina y IgG la capacidad de unirse a la hidroxiapatita *in vitro*. En todos los casos anteriores, la unión de la secuencia ácida se realizó químicamente.

El documento WO 95/05456 A1 describe composiciones farmacéuticas que comprenden una fosfatasa, así como su uso para tratar o curar complicaciones clínicas mediadas por endotoxina.

Whyte M.P. (1994; Endocrine Reviews, 15(4): 439-461) es un artículo de reseña sobre la hipofosfatasa y el papel de la fosfatasa alcalina en la mineralización esquelética.

La presente invención busca abordar estas y otras necesidades.

RESUMEN DE LA INVENCION:

La presente invención muestra que las moléculas grandes y complejas, como las proteínas, pueden fusionarse con péptidos ácidos para dirigirse con éxito al hueso *in vivo*.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de administración ósea que tiene la estructura:

Z-sALP-Y-Dn-X

donde X está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido;

Y está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido;

Z está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido;

5 Dn es un poliaspartato, donde $n=10$ a 16; y

sALP es una alcalina fosfatasa soluble;

10 y un disolvente acuoso estéril farmacéuticamente aceptable que comprende una solución de cloruro de sodio tamponada formulada para administración parenteral.

Se describe un conjugado para administración ósea que tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en: A) X-Dn-Y-proteína-Z; y B) Z-proteína-Y-Dn-X, donde X está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido; Y está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido; Z está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido; y Dn es un poli aspartato donde $n = 10$ a 16. Se describe que la proteína en el conjugado para administración ósea es un gen regulador de fosfato soluble con homología para las endopeptidasas en el cromosoma X (sPHEX).

Se describe que la estructura del conjugado es: X-Dn-Y-sPHEX-Z. En otra descripción, el sPHEX tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 46 a 749 de la figura 10; 47 a 749 de la figura 10; 48 a 749 de la figura 10; 49 a 749 de la figura 10; 50 a 749 de la figura 10; 51 a 749 de la figura 10; 52 a 749 de la figura 10; 53 a 749 de la figura 10; y 54 a 749 de la figura 10. En una descripción de estos conjugados de administración ósea, n es 10. En otra descripción de este conjugado de administración ósea, n es 11. En otra descripción de este conjugado de administración ósea, n es 12. En otra descripción de este conjugado de administración ósea, n es 13. En otra descripción de este conjugado de administración ósea, n es 14. En otra descripción de este conjugado de administración ósea, n es 15. En otra descripción de este conjugado de administración ósea, n es 16. En una descripción más específica, el sPHEX consiste en la secuencia de aminoácidos 46 a 749 de la Figura 10 y $n=10$.

En la composición farmacéutica de la presente invención, la proteína en el conjugado es una alcalina fosfatasa soluble (sALP). La estructura del conjugado es: Z-sALP-X-Dn-Y. En una realización específica, sALP es codificada por la secuencia que se establece en la Figura 16A. En otra realización específica, sALP tiene la secuencia que se establece en la Figura 16B. En una realización específica de estos conjugados de administración ósea, n es 10. En otra realización específica de este conjugado de administración ósea, n es 11. En otra realización específica de este conjugado de administración ósea, n es 12. En otra realización específica de este conjugado de administración ósea, n es 13. En otra realización específica de este conjugado de administración ósea, n es 15. En otra realización específica de este conjugado de administración ósea, n es 16. En una realización más específica, $n=10$.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: un polinucleótido codificante de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se presenta en la figura 8; un polinucleótido codificante de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se presenta en la figura 11; un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos como se presenta en la figura 7; una secuencia de nucleótidos completamente complementaria con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a), (b) o (c); y una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar en condiciones de rigurosidad elevada con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a), (b), (c) o (d), donde las condiciones de rigurosidad alta comprenden: prehibridación e hibridación en 6XSSC, 5Xreactivo de Denhardt, SDS al 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 68 °C; y lavados en 2XSSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente durante 10 min; en 2XSSC y SDS al 0,1 % a temperatura ambiente durante 10 min; y en 0,1XSSC y SDS al 0,5 % a 65 °C tres veces durante 5 minutos.

50 También se proporciona un vector recombinante que comprende dicha secuencia. También se proporciona una célula hospedadora recombinante que comprende dicho vector.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos como se presenta en la figura 17A; un polinucleótido codificante de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se presenta en la figura 17B; una secuencia de nucleótidos completamente complementaria con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a) o (b); y una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar en condiciones de rigurosidad elevada con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a), (b) o (c), donde las condiciones de rigurosidad alta comprenden: prehibridación e hibridación en 6XSSC, 5Xreactivo de Denhardt, SDS al 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 68 °C; y lavados en 2XSSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente durante 10 min; en 2XSSC y SDS al 0,1 % a temperatura ambiente durante 10 min; y en 0,1XSSC y SDS al 0,5 % a 65 °C tres veces durante 5 minutos.

65 También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada codificante de PHEX soluble funcional que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 54 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX

que comprende los aminoácidos 53 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 52 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 51 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 50 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 49 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 48 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 47 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 46 a 749 como se presenta en la figura 10; una secuencia de nucleótidos completamente complementaria con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a) a (i); y una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar en condiciones de rigurosidad elevada con cualquiera de las secuencias de nucleótidos (a) a (j), donde las condiciones de rigurosidad alta comprenden: prehibridación e hibridación en 6XSSC, 5Xreactivo de Denhardt, SDS al 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 68 °C; y lavados en 2XSSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente durante 10 min; en 2XSSC y SDS al 0,1 % a temperatura ambiente durante 10 min; y en 0,1XSSC y SDS al 0,5 % a 65 °C tres veces durante 5 minutos. En otra realización, la molécula de ácido nucleico aislada además comprende en su extremo 5', un polinucleótido codificante de un poli-aspartato seleccionado del grupo que consiste en D₁₀ a D₁₆.

También se proporciona un polipéptido de sPHEX aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: aminoácidos 54 a 749 como se presenta en la figura 10; aminoácidos 53 a 749 como se presenta en la figura 10; aminoácidos 52 a 749 como se presenta en la figura 10; aminoácidos 51 a 749 como se presenta en la figura 10; aminoácidos 50 a 749 como se presenta en la figura 10; aminoácidos 49 a 749 como se presenta en la figura 10; aminoácidos 48 a 749 como se presenta en la figura 10; aminoácidos 47 a 749 como se presenta en la figura 10; y aminoácidos 46 a 749 como se presenta en la figura 10.

También se proporciona una composición para administración ósea que comprende un conjugado para administración ósea y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona un procedimiento para administrar una proteína a tejido óseo de un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad efectiva de un conjugado para administración ósea.

También se proporciona un procedimiento para administrar sPHEX a tejido óseo de un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad efectiva de un conjugado para administración ósea.

También se proporciona un procedimiento para administrar ALP a tejido óseo de un mamífero que lo necesita que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad efectiva de un conjugado para administración ósea.

También se proporciona un procedimiento para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de gen regulador de fosfato funcional con homología para las endopeptidasas en el cromosoma X (PHEX) que comprende administrar a un mamífero que lo necesita un conjugado, donde dicho conjugado se encuentra en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una descripción, la afección o la enfermedad es raquitismo hipofosfático ligado a X (XLH).

También se proporciona un procedimiento para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de fosfatasa alcalina funcional que comprende administrar a un mamífero que lo necesita un conjugado, donde dicho conjugado se encuentra en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una descripción, la afección o la enfermedad es hipofosfatasa.

También se proporciona un uso de un conjugado para administración ósea de la descripción para administrar una proteína al tejido óseo de un mamífero.

También se proporciona un uso de un conjugado para administración ósea de la descripción para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de gen regulador de fosfato funcional con homología para las endopeptidasas en el cromosoma X (PHEX), donde dicho conjugado se encuentra en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona un uso de un conjugado para administración ósea en la fabricación de un medicamento para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de gen regulador de fosfato funcional con homología para las endopeptidasas en el cromosoma X (PHEX). En una descripción, la afección o la enfermedad es raquitismo hipofosfático ligado a X (XLH).

También se proporciona un uso de un conjugado para administración ósea de la descripción para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de fosfatasa alcalina funcional, donde dicho conjugado se encuentra en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona un uso de un conjugado para administración ósea de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una

falta de o una cantidad insuficiente de fosfatasa alcalina funcional, donde dicho conjugado se encuentra en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una descripción, la afección o la enfermedad es hipofosfatasa.

También se proporciona un procedimiento para evaluar péptidos para uso en un conjugado de proteína-péptido para administración ósea que comprende las etapas de: fusionar un péptido candidato con una proteína indicadora para formar un conjugado de proteína-péptido; poner en contacto el conjugado con tejido óseo o la fase mineral del hueso; y donde el péptido candidato se selecciona cuando la presencia de la proteína indicadora en el tejido óseo o la fase mineral del hueso es mayor cuando se conjuga con el péptido candidato que cuando no lo hace.

Según otra realización específica de la composición farmacéutica de la presente invención, el conjugado para administración ósea de una proteína se fusiona a un péptido seleccionado del grupo que consiste en deca-aspartato (D₁₀) a hexadeca-aspartato (D₁₆).

En una descripción, el sPHEX está fusionado en su extremo N a D₁₀. En otra descripción, el sPHEX está fusionado en su extremo N a D₁₁. En otra descripción, el sPHEX está fusionado en su extremo N a D₁₂. En otra descripción, el sPHEX está fusionado en su extremo N a D₁₃. En otra descripción, el sPHEX está fusionado en su extremo N a D₁₄. En otra descripción, el sPHEX está fusionado en su extremo N a D₁₅. En otra descripción, el sPHEX está fusionado en su extremo N a D₁₆.

Según realizaciones específicas de composiciones farmacéuticas de la presente invención, el sALP está fusionado en el extremo C a D₁₀. En otra realización específica, el sALP está fusionado en el extremo C a D₁₁. En otra realización específica, el sALP está fusionado en el extremo C a D₁₂. En otra realización específica, el sALP está fusionado en el extremo C a D₁₃. En otra realización específica, el sALP está fusionado en el extremo C a D₁₄. En otra realización específica, el sALP está fusionado en el extremo C a D₁₅. En otra realización específica, el sALP está fusionado en el extremo C a D₁₆.

Se entiende que se puede utilizar cualquier proteína soluble funcional en el conjugado. Aunque los resultados para los conjugados que comprenden un sPHEX o sALP específicos están presentes en la presente solicitud, se entiende que se puede utilizar cualquier otro sPHEX o sALP funcionales.

sPHEX

Tal como se usa en la presente, sPHEX significa cualquier fragmento biológicamente activo soluble de PHEX o muteína de este. Los expertos en la técnica pueden preparar construcciones de expresión diferentes de las que se describen expresamente en la presente para la producción óptima de **sPHEX** en líneas celulares adecuadas transfectadas con este. Además, los expertos pueden diseñar fragmentos de ADNc codificantes de fragmentos biológicamente activos adecuados y muteínas de PHEX de origen natural que poseen la misma actividad biológica o similar que la enzima de longitud completa de origen natural.

Para crear una fuente recombinante para sPHEX, se puede construir y evaluar una amplia serie de vectores de expresión en cuanto a la expresión de un ADNc de PHEX. Basándose en los experimentos de transfección transitoria, así como en las transfecciones estables, se puede identificar una construcción de expresión que proporcione un nivel particularmente alto de expresión.

Sin estar así limitados, queda abarcado por la descripción cualquier sPHEX que comprende al menos una porción de ectodominio de PHEX natural que comienza con la cisteína en la posición 54 de la secuencia presentada en la figura 10.

Los conjugados según la presente descripción por lo tanto son cualquier sPHEX que comprende este fragmento de 54-749 del PHEX natural, preferentemente el fragmento natural 53-749, más preferentemente el fragmento natural 52-749, más preferentemente el fragmento natural 51-749, más preferentemente el fragmento natural 50-749, más preferentemente el fragmento natural 49-749, más preferentemente el fragmento natural 48-749, más preferentemente el fragmento natural 47-749, más preferentemente el fragmento natural 46-749, junto con un poli-aspartato seleccionado del grupo que consiste en D₁₀ a D₁₆ fusionado inmediatamente corriente arriba de este fragmento.

El conjugado además puede comprender opcionalmente uno o más aminoácidos adicionales 1) corriente arriba del poli-aspartato; y/o 2) entre el poli-aspartato y el fragmento natural o el equivalente funcional. Estos aminoácidos pueden ser cualquier aminoácido. Se pueden seleccionar de forma independiente del grupo que consiste en cualquier aminoácido excepto la cisteína, la prolina y el triptófano, a saber, los aminoácidos que se sabe que inducen la formación de enlaces disulfuro o cambios en la conformación.

Estos aminoácidos pueden estar presentes en el conjugado cuando, por ejemplo, la estrategia de clonación utilizada para producirlo los introduce en estas ubicaciones.

De acuerdo con las estrategias de clonación específicas, los aminoácidos ubicados corriente arriba del poli-aspartato en el PHEX escindible recombinante se pueden seleccionar de acuerdo con parámetros conocidos para proporcionar un sustrato adecuado para enzimas específicas de la vía de secreción (p. ej., furina o peptidasa señal) de la célula hospedadora que se utilizará para escindir los PHEXs escindibles recombinantes producidos en un sPHEX dirigido a huesos secretado. La probabilidad de que una secuencia diseñada sea escindida por la peptidasa señal de la célula hospedadora se puede predecir mediante un algoritmo informático apropiado como el descrito en Bendtsen y col. (J Mol Biol. 16 de julio de 2004;340(4):783-95) y que está disponible en la Web en <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> que considera parámetros incluidos los siguientes: los aminoácidos en la posición -3 y -1 del sitio de escisión por la peptidasa señal tienen de forma deseable cadenas laterales pequeñas y no cargadas. Preferentemente, en la posición -1: Ala, Ser, Gly, Cys, Thr y, a veces, Gin, Pro y Leu. De forma similar, aquellos en la posición -3, deben ser preferentemente: Ala, Ser, Gly, Cys, Thr, Ile, Leu, Val. Además, los aminoácidos en la posición -6 y -4 del sitio de escisión son de forma deseable aquellos capaces de inducir la formación de residuos de giro beta (tal como Pro).

La presente descripción abarca por tanto conjugados que comprenden aminoácidos adicionales que se pueden seleccionar basándose en la estrategia de clonación utilizada para producir un PHEX recombinante escindible. Por lo tanto, el PHEX recombinante escindible descrito en los ejemplos 3 y 4 abajo contiene dichos aminoácidos adicionales corriente arriba del poli-aspartato y entre el poli-aspartato y la secuencia de ectodominio natural. Además, la presente descripción abarca un conjugado que comprende la secPHEX descrita en la solicitud n.º WO 02/15918 preparada mediante la fusión del fragmento de extremo N NL-1 que comprende un sitio de furina para el ectodominio natural de PHEX con el vector pCDNA3/RSV/NL-1-PHEX, y un secPHEX que comprende un fragmento de inmunoglobulina en el extremo N. Más específicamente, la figura 12 presenta esquemáticamente la estructura de secPHEXs que comprenden aminoácidos adicionales corriente arriba del fragmento del ectodominio de 46-749 PHEX natural. Las construcciones n.º 1 a 3 y 5 se pueden fusionar a un poli-aspartato y utilizarse como conjugados de la presente invención. La construcción n.º 4 constituye un conjugado de la descripción: comprende un poli-aspartato D₁₀ y un fragmento de ectodominio natural.

Los conjugados de la presente descripción también abarcan adicionalmente sPHEXs que comprenden eliminaciones en el extremo C que no afectan su actividad enzimática.

Además, la presente descripción comprende conjugados donde el poli-aspartato estaría unido en el extremo C del fragmento de ectodominio de PHEX natural.

sALP

ALP es una proteína unida a membrana anclada a través de un glicolípido a su extremo C. Este anclaje de glicolípido (GPI) se agrega postraduccionalmente después de la eliminación de un extremo C hidrofóbico que actúa como anclaje de membrana transicional y como una señal para el agregado de GPI. Por lo tanto, el sALP utilizado en el ejemplo 6 en la presente está constituido por un ALP donde el primer aminoácido de la secuencia de extremo C hidrofóbica, a saber, alanina, es reemplazado por un codón de parada. El ALP soluble formado de este modo contiene todos los aminoácidos de la forma natural y, por lo tanto, anclada activa de ALP.

Los conjugados de sALP en las composiciones farmacéuticas según las realizaciones específicas de la presente invención son por tanto cualquier sALP junto con un poli-aspartato seleccionado del grupo que consiste en D₁₀ a D₁₆ fusionado inmediatamente corriente abajo de este fragmento.

El conjugado además puede comprender opcionalmente uno o más aminoácidos adicionales 1) corriente arriba del poli-aspartato; y/o 2) entre el poli-aspartato y el fragmento de sALP natural o el equivalente funcional. Este es el caso, por ejemplo, cuando la estrategia de clonación utilizada para producir el conjugado de direccionamiento óseo introduce aminoácidos exógenos en estas ubicaciones. Sin embargo, los aminoácidos exógenos se deben seleccionar de modo que no proporcionen un sitio de transaminación adicional. La probabilidad de que una secuencia diseñada sea escindida por la transaminasa de la célula hospedadora se puede predecir según lo descrito por Ikezawa (Biol Pharm. Bull. 2002, 25(4) 409-417).

Los conjugados en las composiciones farmacéuticas de la presente invención también abarcan adicionalmente sALPs que comprenden eliminaciones en el extremo N que no afectan su actividad enzimática.

Además, la presente descripción comprende conjugados donde el poli-aspartato estaría unido en el extremo N del fragmento anclado a ALP natural o su fragmento biológicamente activo.

El término "proteína recombinante" se utiliza en la presente para hacer referencia a una proteína codificada por un ácido nucleico manipulado genéticamente insertado en una célula hospedadora procarionte o eucariota. El ácido nucleico se ubica generalmente dentro de un vector, tal como un plásmido o un virus, según sea adecuado para la célula hospedadora. Aunque *E. coli* se ha utilizado como un hospedador para expresar los conjugados en los ejemplos presentados en la presente, un experto en la técnica comprenderá que se puede usar una serie de otros hospedadores

para producir proteínas recombinantes de acuerdo con los procedimientos que son rutina en la técnica. Se describen procedimientos representativos en Maniatis y col. Cold Springs Harbor Laboratory (1989). "Proteína escindible recombinante", según se usa en la presente, se refiere a una proteína recombinante que se puede escindir por una enzima del hospedador para producir una proteína secretada/soluble.

El término "fragmento de ectodominio" significa en la presente, cuando se utiliza con relación a PHEX, el fragmento de PHEX que se ubica fuera de la membrana celular cuando se encuentra en su forma natural.

La expresión "tejido óseo" se utiliza en la presente para referirse a un tejido sintetizado por osteoblastos compuesto por una matriz orgánica que contiene mayoritariamente colágeno y mineralizada por el depósito de cristales de hidroxiapatita.

Las proteínas de fusión comprendidas por los conjugados para administración ósea de las composiciones farmacéuticas de la presente invención son útiles para el tratamiento terapéutico de las afecciones de defectos óseos porque proporcionan una cantidad efectiva de la proteína de fusión al hueso. Se describe que la proteína de fusión se proporciona en forma de una composición farmacéutica en cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable estándar, y se administra mediante cualquier procedimiento estándar, por ejemplo, mediante inyección intravenosa.

La expresión "vehículo farmacéutico aceptable" se utiliza en la presente para hacer referencia, cuando se elige la administración parenteral como vía de administración, a disolventes, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables. Algunos ejemplos de disolventes no acuosos son el propilenglicol, el polietilenglicol, el aceite vegetal, el aceite de pescado y los ésteres orgánicos inyectables. Los disolventes acuosos incluyen agua; soluciones de agua-alcohol; solución salina fisiológica; vehículos parenterales médicos amortiguados que incluyen solución de cloruro de sodio, solución de dextrosa de Ringers, solución de dextrosa más cloruro de sodio, regeneradores de fluidos y nutrientes; regeneradores de electrolitos; solución de Ringer que contiene lactosa o aceites fijos.

El término "cantidad efectiva" se utiliza en la presente para hacer referencia a la cantidad mínima de una composición farmacéutica que se debe administrar a un mamífero para lograr un efecto terapéutico significativo. Las dosificaciones dependerán de muchos factores, incluido el modo de administración. Típicamente, la cantidad de proteína presente dentro de una dosis única será una cantidad que impida, retrase o trate de forma efectiva una afección no deseada relacionada con los huesos sin inducir toxicidad significativa. En particular, una cantidad efectiva de las composiciones de la presente invención comprenderá una cantidad de proteína de fusión que provocará un alivio significativo de los síntomas clínicos de la afección.

La cantidad efectiva se puede proporcionar por día, por semana, por mes o fracciones de estos. Típicamente, se puede administrar una composición farmacéutica de la invención en una cantidad de entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por día (p. ej., 10 mg, 50 mg, 100 mg o 250 mg). Las dosificaciones se pueden proporcionar en un régimen de dosificación única o múltiple. Por ejemplo, preferentemente, la cantidad efectiva es una dosis en el intervalo de entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 25 gramos del conjugado que se va a dirigir al hueso por día, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 10 gramos del conjugado que se va a dirigir al hueso por día, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 5 gramos del conjugado que se va a dirigir al hueso por día, entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 25 gramos del conjugado que se va a dirigir al hueso por semana, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 10 gramos del conjugado que se va a dirigir al hueso por semana, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 5 gramos del conjugado que se va a dirigir al hueso cada dos días y aproximadamente 1 gramo del conjugado que se va a dirigir al hueso una vez por semana.

Esto es solo una guía, ya que la dosis real debe ser seleccionada cuidadosamente y titulada por el médico tratante basándose en los factores clínicos exclusivos para cada paciente. La dosis diaria óptima será determinada por los procedimientos conocidos en la técnica y se verá afectada por factores tales como la edad del paciente y otros factores clínicamente pertinentes. Además, los pacientes pueden estar tomando medicamentos para otras enfermedades o afecciones. Los otros medicamentos se pueden continuar durante el tiempo que la proteína para administración al hueso se proporcione al paciente, pero es aconsejable, en particular, en dichos casos, comenzar con dosis bajas para determinar si se experimentan efectos secundarios adversos.

La expresión "condiciones de rigurosidad elevada" se refiere a condiciones que permiten secuencias con una homología alta para la unión. Sin limitarse en ese sentido, se enumeran ejemplos de dichas afecciones en el manual "Molecular cloning, a laboratory manual, segunda edición de 1989 de Sambrook y col.: 6XSSC o 6XSSPE, con o sin reactivo de Denhardt, SDS al 0,5 % y la temperatura utilizada para obtener condiciones de rigurosidad elevada suele ser de aproximadamente 68 °C (véanse las páginas 9.47 a 9.55 de Sambrook) para el ácido nucleico de 300 a 1500 nucleótidos. Aunque la temperatura óptima que se va a utilizar para una sonda de ácido nucleico específica se puede calcular empíricamente, y aunque existe la posibilidad de alternativas en las condiciones del amortiguador seleccionadas, dentro de estos intervalos de condiciones muy conocidos, el ácido nucleico captado no variará significativamente. De hecho, Sambrook indica claramente que la "elección depende en gran medida de la preferencia personal" (véase la página 9.47). Sambrook especifica que la fórmula para calcular la temperatura óptima que varía

de acuerdo con la fracción de guanina y citosina en la sonda de ácido nucleico y la longitud de la sonda (10 a 20 °C inferior que T_m donde $T_m = 81,5\text{ °C} + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41(\text{fracción G+C}) - 0,63\text{ (\% de formamida -(600/l))}$) (véanse las páginas 9,50 y 9,51 de Sambrook).

5 Otros objetivos, ventajas y características de la presente invención se harán más evidentes al leer la siguiente descripción no restrictiva de sus realizaciones preferidas, proporcionadas a modo de ejemplo solo con referencia a los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10

En los dibujos adjuntos:

La figura 1 presenta el estado de pureza de las proteínas GST y GST-D₁₀ en un gel de poliacrilamida SDS después de la cromatografía de CL-4B;

15

La figura 2 muestra la estimulación de la unión de GST al hueso por los motivos peptídicos D₆, D₁₀ y D₁₆ a través del porcentaje de la dosis inyectada de GST recombinante que se encuentra asociado con tejidos específicos;

20

La figura 3 proporciona una representación esquemática del plásmido pCDNA3-RSV- D₁₀sPHEX-vector NEO;

25

La figura 4 presenta un perfil cromatográfico de la detección a 280 nm del flujo de PHEX para SP-Sepharose™ HP (A) y blue-Sepharose HP (B). La línea recta representa la proporción de amortiguador;

30

La figura 5 presenta un análisis de SDS-PAGE teñido Sypro-ruby™ de las diferentes fracciones recolectadas a través del procedimiento de purificación de D₁₀sPHEX;

35

La figura 6 muestra la variación en los niveles de fosfatasa alcalina sérica (ALP) observados en ratones Hyp inyectados diariamente con dosis i.v. de sPHEX y D₁₀-sPHEX durante 14 días. Los valores U/l representan la disminución observada entre el día - 3 (correspondiente en la gráfica a 0 U/l) y el día 15 del régimen de inyección y son el promedio de las medidas realizadas en 6 animales;

40

La figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ADN recombinante codificante de una proteína escindible para producir D₁₀-sPHEX (SEQ ID NO: 1);

45

La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos codificada por D₁₀-sPHEX de la figura 7 (SEQ ID NO: 2);

La figura 9 compara la unión a la fase mineral del hueso de las proteínas (A. GST B. sPHEX) con el de sus contrapartes fusionadas a deca-aspartato;

50

La figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos de un PHEX natural (o unido a membrana) (SEQ ID NO: 3);

La figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de un conjugado de D₁₀-sPHEX producido mediante la escisión de la proteína escindible recombinante de la figura 8;

55

La figura 12 ilustra esquemáticamente la estructura y las actividades de diversas construcciones de secPHEX;

La figura 13 ilustra gráficamente a través de medición fluorimétrica la actividad de la fosfatasa alcalina en el extracto celular soluble y el medio usado de HEK293 transfectadas transitoriamente con los vectores de expresión codificantes de sALP-D₁₀ y sALP;

60

La figura 14 ilustra gráficamente la detección de sALP y sALP-D₁₀ por análisis de transferencia Western con el anticuerpo B4-78 específico en los medios usados y el extracto celular de HEK-293 después de la transfección transitoria. (Panel A: tinción roja de Ponceau; Panel B: análisis de transferencia α-B4-78). A la izquierda se muestran los tamaños de los marcadores de peso molecular;

65

La figura 15 muestra gráficamente la unión a la fase mineral ósea de un deca-aspartato fusionado a la fosfatasa alcalina secretada;

La figura 16 muestra A. la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 5) de una fosfatasa alcalina soluble; y B. la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de esa fosfatasa alcalina soluble;

70

La figura 17 muestra A. la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 7): codificante de un conjugado de la presente invención, a saber, sALP-D₁₀; y B. la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de ese conjugado; y

75

La figura 18 muestra gráficamente el efecto de D₁₀-sALP sobre la inhibición de la mineralización mediada por PPI.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

5 La presente invención mostró que los péptidos poli-asparticos específicos fusionados en marco a una proteína, como se ejemplifica en la presente por la proteína glutatión-S-transferasa (GST), utilizada como una proteína indicadora, por sPHEX y por sALP, pueden aumentar significativamente la capacidad de unión ósea de estas proteínas.

La presente invención se ilustra en mayor detalle mediante lo siguientes ejemplos no limitantes.

La tabla 1 presenta la secuencia de oligonucleótidos utilizada en los ejemplos 1 a 7.

EJEMPLO 1**Unión ósea de GST-D₆, GST-D₁₀ y GST-D₁₆**

Se utilizó tecnología de ADN recombinante para generar un plásmido que contiene un ácido nucleico codificante de GST seguido en marco por un ácido nucleico codificante de un péptido ácido D₆, D₁₀ o D₁₆. Para obtener los conjugados de GST-D₆, GST-D₁₀ y GST-D₁₆, el oligonucleótido de SEQ ID NO:9 (véase la tabla 1) se mezcló en primer lugar con el oligonucleótido de SEQ ID NO:10, el oligonucleótido de SEQ ID NO:11 mezclado con el oligonucleótido de SEQ ID NO:12, y el oligonucleótido de SEQ ID NO:13 mezclado con el oligonucleótido de SEQ ID NO:14. Este procedimiento generó oligonucleótidos dúplex codificantes para D₆, D₁₀ y D₁₆, respectivamente, y que tienen extremidades compatibles con la clonación en el plásmido pGEX3T-4 (Pharmacia biotechnology) predigerido con las endonucleasas de restricción BamHI y NotI. Se transformaron los vectores pGEX3T-4 en proteasa AP401 menos la cepa de bacterias *E. coli* (*lon::mini tetRara-Δlac-pro nalA argEam rifRthil* [F'pro AB lacIq Z M15]).

Se utilizaron colonias bacterianas positivas para sembrar un precultivo de 10 ml de medios YT dobles y 100 mg/litro de ampicilina. Se cultivaron las bacterias durante la noche a 37 °C en un agitador orbital a 250 rpm. Se agregó el precultivo a 500 ml de medio de ampicilina YT doble nuevo en un matraz de 2 litros Erlenmeyer. Se dejó crecer a las bacterias a 37 °C bajo agitación orbital hasta alcanzar una densidad óptica a 595 nm de 0,7. Después, se indujo la expresión de proteínas mediante el agregado de 500 µl de solución de IPTG 0,1 M y se volvieron a colocar en incubación las bacterias durante 2 horas. Se centrifugaron las bacterias a 8000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se suspendió el sedimento en 25 ml de PBS helado que contenía inhibidor de proteasa en cápsulas de EDTA completo (Boehringer Mannheim) y se congeló a -20 °C.

Se descongelaron las células bacterianas y se alteraron en hielo con 6 pulsos de sonicación cada 50 segundos antes de la centrifugación a 12000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se mezcló el sobrenadante con 500 µl de resina húmeda GS-4B (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con PBS. Se mantuvo la resina como una suspensión durante la incubación durante la noche a 4 °C. Se enjuagó la resina con PBS hasta que la densidad óptica a 280 nm fue inferior a 0,01. Después, se colocó la resina en una columna vacía y se eluyeron las proteínas con glutatión 10 mM disuelto en PBS. Se dializaron las fracciones eluidas agrupadas contra PO₄ de sodio 1 mM a pH 7,4 y NaCl 150 mM. Se filtraron las proteínas dializadas en un entorno estéril en una membrana PES de 0,22 µm y se mantuvieron a 4 °C. Se recuperaron típicamente 40 y 60 mg de proteínas puras por litro de cultivo respectivamente. La figura 1 muestra un ejemplo de un análisis SDS-PAGE del GST purificado y GST-D₁₀. Se yodaron las proteínas purificadas utilizando el reactivo de yodación perlas de yodo (Pierce).

Se dializaron GST y GST fusionado a péptidos contra PBS y se fijó la concentración a 2 mg/ml. Se inició la reacción de yodación agregando 2 perlas de yodo enjuagadas con PBS a 2 mCi de Na¹²⁵I (100µCi/µl, ICN) disuelto en 500 µl de PBS. Se incubaron las perlas a temperatura ambiente durante cinco minutos antes de agregar 1 mg de proteína dializada. La reacción de yodación avanzó durante 15 minutos antes de que se eliminara la perla y se enjuagara en 500 ml de PBS. A los 1,5 ml finales de solución de proteína yodada, se agregaron 15 µl de NaI 6 mM para diluir la radiactividad no específica. Después, se desaló la mezcla utilizando columnas de filtración en gel de PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech) equilibradas con PBS. Se eluyeron las proteínas en el volumen vacío. Se concentraron y se dializaron contra el amortiguador *in vivo* (PO₄ de sodio 1 mM a pH 7,4 y NaCl 150 mM) utilizando cartuchos Centriprep-YM10™ (Amicon). Se midió la radiactividad utilizando un contador de radiación gamma, se evaluó la concentración de proteínas mediante el ensayo Bradford y se reveló la unión química de ¹²⁵I a las proteínas mediante autorradiografía de SDS-PAGE seco. Se mantuvieron las muestras yodadas a 4 °C.

Capacidad de unión ósea de las proteínas de fusión de los péptidos GST-poli-aspárticos comparada con la de GST sola

Se inyectaron las proteínas de fusión a GST yodadas en ratones con anestesia de isoflurano como un bolo intravenoso a través de la vena subclavia. Se inyectó una dosis de 1 mg de proteína yodada/por kg de peso corporal. Se estableció el volumen de dosis máximo en 10 ml/kg. La duración del tratamiento fue de sesenta minutos. Diez y sesenta minutos después de la inyección, se tomaron muestras de sangre (0,1 a 0,2 ml) a través de la vena subclavia con anestesia en tubos activadores de la coagulación de suero/gel Microvette™ (Sarstedt, #20.1291). En la necropsia, se tomaron muestras de sangre y se sacrificaron los animales mediante desangrado del corazón con anestesia de isoflurano. Se recogieron los órganos (riñones, hígado, fémures, tibias y tiroides), se enjuagaron en solución salina al 0,9 % USP, se secaron en gasa y se transfirieron a tubos contadores de gamma. Se pesaron las muestras de suero y los órganos y se midió la radiactividad. Se expresaron los resultados como porcentaje de la dosis inyectada. Ni D₁₀-GST, ni D₁₆-GST promovieron la unión a otros órganos diferentes del hueso. Esto mostró la especificidad de estos conjugados con respecto al hueso (no se muestran los datos).

La figura 2 muestra que la proteína de fusión a GST-D₆ no se unió más a la tibia o el fémur que GST sola. En cambio, los motivos peptídicos de D₁₀ y D₁₆ promovieron la unión de GST a los huesos.

El hecho de que D₆, un péptido que se ha demostrado que administra con éxito moléculas pequeñas al hueso, no

pueda administrar con éxito una proteína, a saber, GST, al hueso demuestra que no se puede predecir si un péptido ácido específico que se sabe que administra con eficacia una molécula pequeña al hueso también resultará efectivo para administrar una proteína al hueso.

EJEMPLO 2

Capacidad de unión de GST fusionada con diversos péptidos

La fosfoglicoproteína extracelular de matriz humana (hMEPE) es una proteína sintetizada por osteoblastos que muestra similitudes importantes con un grupo de fósforo-glicoproteínas de la matriz mineral de huesos y dientes, proteínas que se sabe que se unen naturalmente a la matriz ósea (8). Cabe señalar que hMEPE presenta en su extremo carboxi una secuencia de 18 residuos de aminoácidos (DDSSSESDSGSSSESDGD) (SEQ ID NO: 31) similar a los péptidos ácidos que se encuentran en la fosforina de dentina y la sialofosfoproteína de dentina, que se sabe que se unen a la matriz ósea (8).

La estaterina humana (hStatherin) es una proteína sintetizada por las glándulas salivales, que de modo similar a la histatina modula directamente la nucleación y/o el crecimiento de la hidroxiapatita. Cabe señalar que la hStatherin presenta una secuencia de 15 residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 34 (DSSEKFLRRIGRFG) (SEQ ID NO: 32) que se ha demostrado que se unen estrechamente a la hidroxiapatita (9).

La proteína Gla de la matriz humana (hMGP) es una proteína sintetizada por células musculares lisas vasculares y condrocitos que funciona como inhibidor de la polimerización de hidroxiapatita al unirse a núcleos cristalinos. Cabe señalar que hMGP presenta en su extremo amino una secuencia de 17 residuos de aminoácidos en las posiciones 19 a 35 del marco de lectura abierto (CYESHESMESYELNPF) (SEQ ID NO: 33) similar a los péptidos de ácido carboxiglutámicos gamma fosforilados que se encuentran en la osteocalcina que se sabe que se unen a la matriz ósea, y se cree que promueve la unión a la matriz ósea (10).

La osteopontina humana (hOPN) es una proteína sintetizada por osteoblastos que regula el crecimiento de cristales de hidroxiapatita. Esta proteína pertenece a la familia de sialofosfoproteína ósea. Cabe señalar que hOPN presenta una secuencia de 13 residuos de aminoácidos (QNAVSSSEETNDFK) (SEQ ID NO: 34) en las posiciones 58 a 70 del marco de lectura abierto. Esta secuencia muestra un nivel alto de homología entre las especies de mamíferos. La predicción de la estructura secundaria hace que esta secuencia sea adecuada para la exposición a disolventes y se demostró que esta secuencia está fosforilada en sus residuos de serina. Se cree que esta última característica afecta la unión a la matriz ósea (11).

La sialoproteína ósea humana II (hBSP2) es una proteína sintetizada por osteoblastos que muestra similitudes importantes con un grupo de fósforo-glicoproteínas de la matriz mineral de huesos y dientes, proteínas que se sabe que se unen naturalmente a la matriz ósea. Cabe señalar que hBSP2 presenta en su extremo amino una secuencia de 18 residuos de aminoácidos en las posiciones 62 a 79 del marco de lectura abierto (GSSDSSEENGDDSEEEEE) (SEQ ID NO: 35) similar a los péptidos ácidos que se encuentran en la fosforina de dentina y MEPE, y se cree que promueve la unión a la matriz ósea (8).

La proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina humano-5 (hIGFBP5) es sintetizada por osteoblastos. Esta proteína, de forma similar a las proteínas de la familia IGFBP, se cree que regula la función de los osteoblastos en el proceso de remodelación ósea. Cabe señalar que la hIGFBP5 presenta una secuencia de 18 residuos de aminoácidos en las posiciones 221 a 238 del marco de lectura abierto (RKGIFYKRKQCKPSRGRKR) (SEQ ID NO: 36) que se ha demostrado que se unen estrechamente a la hidroxiapatita (12).

La adhesina de colágeno de *staphylococcus aureus* (M81736) es una proteína expresada en la superficie de *S.aureus* que promueve la unión de las bacterias a la matriz de colágeno del hueso de mamíferos y tejidos cartilaginosos. Se informó que dicha unión era fundamental para el desarrollo de patógenos como la osteomielitis y la artritis infecciosa. Cabe señalar que se informó que el dominio de unión a colágeno (CBS) de esta adhesina abarca 151 residuos de aminoácidos (G168 a N318) del marco de lectura abierto de la proteína (13, 14). La secuencia primaria de aminoácidos es la siguiente:

GTSSVFYKYTGDMLPEDTTHVRWFLNINNEKSYVSKDITI
KDQIQGGQQLDLSTLNINVTGTHSNYYSGQSAITDFEKAFFPGSKITVDNTKNTI
DVTIPQGYGSYNSFSINYKTKITNEQQKEFVNNSQAWYQEHGKEEVNGKSFN
HTVHN. (SEQ ID NO: 37)

se construyeron plásmidos que contenían las secuencias de péptidos ácidos derivados de hMEPE, hStatherin, hMGP, hOPN, hBSP2, hIGFBP5 y CBS después de GST en marco para determinar si podían promover el direccionamiento óseo de una proteína recombinante. Se utilizó tecnología de ADN recombinante tal como se describe en el ejemplo 1

para generar plásmidos para péptidos derivados de hMEPE, hStatherin, hMGP, hOPN, hBSP2 y hIGFBP5. Los pares de oligonucleótidos identificados en la tabla 1 para cada uno de estos péptidos se mezclaron para obtener la proteína de fusión de GST-péptido ácido correspondiente. Este procedimiento generó oligonucleótidos dúplex codificantes para estos péptidos ácidos y que tienen extremidades compatibles con la clonación en el plásmido pGEX3T-4 (Pharmacia biotechnology) predigeridos con las endonucleasas de restricción BamHI y NotI.

Se construyó un plásmido que contenía CBS del siguiente modo. Se obtuvo un gen sintético correspondiente a la secuencia de la CBS a partir de Bio S&T (Montreal) y se insertó en el plásmido pLIV Select. Los oligonucleótidos de SEQ ID NO: 27 y 28 se utilizaron como cebadores en las reacciones de PCR con el plásmido pLIV Select que contenía el gen CBS para ampliar las secuencias específicas de CBS. Se transformaron los vectores pGEX-4T-3 en proteasa AP401 menos la cepa de bacterias *E. coli* (*lon::mini tetRara-Δlac-pro nalA argEam rITR thil* [*F'pro AB lacIq Z M15*]).

Se realizaron la producción y la purificación de proteínas y la farmacodistribución de la proteína de fusión yodada como se describe en el ejemplo 1.

Ninguno de estos péptidos ácidos de GST se unió a los huesos (no se muestra el resultado).

El hecho de que el péptido derivado de la estaterina, un péptido que se ha demostrado que administra con éxito una pequeña parte de osteopontina al hueso, no pueda administrar con éxito la proteína GST al hueso demuestra que no se puede predecir si un péptido ácido específico que se sabe que administra con eficacia un péptido pequeño al hueso también resultará efectivo para administrar una proteína al hueso.

EJEMPLO 3

D₁₀ aumenta la capacidad de sPHEX de corregir los niveles de fosfatasa alcalina en los ratones

PHEX es una metalopeptidasa que se cree ampliamente que controla el nivel de los factores peptídicos óseos que participan en la regulación de la mineralización y la homeostasis de fosfato renal. PHEX se expresa en la superficie de los osteoblastos y los osteocitos que están en contacto o incrustados en la matriz ósea. Este ejemplo proporciona datos sobre el diseño, la producción y la purificación de una forma extendida de sPHEX que contiene en su extremo N una secuencia de 10 residuos de ácido aspártico diseñada para anclarse a la matriz ósea.

Vector de expresión de D₁₀sPHEX

Se insertó un sitio de restricción de endonucleasa de BspEI mediante mutagénesis dirigida al sitio (QuickChange, Stratagene) en el vector pCDNA3-RSV-sPHEX-NEO (Boileau G. y col., Biochem. J. (2001) 355, 707-13) utilizando los siguientes cebadores de oligonucleótidos:

5'-

CAGTCAAGGTCTCTTATCCGGAAGTCTCCAAGCTAAACAGG-3' (SEQ ID NO: 38)

y 5'-CTGTTTAGCTTGGAGACTTCCGGATAAGAGACCTTGACTGG-3' (SEQ ID NO: 39).

Se insertó la secuencia del hexámero BspEI (subrayada) en marco con y corriente arriba de la secuencia de ADN de sPHEX. Esta construcción codifica una proteína recombinante que se puede escindir entre la leucina y la serina en las posiciones 41 y 42, respectivamente en la figura 8. Por lo tanto, está constituida por dos aminoácidos exógenos, seguidos corriente abajo por un deca-aspartato, que a su vez está seguido por dos aminoácidos exógenos adicionales. Estos 4 aminoácidos exógenos derivan de la estrategia de clonación utilizada para producir el conjugado. Se demostró que estos aminoácidos exógenos no anulan la actividad enzimática del conjugado (véase la figura 12 que muestra la actividad específica de esta construcción), pero se puede prescindir de ellos. Corriente abajo de estos aminoácidos exógenos hay un fragmento de ectodominio de PHEX natural que comienza, por lo tanto, con la serina en la posición 46 de la secuencia presentada en la figura 10. Se escindió el vector pCDNA3-RSV-NEO modificado con BspEI y después se digirió con fosfatasa alcalina para eliminar los grupos fosfato 5'. Un dúplex de oligonucleótido codificante para deca-aspartato: [5'-CCGGAGATGACGATGACGATGACGATGACGATGACT-3' (SEQ ID NO: 29) y 3'-TCTACTGCTACTGCTACTGCTACTGCTACTGAGGCC-5' (SEQ ID NO: 30)] se fosforiló en primer lugar en sus extremos 5' con la polinucleótido cinasa T4 y se ligó al vector digerido BspEI. Esto proporcionó el vector pCDNA3-RSV-D₁₀sPHEX-NEO (figura 3). Este vector comprendía la secuencia presentada en la figura 7, que codifica el PHEX escindible recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos presentada en la figura 8.

Expresión de D₁₀sPHEX recombinante

Para inducir la expresión estable de la proteína D₁₀sPHEX, se transfeció el vector pCDNA3-RSV-D₁₀sPHEX-NEO en las células LLC-PK1 (células de riñón porcino; ATCC n.º CRL-1392) utilizando el kit de transfección de liposoma Lipofectamine-Plus™ (Invitrogen). Se seleccionaron las células transfectadas mediante el agregado de 400 µg/ml G-

418 (Life Technologies) al medio. Se seleccionaron clones de células resistentes a G-418 para la expresión de D₁₀sPHEX utilizando el ensayo enzimático fluorescente PHEX [Campos M. y col. Biochem. J. (2003) 373, 271-9]. Se calculó el peso molecular aparente de la proteína recuperada en el medio usado mediante inmunotransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal elevado contra un fragmento de PHEX humano recombinante (K121-E294) como se describió anteriormente (Ruchon AF y col. J. Bone Miner. Res. (2000) 15, 1440-1450). Se utilizó un clon resistente a G-418 que expresa 1 a 2 mg de D₁₀sPHEX por litro para la producción de proteína. Se sembraron las células en Cellstack-10™ (Corning) a una densidad de 7×10^7 en 1,75 litros de medio (199 medio, FBS al 6 %, piruvato de Na 1 mM, penicilina 1×10^5 U/litro, estreptomycin 100 mg/litro y G-418 al 1 %). Se aumentó la expresión de D₁₀sPHEX mediante incubación de las células en 1,75 litros de DMEM + butirato de sodio 10 mM durante cuatro días a 37 °C y CO₂ al 5 % antes de la recolección del medio usado.

Purificación y caracterización

Se centrifugó el sobrenadante celular a 500 x g durante 5 minutos a 4 °C y se filtró en fibra de vidrio (Fisher, APFC09050) y se concentró 10 a 40 veces utilizando un dispositivo de filtración de flujo tangencial Ultrasette™ 30 (Pall Canada). El pH de la solución se llevó a 5,6 con ácido acético 1 M antes de una diálisis durante la noche a 4 °C contra acetato de sodio 50 mM, NaCl 100 mM pH 5,6 (amortiguador SP). Se cargó el sobrenadante dializado a una velocidad de flujo de 4 ml/min, en una columna de intercambio catiónico de SulfoPropyl-Sepharose de 20 ml (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada anteriormente con amortiguador SP. Se lavó la columna con el mismo amortiguador a la misma velocidad de flujo hasta que se alcanzó la referencia de absorbancia de 280 nm. Después, se eluyó la mayoría de las proteínas contaminantes con una etapa de NaCl 226 mM en el amortiguador SP. Después, se eluyó D₁₀sPHEX con una etapa de NaCl 280 mM (figura 4A). Se analizaron las fracciones mediante SDS-PAGE y con el ensayo de la actividad enzimática PHEX. Se agruparon las fracciones que contenían sPHEX y se dializaron ampliamente contra MOPS 20 mM pH 7, NaCl 250 mM antes de cargarse en una columna Blue-Sepharose™ HP de 5 ml (Amersham Pharmacia) a 5 ml/min. Se enjuagó la columna a la misma velocidad de flujo con el mismo amortiguador y se recuperó la mayoría de la proteína D₁₀sPHEX mediante el aumento de la concentración de NaCl en etapas hasta 350 mM (figura 4B). La pureza de la fracción final fue mayor que el 95 %. Alternativamente, la Blue-Sepharose™ se pudo reemplazar por Heparin-Sepharose™ (Amersham Pharmacia) en la cual D₁₀sPHEX se une estrechamente en un intervalo de pH (5 a 8). Se eluyó D₁₀sPHEX mediante el uso de gradiente de NaCl. Se determinó la pureza como mayor que el 90 %. Se concentró D₁₀sPHEX y se dializó contra PO₄ de sodio 1 mM pH 7,4, NaCl 150 mM utilizando cartuchos Centriprep-50™. Se filtró la muestra dializada en un entorno estéril en una membrana de 0,22 µm. Se demostró que D₁₀sPHEX purificado permanece estable durante meses a 4 °C. Se determinaron las concentraciones de proteínas mediante el procedimiento de Bradford. (Kit de ensayo de proteína DC; Biorad) con albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Se evaluó la pureza de la proteína mediante tinción con Sypro-Ruby™ (Molecular Probes) de las proteínas resueltas en SDS-PAGE 4-12 % (figura 3). Se determinó la actividad enzimática de D₁₀sPHEX utilizando el sustrato fluorogénico.

Efecto de las inyecciones de sPHEX y D₁₀-sPHEX sobre los niveles en circulación de fosfatasa alcalina en ratones Hyp

Los ratones *Hyp* ligados a X albergan una eliminación amplia en la región 3' del gen *PHEX* y es el homólogo murino de la hipofosfatemia ligada a X humana (XLH). Por lo tanto, estos ratones representan un modelo útil para estudiar la fisiopatología de la XLH, así como para probar la eficacia de los agentes terapéuticos en estudios preclínicos.

Por lo tanto, se investigó el posible efecto terapéutico de D₁₀sPHEX y sPHEX con inyección intravenosa de bolo a ratones *Hyp/Y* durante un período de 2 semanas.

Se dializaron D₁₀sPHEX y sPHEX contra el vehículo y se filtraron las soluciones a través de un filtro de proteína de unión baja de 0,22 µm. Se dividieron en alícuotas las soluciones y se analizaron nuevamente para detectar la actividad enzimática y la concentración mediante ensayo enzimático fluorogénico y el procedimiento de Bradford, respectivamente.

Se anestesió a cada ratón con isoflurano vaporizado (2 %) y D₁₀sPHEX, o se inyectó sPHEX como un bolo intravenoso a través de la vena subclavia. La dosis fue 5 mg/kg de peso corporal para cada grupo. Se trataron los animales una vez al día durante 14 días consecutivos. Se recogieron las muestras de sangre (0,1-0,2 ml) a través de la vena subclavia con anestesia en los días del estudio - 3 y +15 (antes de la necropsia, 24 horas después de la última inyección). Se evaluaron los niveles totales de fosfatasa alcalina (ALP) en suero diluido (30 µl de muestra de suero con 90 µl de solución salina al 0,9 % USP). Aunque las dosificaciones adecuadas para los pacientes humanos no son proporcionales a las utilizadas en los ratones, estas dosificaciones predicen los intervalos de dosificaciones que pueden ser adecuados en los seres humanos utilizando las tablas publicadas.

Tal como se observa en la figura 6, la forma extendida de D₁₀ de sPHEX indujo una mayor disminución en los niveles de fosfatasa alcalina que la forma de sPHEX normal.

EJEMPLO 4

La fusión de D₁₀ a GST recombinante aumenta su unión a la fase mineral del hueso *in vitro*

Marcado con fluoresceína de proteínas purificadas

Se marcaron proteínas purificadas recombinantes con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Molecular Probes F143). Se realizó la reacción mediante el agregado de proteínas a fosfato de sodio 10 mM, amortiguador de NaCl 50 mM pH 7 a una concentración de proteína final de 1 mg/ml. La reacción de marcado inició mediante el agregado de FITC disuelto en DMSO en una concentración de 20 mg/ml para alcanzar una proporción molar de 20:1 con respecto a la concentración de proteína. Se dejó reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora. Se separó la proteína marcada de la fluoresceína libre en una columna PD-10™ (Pharmacia) antes de la diálisis en el amortiguador de unión (fosfato de sodio 1 mM NaCl 150 mM, pH 7,4).

Preparación de la fase mineral de los huesos

Se diseccionaron huesos largos de una rata y se trituraron hasta convertirlos en polvo en un mortero enfriado con nitrógeno líquido. El polvo se mantuvo a -80 °C o se utilizó directamente. Se lavó una alícuota del polvo (300 mg) 3 veces con 8 ml de PBS y se le agregaron 8 ml de HCl 1 M. Se mantuvo la mezcla en suspensión en un mezclador giratorio durante 1 hora a temperatura ambiente. Se centrifugó la fracción insoluble y se recogió el sobrenadante ácido claro. Esta solución ácida permaneció estable a temperatura ambiente durante al menos dos semanas.

Reacción de unión

Se mezclaron alícuotas de 20 µl de extracto óseo ácido con 2 µl de NaOH 10 M y se sedimentó el precipitado a 10.000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se enjuagó el sedimento dos veces mediante resuspensión en 100 µl de amortiguador de unión. Después, se mezcló el extracto óseo con 100 µl de una solución que contenía 5 a 45 µg de proteína marcada con fluoresceína en el amortiguador de unión al cual se le agregó fosfato para alcanzar una concentración final de 80 mM. Se incubaron las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente en la rueda giratoria para mantener la fase mineral en suspensión. Después, se centrifugaron las muestras durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se disolvió el sedimento que contenía la proteína unida en 200 µl de EDTA 0,5 M pH 8. Para calcular la cantidad de proteína libre presente, se agregaron 100 µl de EDTA 0,5 M pH 8 al sobrenadante. Se midió la fluorescencia de las diferentes muestras en un lector de placas de 96 pocillos configurado a 494 nm para la excitación y a 516 nm para la emisión.

Resultados

Se utilizaron las muestras que contenían 50 µg de GST y GST-D₁₀ marcados con fluoresceína en el ensayo de unión descrito arriba. La figura 9A muestra que la fusión de la secuencia de D₁₀ a GST provocó un aumento de 6 veces en la unión a la fase mineral del hueso.

EJEMPLO 5

La fusión de D₁₀ a sPHEX aumenta su unión al hueso

Utilizando un procedimiento análogo al descrito en el ejemplo 4 arriba, se utilizaron muestras que contenían 50 µg de sPHEX y D₁₀sPHEX marcados con fluoresceína en un ensayo de unión. La figura 9B muestra que la fusión de la secuencia de D₁₀ a sPHEX provocó un aumento de 4,3 en la unión a la fase mineral del hueso.

En cambio, D₆-sPHEX se construyó y se evaluó después de la inyección *in vivo* en animales (como se describe en el ejemplo 1 arriba) y no promovió la unión de las proteínas recombinantes al hueso (no se muestran los datos).

EJEMPLO 6

La fusión de D₁₀ a una forma soluble de fosfatasa alcalina aumenta su direccionamiento a la fase mineral del hueso

Construcción de vectores de expresión codificantes de fosfatasa alcalina soluble recombinante humana, sALP y sALP-D₁₀

Se obtuvo ADNc de longitud completa humano codificante de fosfatasa alcalina no específica de tejido (ALP) de ARN poliA de médula ósea (Clontech) mediante RT-PCR. En resumen, se transcribieron de forma inversa 20 ng de poliA con SuperscriptII™ y un oligo dT₁₂₋₁₈ utilizando el First Strand Synthesis System (Invitrogen). Se utilizó directamente una alícuota que representa 1/20 de la etapa de RT en una reacción de PCR con oligos específicos de ALP (5'-gataaagcaggctctgggtgcacc-3' directo (SEQ ID NO: 43); 5'-gttgcatctgtcacgggctgtgg-3' inverso (SEQ ID NO: 44) y el Expand High Fidelity Enzyme Kit™ (Roche). Se separó el producto específico de ALP resultante (1644. bp) y se purificó a partir de un gel de agarosa (1 %) utilizando el Qiaquick Gel Extraction Kit™ (QIAGEN). El ADNc de ALP después se ligó en el vector pCR4-blunt-TOPO™ (Invitrogen), se transformó en bacterias Top10™ (Invitrogen) y un clon positivo

identificado por PCR de colonia. Se verificó la identidad de ADNc mediante secuenciación de ADN automática.

Se construyeron formas secretadas de ALP (sALP) con eliminación de la señal de anclaje de GPI mediante PCR utilizando el kit Expand High Fidelity Enzyme Kit™. Comprendían los residuos 1-502, seguidos de un codón de parada (sALP) o un motivo de direccionamiento de deca aspartato y un codón de parada (sALP-D10). En ambos casos, el cebador directo (5'-tgatccaccatgatttcaccaftcftagtag-3' (SEQ ID NO: 40)) cubrió el iniciador metionina (subrayado) e incluyó un sitio BamHI (en cursiva). Los cebadores inversos (sALP: 5'-ttctagactacgagctggeaggagcacagtggccg-3' (SEQ ID NO: 41); sALP-D10 5'-ttctagactagtcgtcatcgtcatcgtcatcgtcatcgtgagtggeaggagcacagtggccg-3' (SEQ ID NO: 42)) contenían un codón de parada (subrayado) y un sitio XbaI (en cursiva). Los productos de PCR fueron digeridos con BamHI y XbaI y se clonaron en pCDNA3.1-RSV que se había predigerido con las mismas enzimas. Se secuenció el ADN de plásmido.

Ensayo enzimático fluorescente de ALP

Se evaluó la actividad enzimática de sALP y sALP-D10 utilizando 4-metilumbeliferil fosfato (MUP, Molecular Probes, M8425) como sustrato fluorogénico de acuerdo con Gee KR y col. (Anal. Biochem. 273, 41-48 (1999)) Típicamente, se realizó el ensayo a 37 °C en placas de 96 pocillos un volumen final de 200 µl con 10 µM de MUP. Se registraron las lecturas utilizando un lector de placas Spectramax Gemini™ (Molecular Devices) en cada minuto durante 30 minutos a 450 nm tras excitación a 360 nm. El límite de longitud de onda de emisión se fijó en 435 nm. Se calculó la tasa de velocidad inicial de la ALP mediante un ajuste de regresión lineal (con r² igual o mayor que 0,98).

Expresión de proteínas sALP y sALP-D10 recombinantes

Para determinar si se secretaron las proteínas sALP y sALP-D10 recombinantes, se transfectó transitoriamente cada construcción (pCDNA3-RSV-sALP-NEO y pCDNA3-RSV-sALP-D10-NEO) en células HEK-293S (células de riñón embrionarias humanas; ATCC n.º CRL-1392) utilizando el kit Lipofectamine-Plus liposome transfection kit™ (Invitrogen). Las células HEK-293S también se transfectaron de forma simulada como control negativo. El día después de la transfección, se incubaron las células durante 24 h en DMEM sin suero. Se recogieron los medios acondicionados y se centrifugaron a 14000 RPM durante 5 min a 4 °C para eliminar las células muertas y los desechos. Se evaluaron los sobrenadantes en cuanto a la actividad enzimática y la expresión de sALP o sALP-D10 utilizando el ensayo enzimático fluorescente de ALP y análisis de transferencia Western respectivamente. Para el análisis de transferencia Western, se precipitó el medio usado durante 1 h sobre hielo con ácido tricloroacético (concentración final de 10 % (v/v)). Se centrifugaron las proteínas precipitadas a 14000 RPM durante 20 min a 4 °C, se lavaron una vez con acetona fría, se secaron y se resuspendieron en 60 µl 1X de amortiguador de muestra Laemmli con DTT y se hirvieron durante 5 min.

Para evaluar el contenido intracelular de sALP y sALP-D10, se lavaron las células 3 veces con PBS y se lisaron con 200 µl de Tris-HCl 50 mM (pH 8) que contenía NaCl 150 mM y NP-40 al 1 % sobre hielo durante 20 min. Se centrifugaron los lisados y se evaluó el sobrenadante en cuanto a la actividad enzimática y la expresión de sALP o sALP-D10 utilizando el ensayo enzimático fluorescente de ALP y análisis de transferencia Western respectivamente. Para el análisis de transferencia Western, se mezclaron alícuotas de 50 µl con 10 µl 6X de amortiguador de muestra Laemmli con DTT y se hirvieron durante 5 min.

Se cargaron las muestras en un gel de Tris-glicina poliacrilamida al 4-12 % Novex precast™ (Invitrogen) y se transfirieron a nitrocelulosa de 0,45 µm (Protran, Schleicher&Schuell, Keene, NH) con Tris-glicina que contenía metanol al 10 %. Se tiñó la membrana con rojo Ponceau y se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente con PBS que contenía Tween 20™ al 0,05 % (PBST) y leche deshidratada 5 %. Después, se incubó la membrana secuencialmente a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-hBAP (mAb 4B-78, Developmental Studies Hybridoma Bank) (1:1000 en PBST con leche deshidratada al 5 %) y una IgG de conejo anti-ratón acoplada con peroxidasa de rábano picante (Sigma) (1:12000 en PBST con leche deshidratada al 5 %). Se desarrolló la señal con Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus™ (PerkinElmer).

La actividad enzimática de ALP medida en los medios acondicionados de HEK293 después de la transfección transitoria fue muy alta y de magnitud similar para pCDNA3-RSV-sALP-NEO (sALP) y pCDNA3-RSV-sALP-D10-NEO (sALP-D10) (figura 13). Esta actividad fue específica del ADN del plásmido transfectado, ya que no se podía detectar en las células con transfección simulada (simulación). La actividad relativa medida en los medios fue 35 veces mayor que la medida en los extractos celulares, lo que demuestra la naturaleza secretora de sALP y sALP-D10. En consecuencia, para sALP y sALP-D10, la inmunotransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal elevado contra fosfatasa alcalina humana no específica de tejido recombinante (mAb 4B-78, Developmental Studies Hybridoma Bank) reveló una señal mucho más fuerte en los medios acondicionados que en los extractos celulares (figura 14B, comparar los carriles 2, 3 frente a 5, 6). No se visualizó ninguna señal en las muestras transfectadas de forma simulada (figura 14B, carriles 4 y 7). La señal que aparece en las células con transfección simulada consiste en la traza de BSA. El peso molecular aparente de la proteína detectada se calculó en 70 kDa en los extractos celulares (flecha) y ligeramente superior en los medios acondicionados (punta de flecha). Se realizó una tinción con rojo Ponceau de la membrana para monitorizar la carga uniforme de las muestras (figura 14A).

Generación de células HEK293 que segregan constitutivamente sALP y sALP-D₁₀

Para inducir la expresión estable de las proteínas sALP y sALP-D₁₀, se transfectaron los vectores pCDNA3-RSV-sALP-NEO y pCDNA3-RSV-sALP-D₁₀-NEO por separado en células HEK-293S utilizando el kit Lipofectamine-Plus liposome transfection kit™ (Invitrogen). Se seleccionaron las células transfectadas mediante el agregado de 800 µg/ml G418 (Life Technologies) al medio. Para cada transfección, se analizó un grupo de células resistentes a G-418 para la expresión de sALP o sALP-D₁₀ en el medio de cultivo usado utilizando el ensayo enzimático fluorescente de ALP. Los medios acondicionados recogidos de las líneas celulares estables se utilizaron para el estudio del ensayo de unión en el mineral óseo.

Unión a la fase mineral reconstituida del hueso

Se mezclaron alícuotas de 20 µl de extracto óseo ácido con 2 µl de NaOH 10 M y se sedimentó el precipitado a 10.000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se enjuagó el sedimento dos veces en 100 µl de amortiguador (fosfato de sodio 1 mM pH 7,4 + NaCl 150 mM). Después, se mezcló la fase mineral de hueso resultante (equivalente a 0,37 mg de polvo seco) con 100 µl de una solución que contenía proteínas de sALP o sALP-D₁₀ en el amortiguador de unión (fosfato de sodio 80 mM pH 7,4 + NaCl 150 mM). Se incubaron las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente en la rueda giratoria para mantener la fase mineral en suspensión. Después, se centrifugaron las muestras durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se mezcló el sedimento que contenía la proteína unida con 180 µl del amortiguador de ensayo enzimático ALP que contenía BSA al 0,1 % y se inició la reacción mediante el agregado de 20 µl de MUP 100 µM. Para permitir un ensayo más homogéneo, las condiciones de la placa de 96 pocillos se agitaron durante 10 segundos cada minuto durante la duración del ensayo.

Se comparó la actividad enzimática retenida en la fase ósea mineral reconstituida con la actividad enzimática equivalente agregada en el ensayo de unión. Se calcularon valores de 0,98 % y 13,3 % de actividad de proteína total unida a la fase mineral ósea para sALP y sALP-D₁₀, respectivamente. Una diferencia de unión de más de 13 veces a favor de sALP-D₁₀ sugiere que la secuencia de deca-aspartato fusionada al extremo C dirige directamente a sALP a la fase mineral del hueso. Además, el hecho de que haya sido posible medir directamente la actividad de ALP unida a la fase mineral del hueso indica que la enzima está unida de forma competente desde el punto de vista catalítico a los cristales de hidroxiapatita.

Dicha proteína de fusión se puede dirigir directamente a los huesos donde la acumulación de PPi inhibe la mineralización esquelética.

EJEMPLO 7

D₁₀-ALP disminuye el efecto inhibitor del pirofosfato sobre la mineralización ósea

Se cultivaron las células UMR106 hasta la confluencia. Después, se cultivaron durante otros 7 días en medio que contenía β-glicerofosfato 10 mM para inducir la mineralización. A lo largo de este período de cultivo de 7 días, se trataron las células con o sin pirofosfato (PPi) 75 µM, un inhibidor de la mineralización y un sustrato de fosfatasa alcalina. Para evaluar la capacidad de la fosfatasa alcalina de rescatar la inhibición de la mineralización inducida por PPi, se cultivaron células tratadas con o sin PPi con concentraciones variadas de D₁₀-sALP semipurificado producido a partir de HEK293, células de riñón embrionarias humanas. Se evaluó la mineralización mediante absorción de ⁴⁵Ca. Los parámetros utilizados para este experimento se presentan en la tabla 2 abajo.

TABLA 2 - PARÁMETROS UTILIZADOS EN D₁₀-ALP SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA MINERALIZACIÓN INDUCIDA POR PPi

ALP	[ALP] (unidades/pocillo)	µl ALP/pocillo	β-GP (mM)	PPi (µM)
-	0	0	10	0
-	0	0	10	75
D ₁₀ -sALP	1,5	0,5	10	0
D ₁₀ -sALP	1,5	0,5	10	75
D ₁₀ -sALP	3	1,0	10	0
D ₁₀ -sALP	3	1,0	10	75
D ₁₀ -sALP	4,5	1,5	10	0
D ₁₀ -sALP	4,5	1,5	10	75
D ₁₀ -sALP	6	2	10	0
D ₁₀ -sALP	6	2	10	75

7 días de tratamiento con PPi produjeron una disminución del 43 % en la mineralización. El cotratamiento de los cultivos con D₁₀sALP produjo un rescate que responde a la dosis de esta inhibición de la mineralización. El tratamiento con 1,5 unidades de D₁₀-sALP produjo una disminución del 30 %, 3 y 4,5 unidades una disminución del 24 % y 6 unidades produjeron una disminución del 15 % en la mineralización, lo que corresponde a un rescate del 65 % de la inhibición de la mineralización inducida por PPi.

Estos resultados muestran que el tratamiento de los osteoblastos mineralizantes con D₁₀-sALP rescata de forma que responde a la dosis la inhibición de la mineralización inducida por PPI.

Los ejemplos anteriores muestran que una fusión de poli-aspartato con proteínas recombinantes aumenta su unión a la fase mineral del hueso o al tejido óseo y aumenta la capacidad de la proteína para llevar a cabo su actividad biológica en comparación con cuando se administra sola.

REFERENCIAS:

1. 1- A- Weinberg, JM (2003) An overview of infliximab, etanercept, efalizumab, and alefacept as biologic therapy for psoriasis. Clin Ther 25: 2487-2505.
2. 2- Whyte MP, Valdes R Jr, Ryan LM, McAlister WH (1982) Infantile hypophosphatasia: enzyme replacement therapy by intravenous infusion of alkaline phosphatase-rich plasma from patients with Paget bone disease. J Pediatr 101: 379-386.
3. 3- Whyte MP, Kurtzberg J, McAlister WH, Mumm S, Podgornik MN, Coburn S, Ryan LM, Miller CR, Gottesman GS, Smith AK, Douville J, Waters-Pick B, Armstrong RD, Martin PL (2003) Marrow cell transplantation for infantile hypophosphatasia. J Bone Miner Res 18: 624-636.
4. 4- Fujisaki J, Tokunaga Y, Takahashi T, Shimojo F, Kimura S, Hata T (1997) Osteotropic drug delivery system (ODDS) based on biphosphonic prodrugs. IV: Effects of osteotropic estradiol on bone mineral density and uterine weight in ovariectomized rats. J Drug Targeting 5: 129-138.
5. 5- Uludag H, Gao T, Wohl GR, Kantoci D, Zemicke RF (2000) Bone affinity of a biphosphonate-conjugated protein in vivo. Biotechnol Prog 16: 1115-1118.
6. 6- Sekido T, Sakura N, Higashi Y, Miya K, Nitta Y, Nomura M, Sawanishi H, Morito K, Masamune Y, Kasugai S, Yokogawa K, Miyamoto K-I (2001) Novel drug delivery system to bone using acidic oligopeptides: pharmacokinetic characteristics and pharmacological potential. J Drug Targeting 9: 111-121.
7. 7- Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA (1994) Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. Biochem J 300: 723-728.
8. 8- Rowe PSN, de Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ, Oudet CL (2000) MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. Genomics 67: 54-68.
9. 9- Gilbert M, Shaw WJ, Long JR, Nelson K, Drobny GP, Giachelli CM, Stayton PS (2000) Chimeric peptides of statherin and osteopontin that bind hydroxyapatite and mediate cell adhesion. J Biol Chem 275: 16213-16218.
10. 10-Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG (1992) Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bones. Clin Orthop 281: 275-294.
11. 11-Salih E, Ashkar S, Gerstenfeld FC, Glimcher MJ (1997) Identification of the phosphorylated sites of metabolically 32P-labeled osteopontin from cultured chicken osteoblasts. J Biol Chem 272: 13966-13973.
12. 12-Campbell PG, Andress DL (1997) Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-5-(201-218) region regulates hydroxyapatite and IGF-I binding. Am J Physiol 273: E1005-E1013.
13. 13-Patti JM, House-Pompeo K, Boles JO, Garza N, Gurusiddappa S, Hook M (1995) Critical residues in the ligand-binding site of the Staphylococcus aureus collagen-binding adhesin (MSCRAMM). J Biol Chem 270: 12005-12011.
14. 14-Symersky J, Patti JM, Carson M, House-Pompeo K, Teale M, Moore D, Jin L, Schneider A, DeLucas LJ, Hook M, Narayana SV (1997) Structure of the collagen-binding domain from a Staphylococcus aureus adhesin. Nat Struct Biol 4: 833-838.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Alexion Pharmaceuticals, Inc.

<120> CONJUGADOS PARA ADMINISTRACIÓN ÓSEA Y PROCEDIMIENTO DE USO DE ESTOS PARA DIRIGIR PROTEÍNAS AL HUESO

<130> G66931PCEPT2

<140> PCT/CA05/000615
 <141> 2005-04-21
 <150> US 60/563,828
 <151> 2004-04-21
 5 <150> US 60/614,984
 <151> 2004-10-04
 <150> US 60/590,347
 <151> 2004-07-23
 10 <160> 44
 <170> Versión de patente 3.2
 <210> 1
 <211> 2280
 15 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Conjugado escindible codificante
 20 <400> 1

atggaagcag aaacagggag cagcgtggag actggaaaga aggccaacag aggcactcga	60
attgccctgg tcgtgtttgt cctgacagtg atcgctcaac aaacaaccag tcaaggtctc	120
ttatccggag atgacgatga cgatgacgat gacgatgact ccggaagtct ccaagctaaa	180
caggagtact gcctgaagcc agaatgcac gaagcggctg ctgccatctt aagtaaagta	240
aatctgtctg tggatccttg tgataatttc ttccggttcg cttgtgatgg ctggataagc	300
aataatccaa ttcccgaaga tatgccaaagc tatggggttt atccttggt gagacataat	360
gttgacctca agttgaagga acttttggag aaatcaatca gtagaaggcg ggacaccgaa	420
gccatacaga aagccaaaat cctttattca tcctgcatga atgagaaagc gattgaaaaa	480
gcagatgcc aagccactgct acacatccta cggcattcac ctttccgctg gcccggtgctt	540
gaatctaata ttggccctga aggggtttgg tcagagagaa agttcagcct tctgcagaca	600

ES 2 887 039 T3

cttgcaacgt ttcgtggtca atacagcaat tctgtgttca tccgtttgta tgtgtcccct 660
 gatgacaaag catccaatga acatatcttg aagctggacc aagcaacact ctccctggcc 720
 gtgagggaaag actaccttga taacagtaca gaagccaagt cttatcgga tgccctttac 780
 aagtcatggt tggatactgc cgtgctttta ggagctaaca gttccagagc agagcatgac 840
 atgaagtcag tgctcagatt ggaaattaag atagctgaga taatgattcc acatgaaaac 900
 cgaaccagcg aggccatgta caacaaaatg aacatttctg aactgagtgc tatgattccc 960
 cagttcgact ggctgggcta catcaagaag gtcattgaca ccagactcta ccccatctg 1020
 aaagacatca gccctccga gaatgtggtg gtccgcgtcc cgcagtactt taaagatttg 1080
 tttaggatat tagggtctga gagaaagaag accattgcca actatttggg gtggagaatg 1140
 gtttattcca gaattccaaa ccttagcagg cgctttcagt atagatggct ggaattctca 1200
 agggtaatcc aggggaccac aactttgctg cctcaatggg acaaagtgtt aaactttatt 1260
 gaaagtgcc tcccttatgt tgttggaag atgtttgtag atgtgtactt ccaggaagat 1320
 aagaaggaaa tgatggagga attggttgag ggcgttcgct gggcctttat tgacatgcta 1380
 gagaaagaaa atgagtggat ggatgcagga acgaaaagga aagccaaaga aaaggcgaga 1440
 gctgttttgg caaaagtgg ctatccagag tttataatga atgatactca tgttaatgaa 1500
 gacctcaaag ctatcaagtt ttcagaagcc gactactttg gcaacgtcct acaaactcgc 1560
 aagtatttag cacagtctga tttcttctgg ctaagaaaag ccgttccaaa aacagagtgg 1620
 tttacaaatc cgacgactgt caatgccttc tacagtgcac ccaccaacca gatccgattt 1680
 ccagcaggag agctccagaa gcctttcttt tggggaacag aatatcctcg atctctgagt 1740
 tatggtgcta taggagtaat tgtcggacat gaatttacac atggatttga taataatggt 1800
 agaaaatatg ataaaaatgg aaacctggat ccttggtggt ctactgaatc agaagaaaag 1860
 ttttaaggaaa aaacaaaatg catgattaac cagtatagca actattattg gaagaaagct 1920
 ggcttaaatg tcaaggggaa gaggaccctg ggagaaaata ttgctgataa tggaggcctg 1980
 cgggaagctt ttagggctta caggaaatgg ataaatgaca gaaggcaggg acttgaggag 2040
 cctcttctac caggcatcac attcaccaac aaccagctct tcttctgag ttatgctcat 2100
 gtgaggtgca attcctacag accagaagct gcccgagaac aagtccaaat tgggtgctac 2160
 agtccccctc agtttagggt caatggtgca attagtaact ttgaagaatt ccagaaagct 2220
 tttactgtc cacccaattc cacgatgaac agaggcatgg actcctgccg actctggtag 2280

<210> 2
 <211> 759
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220
 <223> Conjugado de PHEX escindible

<400> 2

ES 2 887 039 T3

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

ES 2 887 039 T3

Arg Lys Phe Ser Leu Leu Gln Thr Leu Ala Thr Phe Arg Gly Gln Tyr
 195 200 205
 Ser Asn Ser Val Phe Ile Arg Leu Tyr Val Ser Pro Asp Asp Lys Ala
 210 215 220
 Ser Asn Glu His Ile Leu Lys Leu Asp Gln Ala Thr Leu Ser Leu Ala
 225 230 235 240
 Val Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Asn Ser Thr Glu Ala Lys Ser Tyr Arg
 245 250 255
 Asp Ala Leu Tyr Lys Phe Met Val Asp Thr Ala Val Leu Leu Gly Ala
 260 265 270
 Asn Ser Ser Arg Ala Glu His Asp Met Lys Ser Val Leu Arg Leu Glu
 275 280 285
 Ile Lys Ile Ala Glu Ile Met Ile Pro His Glu Asn Arg Thr Ser Glu
 290 295 300
 Ala Met Tyr Asn Lys Met Asn Ile Ser Glu Leu Ser Ala Met Ile Pro
 305 310 315 320
 Gln Phe Asp Trp Leu Gly Tyr Ile Lys Lys Val Ile Asp Thr Arg Leu
 325 330 335
 Tyr Pro His Leu Lys Asp Ile Ser Pro Ser Glu Asn Val Val Val Arg
 340 345 350
 Val Pro Gln Tyr Phe Lys Asp Leu Phe Arg Ile Leu Gly Ser Glu Arg
 355 360 365
 Lys Lys Thr Ile Ala Asn Tyr Leu Val Trp Arg Met Val Tyr Ser Arg
 370 375 380
 Ile Pro Asn Leu Ser Arg Arg Phe Gln Tyr Arg Trp Leu Glu Phe Ser
 385 390 395 400
 Arg Val Ile Gln Gly Thr Thr Thr Leu Leu Pro Gln Trp Asp Lys Cys
 405 410 415

ES 2 887 039 T3

Val Asn Phe Ile Glu Ser Ala Leu Pro Tyr Val Val Gly Lys Met Phe
420 425 430

Val Asp Val Tyr Phe Gln Glu Asp Lys Lys Glu Met Met Glu Glu Leu
435 440 445

Val Glu Gly Val Arg Trp Ala Phe Ile Asp Met Leu Glu Lys Glu Asn
450 455 460

Glu Trp Met Asp Ala Gly Thr Lys Arg Lys Ala Lys Glu Lys Ala Arg
465 470 475 480

Ala Val Leu Ala Lys Val Gly Tyr Pro Glu Phe Ile Met Asn Asp Thr
485 490 495

His Val Asn Glu Asp Leu Lys Ala Ile Lys Phe Ser Glu Ala Asp Tyr
500 505 510

Phe Gly Asn Val Leu Gln Thr Arg Lys Tyr Leu Ala Gln Ser Asp Phe
515 520 525

Phe Trp Leu Arg Lys Ala Val Pro Lys Thr Glu Trp Phe Thr Asn Pro
530 535 540

Thr Thr Val Asn Ala Phe Tyr Ser Ala Ser Thr Asn Gln Ile Arg Phe
545 550 555 560

Pro Ala Gly Glu Leu Gln Lys Pro Phe Phe Trp Gly Thr Glu Tyr Pro
565 570 575

Arg Ser Leu Ser Tyr Gly Ala Ile Gly Val Ile Val Gly His Glu Phe
580 585 590

Thr His Gly Phe Asp Asn Asn Gly Arg Lys Tyr Asp Lys Asn Gly Asn
595 600 605

Leu Asp Pro Trp Trp Ser Thr Glu Ser Glu Glu Lys Phe Lys Glu Lys
610 615 620

Thr Lys Cys Met Ile Asn Gln Tyr Ser Asn Tyr Tyr Trp Lys Lys Ala
625 630 635 640

ES 2 887 039 T3

Gly Leu Asn Val Lys Gly Lys Arg Thr Leu Gly Glu Asn Ile Ala Asp
645 650 655

Asn Gly Gly Leu Arg Glu Ala Phe Arg Ala Tyr Arg Lys Trp Ile Asn
660 665 670

Asp Arg Arg Gln Gly Leu Glu Glu Pro Leu Leu Pro Gly Ile Thr Phe
675 680 685

Thr Asn Asn Gln Leu Phe Phe Leu Ser Tyr Ala His Val Arg Cys Asn
690 695 700

Ser Tyr Arg Pro Glu Ala Ala Arg Glu Gln Val Gln Ile Gly Ala His
705 710 715 720

Ser Pro Pro Gln Phe Arg Val Asn Gly Ala Ile Ser Asn Phe Glu Glu
725 730 735

Phe Gln Lys Ala Phe Asn Cys Pro Pro Asn Ser Thr Met Asn Arg Gly
740 745 750

Met Asp Ser Cys Arg Leu Trp
755

<210> 3
<211> 749
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> PHEX humano natural

<400> 3

Met Glu Ala Glu Thr Gly Ser Ser Val Glu Thr Gly Lys Lys Ala Asn
1 5 10 15

Arg Gly Thr Arg Ile Ala Leu Val Val Phe Val Gly Gly Thr Leu Val
20 25 30

Leu Gly Thr Ile Leu Phe Leu Val Ser Gln Gly Leu Leu Ser Leu Gln
35 40 45

Ala Lys Gln Glu Tyr Cys Leu Lys Pro Glu Cys Ile Glu Ala Ala Ala
50 55 60

ES 2 887 039 T3

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

ES 2 887 039 T3

Glu Asn Arg Thr Ser Glu Ala Met Tyr Asn Lys Met Asn Ile Ser Glu
 290 295 300
 Leu Ser Ala Met Ile Pro Gln Phe Asp Trp Leu Gly Tyr Ile Lys Lys
 305 310 315 320
 Val Ile Asp Thr Arg Leu Tyr Pro His Leu Lys Asp Ile Ser Pro Ser
 325 330 335
 Glu Asn Val Val Val Arg Val Pro Gln Tyr Phe Lys Asp Leu Phe Arg
 340 345 350
 Ile Leu Gly Ser Glu Arg Lys Lys Thr Ile Ala Asn Tyr Leu Val Trp
 355 360 365
 Arg Met Val Tyr Ser Arg Ile Pro Asn Leu Ser Arg Arg Phe Gln Tyr
 370 375 380
 Arg Trp Leu Glu Phe Ser Arg Val Ile Gln Gly Thr Thr Thr Leu Leu
 385 390 395 400
 Pro Gln Trp Asp Lys Cys Val Asn Phe Ile Glu Ser Ala Leu Pro Tyr
 405 410 415
 Val Val Gly Lys Met Phe Val Asp Val Tyr Phe Gln Glu Asp Lys Lys
 420 425 430
 Glu Met Met Glu Glu Leu Val Glu Gly Val Arg Trp Ala Phe Ile Asp
 435 440 445
 Met Leu Glu Lys Glu Asn Glu Trp Met Asp Ala Gly Thr Lys Arg Lys
 450 455 460
 Ala Lys Glu Lys Ala Arg Ala Val Leu Ala Lys Val Gly Tyr Pro Glu
 465 470 475 480
 Phe Ile Met Asn Asp Thr His Val Asn Glu Asp Leu Lys Ala Ile Lys
 485 490 495
 Phe Ser Glu Ala Asp Tyr Phe Gly Asn Val Leu Gln Thr Arg Lys Tyr
 500 505 510
 Leu Ala Gln Ser Asp Phe Phe Trp Leu Arg Lys Ala Val Pro Lys Thr

ES 2 887 039 T3

515	520	525
Glu Trp Phe Thr Asn Pro Thr Thr Val Asn Ala Phe Tyr Ser Ala Ser		
530	535	540
Thr Asn Gln Ile Arg Phe Pro Ala Gly Glu Leu Gln Lys Pro Phe Phe		
545	550	555 560
Trp Gly Thr Glu Tyr Pro Arg Ser Leu Ser Tyr Gly Ala Ile Gly Val		
	565 570	575
Ile Val Gly His Glu Phe Thr His Gly Phe Asp Asn Asn Gly Arg Lys		
	580 585	590
Tyr Asp Lys Asn Gly Asn Leu Asp Pro Trp Trp Ser Thr Glu Ser Glu		
	595 600	605
Glu Lys Phe Lys Glu Lys Thr Lys Cys Met Ile Asn Gln Tyr Ser Asn		
	610 615	620
Tyr Tyr Trp Lys Lys Ala Gly Leu Asn Val Lys Gly Lys Arg Thr Leu		
	625 630	635 640
Gly Glu Asn Ile Ala Asp Asn Gly Gly Leu Arg Glu Ala Phe Arg Ala		
	645 650	655
Tyr Arg Lys Trp Ile Asn Asp Arg Arg Gln Gly Leu Glu Glu Pro Leu		
	660 665	670
Leu Pro Gly Ile Thr Phe Thr Asn Asn Gln Leu Phe Phe Leu Ser Tyr		
	675 680	685
Ala His Val Arg Cys Asn Ser Tyr Arg Pro Glu Ala Ala Arg Glu Gln		
	690 695	700
Val Gln Ile Gly Ala His Ser Pro Pro Gln Phe Arg Val Asn Gly Ala		
	705 710	715 720
Ile Ser Asn Ser Glu Glu Phe Gln Lys Ala Phe Asn Cys Pro Pro Asn		
	725 730	735
Ser Thr Met Asn Arg Gly Met Asp Ser Cys Arg Leu Trp		
	740 745	

<210> 4
 <211> 718
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Conjugado de PHEX soluble

<400> 4

ES 2 887 039 T3

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

ES 2 887 039 T3

180	185	190
Gln Ala Thr Leu Ser Leu Ala Val Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Asn Ser		
195	200	205
Thr Glu Ala Lys Ser Tyr Arg Asp Ala Leu Tyr Lys Phe Met Val Asp		
210	215	220
Thr Ala Val Leu Leu Gly Ala Asn Ser Ser Arg Ala Glu His Asp Met		
225	230	240
Lys Ser Val Leu Arg Leu Glu Ile Lys Ile Ala Glu Ile Met Ile Pro		
	245	250
His Glu Asn Arg Thr Ser Glu Ala Met Tyr Asn Lys Met Asn Ile Ser		
	260	265
Glu Leu Ser Ala Met Ile Pro Gln Phe Asp Trp Leu Gly Tyr Ile Lys		
	275	280
Lys Val Ile Asp Thr Arg Leu Tyr Pro His Leu Lys Asp Ile Ser Pro		
	290	295
Ser Glu Asn Val Val Val Arg Val Pro Gln Tyr Phe Lys Asp Leu Phe		
305	310	315
Arg Ile Leu Gly Ser Glu Arg Lys Lys Thr Ile Ala Asn Tyr Leu Val		
	325	330
Trp Arg Met Val Tyr Ser Arg Ile Pro Asn Leu Ser Arg Arg Phe Gln		
	340	345
Tyr, Arg Trp Leu Glu Phe Ser Arg Val Ile Gln Gly Thr Thr Thr Leu		
	355	360
Leu Pro Gln Trp Asp Lys Cys Val Asn Phe Ile Glu Ser Ala Leu Pro		
	370	375
Tyr Val Val Gly Lys Met Phe Val Asp Val Tyr Phe Gln Glu Asp Lys		
385	390	395
Lys Glu Met Met Glu Glu Leu Val Glu Gly Val Arg Trp Ala Phe Ile		
	405	410
		415

ES 2 887 039 T3

Asp Met Leu Glu Lys Glu Asn Glu Trp Met Asp Ala Gly Thr Lys Arg
 420 425 430
 Lys Ala Lys Glu Lys Ala Arg Ala Val Leu Ala Lys Val Gly Tyr Pro
 435 440 445
 Glu Phe Ile Met Asn Asp Thr His Val Asn Glu Asp Leu Lys Ala Ile
 450 455 460
 Lys Phe Ser Glu Ala Asp Tyr Phe Gly Asn Val Leu Gln Thr Arg Lys
 465 470 475 480
 Tyr Leu Ala Gln Ser Asp Phe Phe Trp Leu Arg Lys Ala Val Pro Lys
 485 490 495
 Thr Glu Trp Phe Thr Asn Pro Thr Thr Val Asn Ala Phe Tyr Ser Ala
 500 505 510
 Ser Thr Asn Gln Ile Arg Phe Pro Ala Gly Glu Leu Gln Lys Pro Phe
 515 520 525
 Phe Trp Gly Thr Glu Tyr Pro Arg Ser Leu Ser Tyr Gly Ala Ile Gly
 530 535 540
 Val Ile Val Gly His Glu Phe Thr His Gly Phe Asp Asn Asn Gly Arg
 545 550 555 560
 Lys Tyr Asp Lys Asn Gly Asn Leu Asp Pro Trp Trp Ser Thr Glu Ser
 565 570 575
 Glu Glu Lys Phe Lys Glu Lys Thr Lys Cys Met Ile Asn Gln Tyr Ser
 580 585 590
 Asn Tyr Tyr Trp Lys Lys Ala Gly Leu Asn Val Lys Gly Lys Arg Thr
 595 600 605
 Leu Gly Glu Asn Ile Ala Asp Asn Gly Gly Leu Arg Glu Ala Phe Arg
 610 615 620
 Ala Tyr Arg Lys Trp Ile Asn Asp Arg Arg Gln Gly Leu Glu Glu Pro
 625 630 635 640

ES 2 887 039 T3

Leu Leu Pro Gly Ile Thr Phe Thr Asn Asn Gln Leu Phe Phe Leu Ser
645 650 655

Tyr Ala His Val Arg Cys Asn Ser Tyr Arg Pro Glu Ala Ala Arg Glu
660 665 670

Gln Val Gln Ile Gly Ala His Ser Pro Pro Gln Phe Arg Val Asn Gly
675 680 685

Ala Ile Ser Asn Phe Glu Glu Phe Gln Lys Ala Phe Asn Cys Pro Pro
690 695 700

Asn Ser Thr Met Asn Arg Gly Met Asp Ser Cys Arg Leu Trp
705 710 715

<210> 5
<211> 1524
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Fosfatasa alcalina soluble codificante

<400> 5

```

ggatccacca tgatttcacc attcttagta ctggccattg gcacctgect tactaaactcc      60
ttagtgccag agaaagagaa agaccccaag tactggcgag accaagcgca agagacactg      120
aaatatgccc tggagcttca gaagctcaac accaacgtgg ctaagaatgt catcatgttc      180
ctgggagatg ggatgggtgt ctccacagtg acggctgccc gcatcctcaa gggtcagctc      240
caccacaacc ctggggagga gaccaggctg gagatggaca agttcccctt cgtggccctc      300
tccaagacgt acaacaccaa tgcccaggtc cctgacagcg ccggcaccgc caccgcctac      360
ctgtgtgggg tgaaggccaa tgagggcacc gtgggggtaa gcgcagccac tgagcgttcc      420
cgggtgaaca ccaccaggg gaacgaggtc acctccatcc tgcgtgggc caaggacgt      480
gggaaatctg tgggcattgt gaccaccacg agagtgaacc atgccacccc cagcgccgcc      540
tacgcccact cggtgaccg ggactggtac tcagacaacg agatgcccc tgaggccttg      600
agccagggct gtaaggacat cgcctaccag ctcatgcata acatcaggga cattgacgtg      660
atcatggggg gtggccgga atacatgtac cccaagaata aaactgatgt ggagtatgag      720
agtgacgaga aagccagggg cagcaggctg gacggcctgg acctcggtga cacctggaag      780
agcttcaaac cgagatacaa gcactccac ttcattctga accgcacgga actcctgacc      840

```

```

cttgaccccc acaatgtgga ctacctattg ggtctcttcg agccagggga catgcagtac    900
gagctgaaca ggaacaacgt gacggaccgg tcactctccg agatgggtggg ggtggccatc    960
cagatcctgc ggaagaaccc caaaggcttc ttcttgctgg tggaggagg cagaattgac    1020
cacgggcacc atgaaggaaa agccaagcag gccctgcatg aggcgggtgga gatggaccgg    1080
gccatcgggc aggcaggcag cttgacctcc tcggaagaca ctctgaccgt ggtcactgcg    1140
gaccattccc acgtcttcac atttggtgga tacaccccc gtggcaactc tatctttggt    1200
ctggccccc tgcgtgagtga cacagacaag aagcccttca ctgccatcct gtatggcaat    1260
gggcctggct acaagggtggg gggcggtgaa cgagagaatg tctccatggg ggactatgct    1320
cacaacaact accaggcgca gtcgtctgtg cccctgcgcc acgagaccca cggcggggag    1380
gacgtggcgg tcttctccaa gggcccatg ggcacactgc tgcacggcgt ccacgagcag    1440
aactacgtcc cccacgtgat ggcgtatgca gcctgcatcg gggccaacct cggccactgt    1500
gctcctgcc gctcgtagtc taga                                           1524

```

<210> 6
 <211> 502
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fosfatasa alcalina soluble

<400> 6

```

Met Ile Ser Pro Phe Leu Val Leu Ala Ile Gly Thr Cys Leu Thr Asn
 1             5             10             15

Ser Leu Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Lys Tyr Trp Arg Asp Gln
      20             25             30

Ala Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Glu Leu Gln Lys Leu Asn Thr
      35             40             45

Asn Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val
      50             55             60

Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn
      65             70             75             80

Pro Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Phe Val Ala

```

ES 2 887 039 T3

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

ES 2 887 039 T3

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

<210> 7
 <211> 1554
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Conjugado de fosfatasa alcalina soluble codificante
 <400> 7

```

ggatccacca tgatttcacc attcttagta ctggccattg gcacctgcct tactaactcc 600
ttagtgccag agaaagagaa agaccccaag tactggcgag accaagcgca agagacactg 1200
aaatatgccc tggagcttca gaagctcaac accaacgtgg ctaagaatgt catcatgttc 1800
ctgggagatg ggatgggtgt ctccacagtg acggtgccc gcatacctcaa gggtcagctc 2400
caccacaacc ctggggagga gaccaggctg gagatggaca agttcccctt cgtggccctc 3000
tccaagacgt acaacaccaa tgcccaggtc cctgacagcg ccggcaccgc caccgcctac 3600
ctgtgtgggg tgaaggcaa tgagggcacc gtgggggtaa ggcagccac tgagcgttcc 4200
cggtgcaaca ccaccaggg gaacgaggtc acctccatcc tgcgctgggc caaggacgct 4800
gggaaatctg tgggcattgt gaccaccacg agagtgaacc atgccacccc cagcgccgcc 5400
tacgcccact cggctgaccg ggactggtag tcagacaacg agatgcccc tgaggccttg 6000
agccagggct gtaaggacat cgcctaccag ctcatgcata acatcaggga cattgacgtg 6600
atcatggggg gtggccggaa atacatgtac cccaagaata aaactgatgt ggagtatgag 7200
agtgacgaga aagccagggg cacgaggctg gacggcctgg acctcggtga cacctggaag 7800
agcttcaaac cgagatacaa gcactccac ttcattctga accgcacgga actcctgacc 8400
cttgaccccc acaatgtgga ctacctattg ggtctcttcg agccagggga catgcagtac 9000
gagctgaaca ggaacaacgt gacggacccg tcactctccg agatgggtgt ggtggccatc 9600
cagatcctgc ggaagaaccc caaaggcttc ttcttctggt tggaaggagg cagaattgac 10200
cacgggcacc atgaaggaaa agccaagcag gccctgcatg aggcggtgga gatggaccgg 10800
gccatcgggc aggcaggcag cttgacctcc tcggaagaca ctctgaccgt ggtcactgcg 11400
gaccattccc acgtcttcac atttggtgga tacaccccc gtggcaactc tatctttggt 12000
ctggcccca tgctgagtga cacagacaag aagcccttca ctgccatcct gtatggcaat 12600
gggcctggct acaagggtgt gggcggtgaa cgagagaatg tctccatggt ggactatgct 13200
cacaacaact accaggcgca gtctgctgtg cccctgcgcc acgagacca cggcggggag 13800
gacgtggccg tcttctccaa gggcccatg gcgcacctgc tgcacggcgt ccacgagcag 14400
aactacgtcc cccacgtgat ggcgtatgca gcctgcatcg gggccaacct cggccactgt 15000
gctcctgcca gctcggtatg cgacgatgat gacgatgat acgactagtc taga 1554

```

<210> 8
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Conjugado de fosfatasa alcalina soluble
 <400> 8

ES 2 887 039 T3

Met Ile Ser Pro Phe Leu Val Leu Ala Ile Gly Thr Cys Leu Thr Asn
1 5 10 15

Ser Leu Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Lys Tyr Trp Arg Asp Gln
20 25 30

Ala Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Glu Leu Gln Lys Leu Asn Thr
35 40 45

Asn Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val
50 55 60

Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn
65 70 75 80

Pro Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Phe Val Ala
85 90 95

Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly
100 105 110

Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val
115 120 125

Gly Val Ser Ala Ala Thr Glu Arg Ser Arg Cys Asn Thr Thr Gln Gly
130 135 140

Asn Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser
145 150 155 160

Val Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala
165 170 175

Ala Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met
180 185 190

Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu

ES 2 887 039 T3

195	200	205
Met His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys		
210	215	220
Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu		
225	230	235 240
Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp		
	245	250 255
Lys Ser Phe Lys Pro Arg Tyr Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg		
	260	265 270
Thr Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val Asp Tyr Leu Leu Gly		
	275	280 285
Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val		
	290	295 300
Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val Ala Ile Gln Ile Leu		
305	310	315 320
Arg Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile		
	325	330 335
Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala		
	340	345 350
Val Glu Met Asp Arg Ala Ile Gly Gln Ala Gly Ser Leu Thr Ser Ser		
	355	360 365
Glu Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr		
	370	375 380
Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro		
385	390	395 400
Met Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly		
	405	410 415
Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser		
	420	425 430

ES 2 887 039 T3

Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro
435 440 445

Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ser Lys
450 455 460

Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Val
465 470 475 480

Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Leu Gly His
485 490 495

Cys Ala Pro Ala Ser Ser Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
500 505 510

5	<210> 9 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido	
15	<400> 9 gatccgatga cgatgacgat gacgc	25
20	<210> 10 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido	
30	<400> 10 ggccgctga tcgtcatcgt catcg	25
35	<210> 11 <211> 37 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido	
45	<400> 11 gatccgatga cgatgacgat gacgatgacg atgacgc	37
	<210> 12 <211> 37 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 12 ggccgctga tcgtcatcgt catcgtcatc gtcacg	37
	<210> 13 <211> 55 <212> ADN	

ES 2 887 039 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
5	<400> 13 gatccgatga cgatgacgat gacgatgacg atgacgatga cgatgacgat gacgc	55
10	<210> 14 <211> 55 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 14 ggccgctga tcgtcatcgt catcgtcatc gtcacgtca tcgtcatcgt catcg	55
20	<210> 15 <211> 61 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 15 gatccgatga cagtagtgag tcactctgaca gtggcagttc aagtgagagc gatggtgacg	60
30	c	61
	<210> 16 <211> 61 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido	
40	<400> 16 ggccgctga ccacgctct cacttgaact gccactgtca gatgactcac tactgtcatc g	60 61
45	<210> 17 <211> 52 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 17 gatccgattc atctgaagag aaatttttgc gtagaattgg aagattcggg gc	52
55	<210> 18 <211> 55 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 18 ggccgcaccg aatcttcaa ttctacgcaa aaatttctct tcagatgaat cg	52

5	<210> 19 <211> 58 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Oligonucleótido	
10	<400> 19 gatcctgtta tgaatcacat gaaagcatgg aatcttatga acttaatccc ttcatgac	58
15	<210> 20 <211> 58 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Oligonucleótido	
20	<400> 20 ggccgcaatg aagggattaa gttcataaga ttcatgctt tcatgtgatt cataacag	58
25	<210> 21 <211> 46 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Oligonucleótido	
30	<400> 21 gatccagaa tgctgtgtcc tctgaagaaa ccaatgactt taaagc	46
35	<210> 22 <211> 46 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Oligonucleótido	
40	<400> 22 ggccgcttta aagtcattgg ttcttcaga ggacacagca ttctgg	46
45	<210> 23 <211> 64 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Oligonucleótido	
50	<400> 23 gatccggcag tagtgactca tccgaagaaa atggagatga cagttcagaa gaggaggagg	60
55	aagc	64
60	<210> 24 <211> 64 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Oligonucleótido	

	<400> 24		
	ggccgcttcc tcctcctctt ctgaactgtc atctccattt tcttcggatg agtcactact	60	
	gccg	64	
5	<210> 25 <211> 61 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> Oligonucleótido		
	<400> 25		
	gatcccgcaa aggattctac aagagaaagc agtgcaaacc ttcccggtggc cgcaagcgtg	60	
	c	61	
15	<210> 26 <211> 61 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> Oligonucleótido		
	<400> 26		
	ggccgcacgc ttgcggccac gggaagggtt gcaactgctt ctcttgtaga atcctttgcg	60	
	g	61	
25	<210> 27 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial		
30	<220> <223> Oligonucleótido		
35	<400> 27		
	agtcgggatc cggaacaagc agcgtgttct ac	32	
	<210> 28 <211> 39 <212> ADN <213> Artificial		
40	<220> <223> Oligonucleótido		
45	<400> 28		
	agatcgggc cgctcaattg tgcacggtgt gattaaagg	39	
	<210> 29 <211> 36 <212> ADN <213> Artificial		
50	<220> <223> Oligonucleótido		
55	<400> 29		
	ccggagatga cgatgacgat gacgatgacg atgact	36	
60	<210> 30 <211> 36		

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 30
 tctactgcta ctgctactgc tactgctact gaggcc 36

 10 <210> 31
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Fragmento humano de MEPE

 <400> 31
 Asp Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser Asp
 1 5 10 15

 Gly Asp

 20 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Fragmento humano de estateterina

 <400> 32
 Asp Ser Ser Glu Glu Lys Phe Leu Arg Arg Ile Gly Arg Phe Gly
 1 5 10 15

 30 <210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

 35 <220>
 <223> Fragmento humano de MGP

 40 <400> 33
 Cys Tyr Glu Ser His Glu Ser Met Glu Ser Tyr Glu Leu Asn Pro Phe
 1 5 10 15

 Ile

 45 <210> 34
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Fragmento humano de OPN

 <400> 34
 Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu Glu Thr Asn Asp Phe Lys
 1 5 10

 55 <210> 35
 <211> 18
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento humano de BSP2

5

<400> 35

Gly Ser Ser Asp Ser Ser Glu Glu Asn Gly Asp Asp Ser Ser Glu Glu
1 5 10 15

Glu Glu

<210> 36

10

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> Fragmento humano de IGFBP5

<400> 36

Arg Lys Gly Phe Tyr Lys Arg Lys Gln Cys Lys Pro Ser Arg Gly Arg
1 5 10 15

Lys Arg

<210> 37

20

<211> 151

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25

<223> Dominio de unión a colágeno de adhesina de colágeno de staphilococcus aureus M81736

<400> 37

ES 2 887 039 T3

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

5 <210> 38
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador de oligonucleótidos

<400> 38
cagtcaaggt ctctatccg gaagtctcca agctaaacag g 41

15 <210> 39
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador de oligonucleótidos

<400> 39
ctgttttagct tggagacttc cggataagag accttgactg g 41

25 <210> 40
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador de oligonucleótidos

<400> 40
tggatccacc atgattcac cattcttagt ac 32

5	<210> 41 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de oligonucleótidos	
10	<400> 41 ttctagacta cgagctggca ggagcacagt ggccg	35
15	<210> 42 <211> 65 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador de oligonucleótidos	
	<400> 42	
	ttctagacta gtcgtcatca tcgtcatcat cgtcgtcatc cgagctggca ggagcacagt	60
	ggccg	65
25	<210> 43 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador de oligonucleótidos	
35	<400> 43 gataaagcag gtcttggggt gcacc	25
40	<210> 44 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de oligonucleótidos	
45	<400> 44 gttggcatct gtcacgggct tgtgg	25

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de administración ósea que tiene la estructura:

Z-sALP-Y-D_n-X,

donde X está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido;

Y está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido;

Z está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido;

D_n es un poliaspartato, donde n=10 a 16; y

sALP es una fosfatasa alcalina soluble;

y un disolvente acuoso estéril farmacéuticamente aceptable que comprende una solución de cloruro de sodio tamponada formulada para administración parenteral.

2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, donde un extremo amínico de la sALP comprende una eliminación que no es perjudicial para la función enzimática.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, donde la sALP es catalíticamente competente cuando está unida a cristales de hidroxiapatita en el hueso.

4. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la sALP es una forma soluble secretada de una fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNALP), preferentemente donde la sALP es una forma soluble secretada de una TNALP que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de la SEQ ID NO: 5.

5. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la composición se formula para proporcionar:

a) aproximadamente 1 mg a aproximadamente 25 g del conjugado al hueso por día; o

b) aproximadamente 50 mg a aproximadamente 10 g del conjugado al hueso por día; o

c) aproximadamente 100 mg a aproximadamente 5 g del conjugado al hueso por día; o

d) aproximadamente 1 gramo del conjugado al hueso por día; o

e) aproximadamente 1 mg a aproximadamente 25 g del conjugado al hueso por semana; o

f) aproximadamente 50 mg a aproximadamente 10 g del conjugado al hueso por semana; o

g) aproximadamente 100 mg a aproximadamente 5 g del conjugado al hueso cada dos días; o

h) aproximadamente 1 gramo del conjugado al hueso por semana.

6. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde n=10.

7. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso como un medicamento.

8. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la composición farmacéutica para uso de la reivindicación 7, para uso en el tratamiento de una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizada por una falta o una cantidad insuficiente de fosfatasa alcalina funcional.

9. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, donde dicha afección o enfermedad es hipofosfatasia (HPP).

10. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 9, donde dicha HPP es HPP perinatal, infantil, de la niñez o del adulto.

11. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde la composición se formula para administración:

a) diaria, semanal, mensual o fracciones de la misma; y/o

b) de una cantidad del conjugado de desde aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal por día; y/o

5 c) en un régimen de dosificación único o múltiple; y/o

d) para uso en un humano.

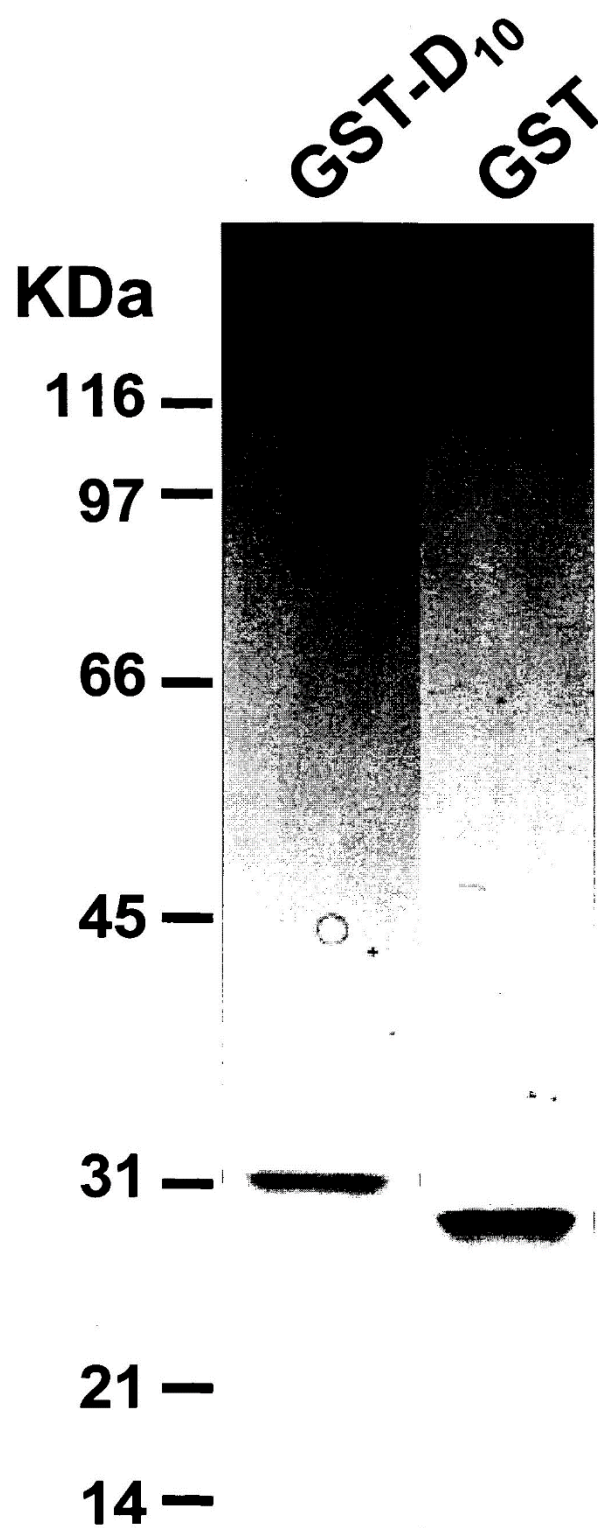


Figura 1

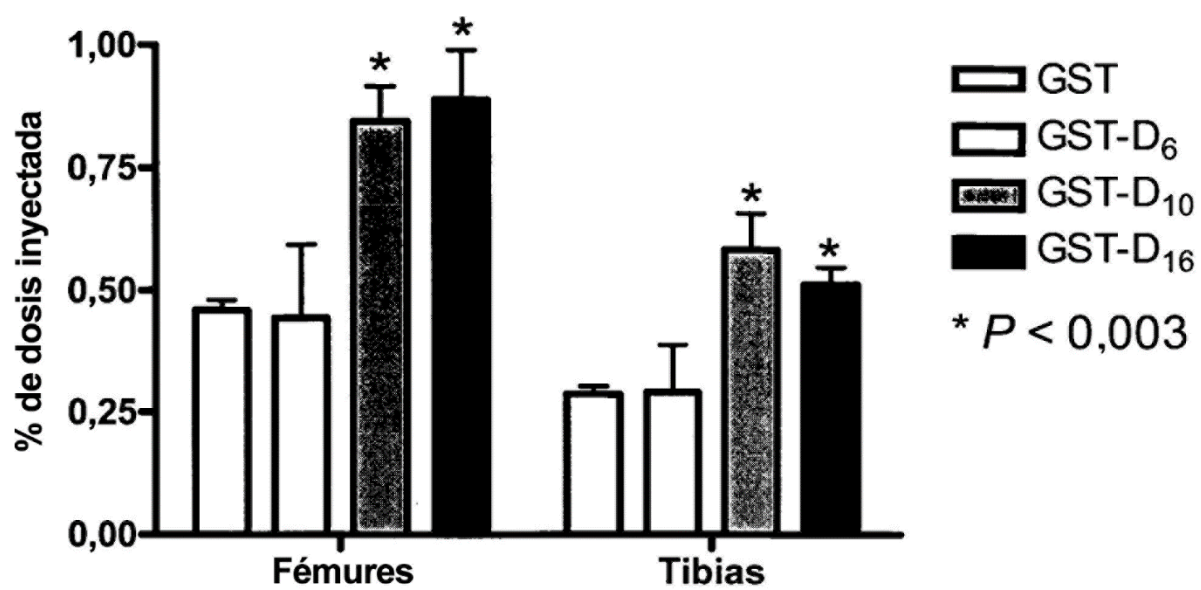


Figura 2

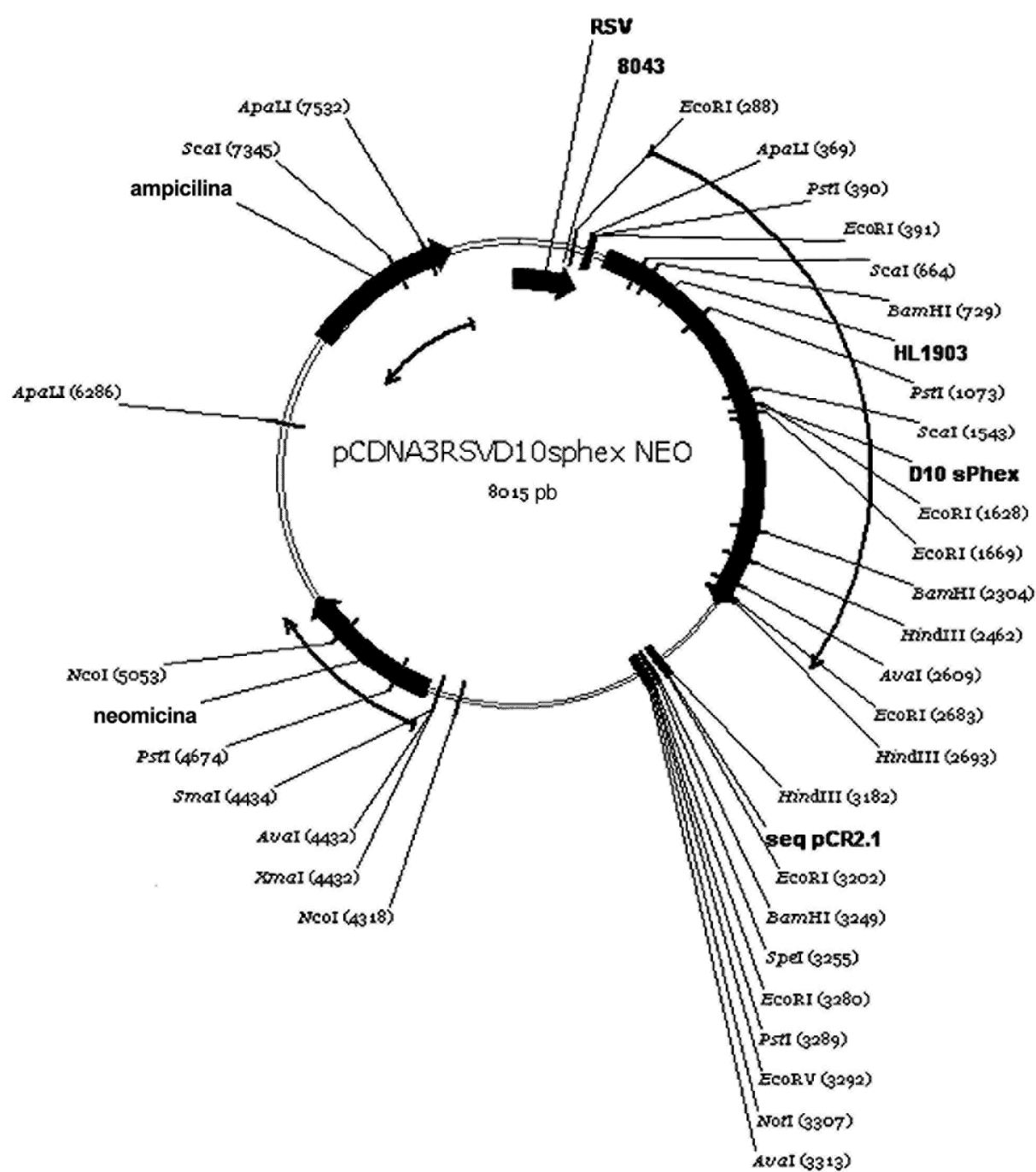


Figura 3

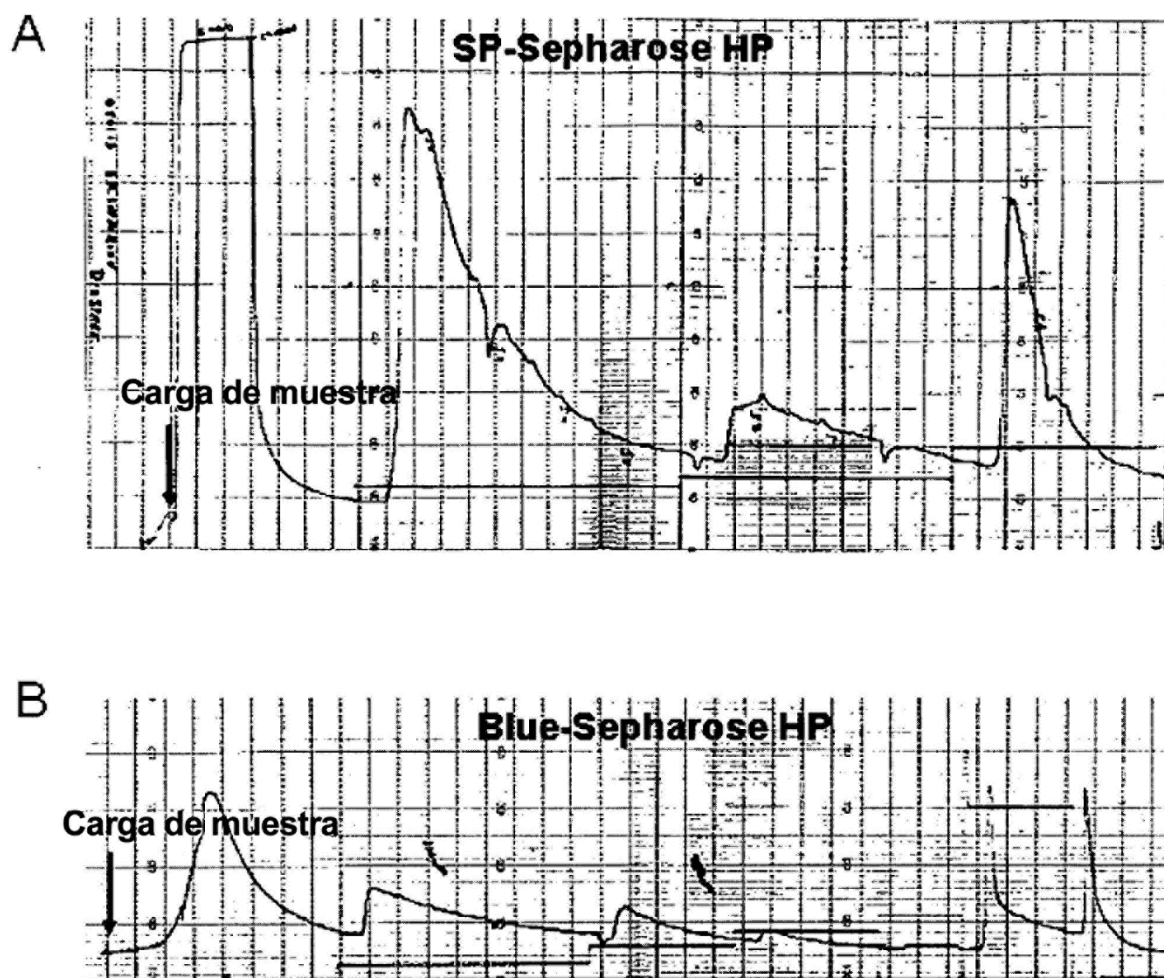


Figura 4

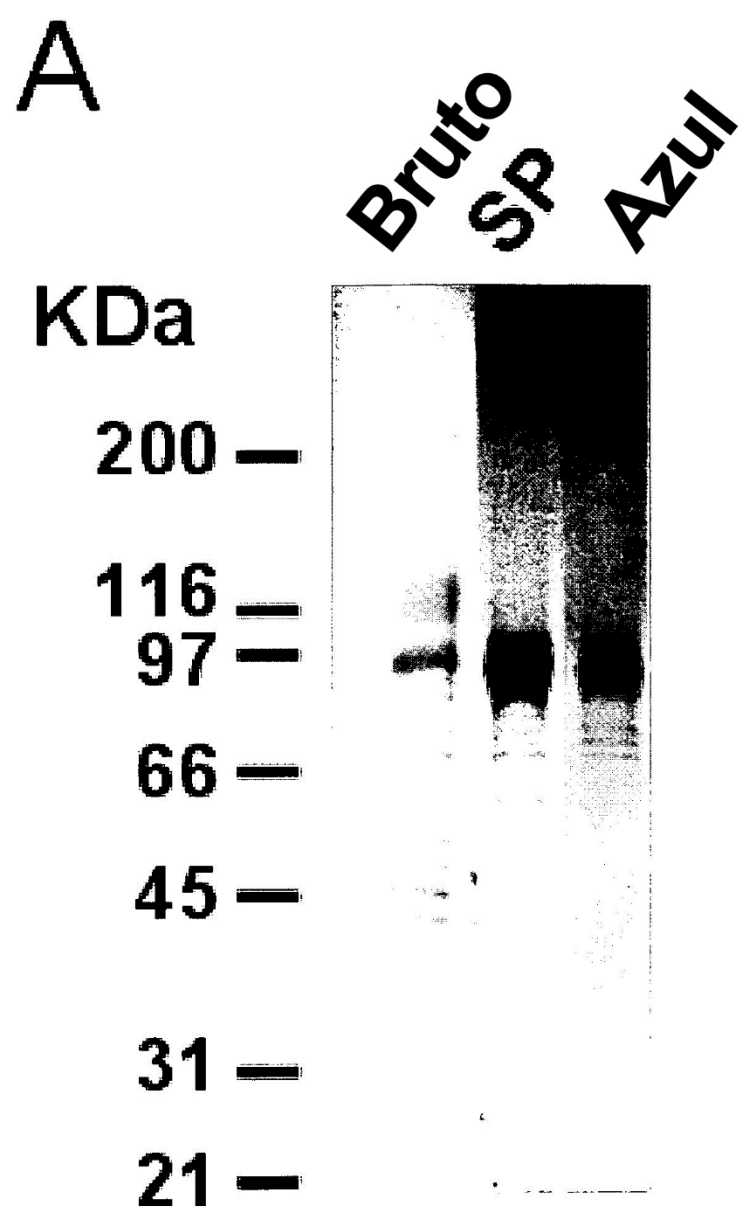


Figura 5

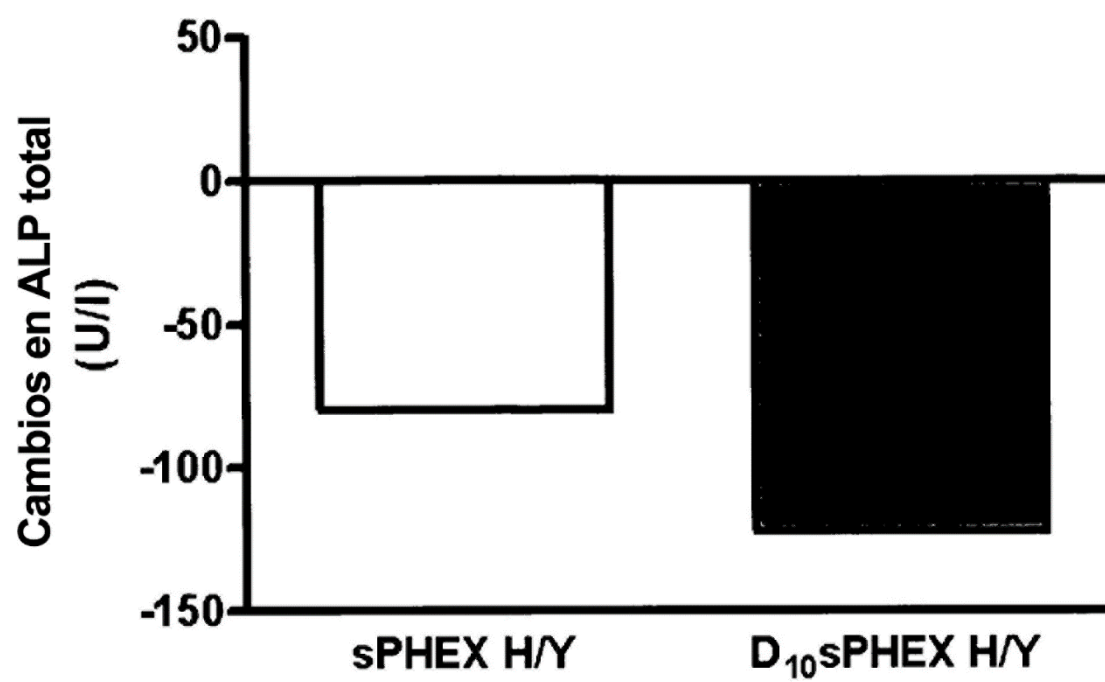


Figura 6

atggaagcagaaacagggagcagcgtggagactggaaagaaggccaacagaggcac
 tcgaattgccctggctcgtgtttgtcctgacagtgatcgctcaacaaacaaccagtc
 aaggtctcttatccggagatgacgatgacgatgacgatgactccggaagt
 ctccaagctaaacaggagtagtgcctgaagccagaatgcatcgaagcggctgctgc
 catcttaagtaaagtaaattctgtctgtggatccttgtgataatttcttccggttcg
 cttgtgatggctggataagcaataatccaattcccgaagatatgccaagctatggg
 gtttatccttggctgagacataatgttgacctcaagttgaaggaacttttggagaa
 atcaatcagtagaaggcgggacaccgaagccatacagaaagccaaaatcctttatt
 catcctgcatgaatgagaaagcgattgaaaaagcagatgccaagccactgctacac
 atcctacggcattcaccttccgctggcccgtgcttgaatctaataattggccctga
 aggggtttggctcagagagaaagttcagccttctgcagacacttgcaacgtttcgtg
 gtcaatacagcaatttctgtgttcacccgtttgtatgtgtccccctgatgacaaagca
 tccaatgaacatatcttgaagctggaccaagcaacactctccctggccgtgagggga
 agactaccttgataacagtagacaagccaagctcttatcgggatgccctttacaagt
 tcatggtggataactgccgtgcttttaggagctaacagttccagagcagagcatgac
 atgaagtcagtgctcagattggaaattaagatagctgagataatgattccacatga
 aaaccgaaccagcagggccatgtacaacaaaatgaacatttctgaactgagtgtcta
 tgattccccagttcgactggctgggctacatcaagaaggctcattgacaccagactc
 tcccccatctgaaagacatcagccccctccgagaatgtggtggctccgcgtcccga
 gtactttaagatttgtttaggatattagggctctgagagaaagaagaccattgcca
 actatttggtgtggagaatggttttattccagaattccaaaccttagcaggcgcttt
 cagtatagatggctggaattctcaagggtaatccaggggaccacaactttgctgcc
 tcaatgggacaaatgtgtaaactttattgaaagtgccctcccttatgttggtggaa
 agatgtttgtagatgtgtacttccaggaagataagaaggaaatgatggaggaattg
 gttgagggcgcttcgctgggcctttattgacatgctagagaaagaaaatgagtggat
 ggatgcaggaacgaaaaggaaagccaaagaaaaggcgagagctgttttggcaaaag
 ttggctatccagagtttataatgaatgatactcatgttaatgaagacctcaaagct
 atcaagttttcagaagccgactactttggcaacgtcctacaaactcgcaagtattt
 agcacagtctgatttcttctggctaagaaaagccgttccaaaaacagagtggttta
 caaatccgacgactgtcaatgccttctacagtgcacccaccaaccagatccgattt
 ccagcaggagagctccagaagcctttcttttggggaacagaatatcctcgatctct
 gagttatggtgctataggagtaattgtcggacatgaatttacacatggatttgata
 ataatggtagaaaatatgataaaaatggaaacctggatccttgggtggtctactgaa
 tcagaagaaaagttaaggaaaaaacaaaatgcatgattaaccagtatagcaacta
 ttatttgaagaaaagctggcttaaatgtcaaggggaagaggaccctgggagaaaata
 ttgctgataatggaggcctgcgggaagcttttagggcttacaggaaatggataaat
 gacagaaggcagggacttgaggagcctcttctaccaggcatcacattcaccaacaa
 ccagctcttcttctgagttatgctcatgtgaggtgcaattcctacagaccagaag
 ctgcccagagaacaagtccaaattggtgctcacagtccccctcagtttagggtaaat
 ggtgcaattagtaactttgaagaattccagaaagcttttaactgtccaccaattc
 cacgatgaacagaggcatggactcctgccgactctggt**tag**

Figura 7

MEAETGSSVETGKKANRGTRIALVVFVLTVIAQQTTSSQGLLSGDDDDDDDDDDSGS
 LQAKQEYCLKPECIEAAAAILSKVNLSVDPCDNFFRFACDGWISNNPIPEDMPSYG
 VYPWLRHNVDLKLKELLEKSISRRTDEAIQKAKILYSSCMNEKAIEKADAKPLLH
 ILRHSPFRWPVLESNIGPEGVWSEKFSLLQTLATFRGQYSNSVFIRLYVSPDDKA
 SNEHILKLDQATLSLAVREDYLDNSTEAKSYRDALYKFMVDTAVLLGANS SRAEHD
 MKSVLRLEIKIAEIMIPHENRTSEAMYNKMNI SELSAMIPQFDWLGYIKKVIDTRL
 YPHLKDISPSENVVVRVPQYFKDLFRILGSEKKTIANYLWVRMVYSRIPNLSRRF
 QYRWLEFSRVIQGTTLTPQWDKCVNFIESALPYVVGKMFVDVYFQEDKKEMMEEL
 VEGVRWAFIDMLEKENEWMDAGTKRKAKEKARAVLAKVGYPEFIMNDTHVNEDLKA
 IKFSEADYFGNVLQTRKYLAQSDFFWLRKAVPKTEWFTNPTTVNAFYSASTNQIRF
 PAGELQKPFFWGTEYPRSLSYGAIGVIVGHEFTHGFDNNGRKYDKNGNLDPWWSTE
 SEEKFKEKTKCMINQYSNYWKKAGLNVKGKRTLGENIADNGGLREAFRAYRKWIN
 DRRQGLEEPLPGITFTNNQLFFLSYAHVRCNSYRPEAAREQVQIGAHSPQFRVN
 GAISNFEEFQKAFNCPPNSTMNRGMDSCRLW

Figura 8

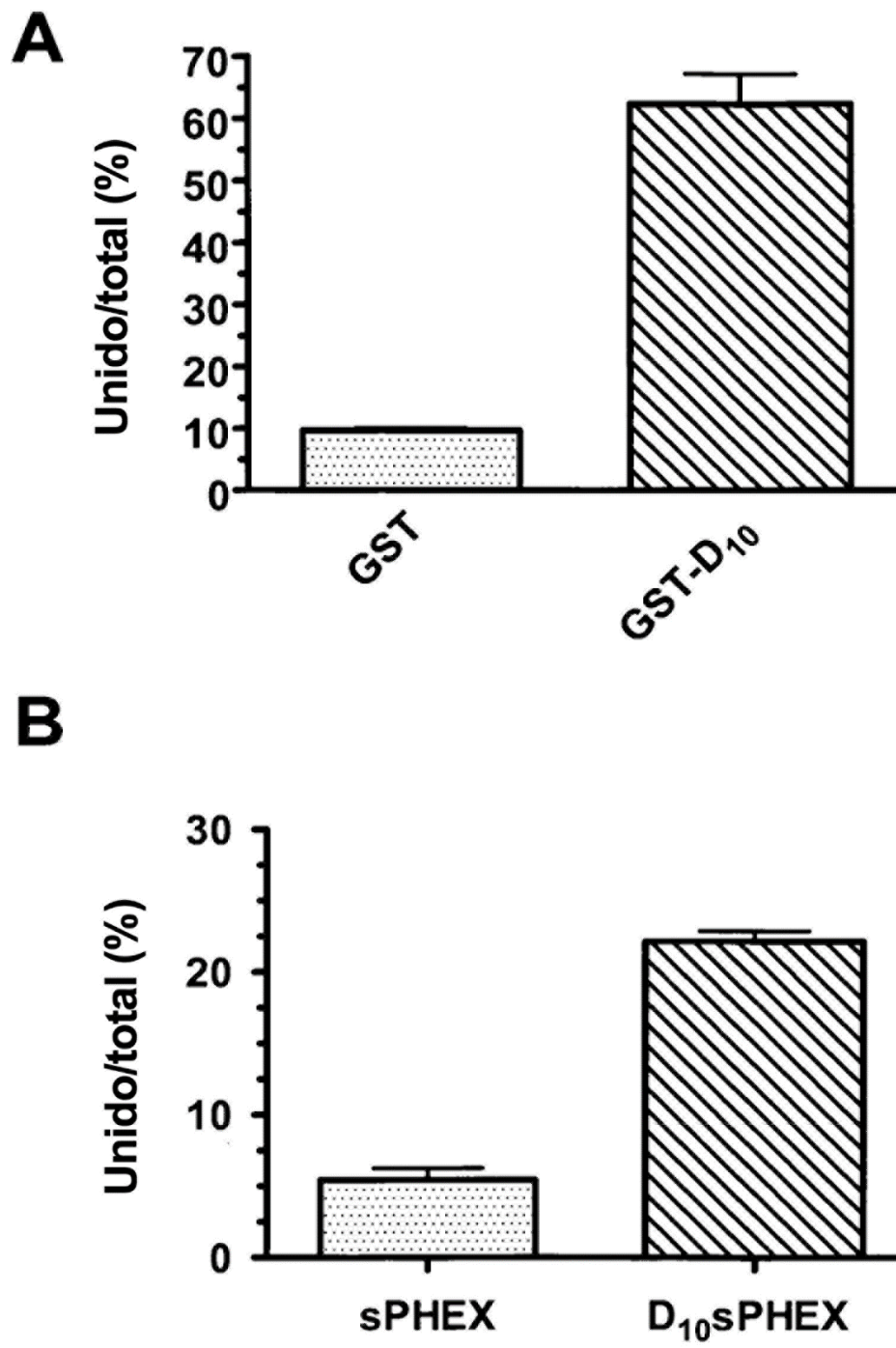


Figura 9

```

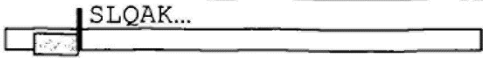
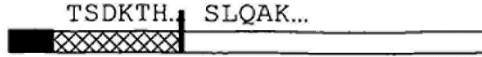
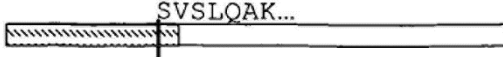
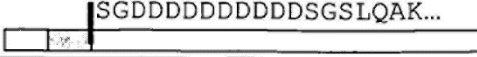
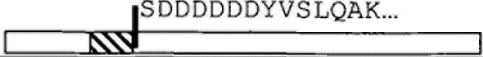
1   MEAETGSSVE TGKKANRGTR IALVVFVGGT LVLGTILFLV SQGLLSLQAK QEYCLKPECI
61  EAAAAILSKV NLSVDPCDNF FRFACDGWIS NNPIPEDMPS YGVYPWLRHN VDLKLKELLE
121 KSISRRTDTE AIQKAKILYS SCMNEKAIEK ADAKPLLHIL RHSPFRWPVL ESNIGPEGVW
181 SERKFSLLOT LATFRGQYSN SVFIRLYVSP DDKASNEHIL KLDQATLSLA VREDYLDNST
241 EAKSYRDALY KFMVDTAVLL GANSSRAEHD MKSVLRLEIK IAEIMIPHEN RTSEAMYNKM
301 NISELSAMIP QFDWLGYYK VIDTRLYPHL KDISPSENVV VRVPQYFKDL FRILGSEKKK
361 TIANYLVWRM VYSRIPNLSR RFQYRWLEFS RVIQGTTLTLL PQWDKCVNFI ESALPYVVGK
421 MFVDVYFQED KKEMMEELVE GVRWAFIDML EKENEWM DAG TKRKAKEKAR AVLAKVGYPE
481 FIMNDTHVNE DLKAIKFSEA DYFGNVLQTR KYLAQSDFFW LRKAVPKTEW FTNPTTVNAF
541 YSASTNQIRF PAGELQKPFF WGTEYPRSL YGAIGVIVGH EFTHGFDNNG RKYDKNGNLD
601 PWWSTESEEEK FKEKTKCMIN QYSNYWKKK GLNVKGKRTL GENIADNGGL REAFRAYRKW
661 INDRRQGLEE PLLPGITFTN NQLFFLSYAH VRCNSYRPEA AREQVQIGAH SPPQFRVNGA
721 ISNSEEFQKA FNCPPNSTMN RGMDSCRLW

```

Figura 10

SGDDDDDDDDDDSGSLQAKQEYCLKPECIEAAAAILSKVNLSVDPDCDNFFRFACDG
WISNNPIPEDMPSYGVYPWLRHNVDLKLKELLEKSISRRTDEAIQKAKILYSSCM
NEKAIEKADAKPLLHILRHSPFRWPVLESNIGPEGVWSEKFSLLQTLATFRGQYS
NSVFIRLYVSPDDKASNEHILKLDQATLSLAVREDYLDNSTEAKSYRDALYKFMVD
TAVLLGANSSRAEHDMKSVLRLEIKIAEIMI PHENRTSEAMYNKMNI SELSAMIPQ
FDWLG YIKKVIDTRLYPHLKDISPSENVVVRVPQYFKDLFRILGSEKKTIAN YLV
WRMVYSRIPNLSRRFQYRWLEFSRVIQGT TLLPQWDKCVNFIESALPYVVGKMFV
DVYFQEDKKEMMEELVEGVRWAFIDMLEKENEWMDAGTKRKAKEKARAVLAKVGYP
EFIMNDTHVNEDLKAIFSEADYFGNVLQTRKYLAQSDFFWLRKAVPKTEWFTNPT
TVNAFYASTNQIRFPAGELQKPFFWGTEYPRSLSYGAIGVIVGHEFTHGFDNNGR
KYDKNGNLD PWWSTEEKFKEKTKCMINQYSNYYWKKAGLNVKGKRTLGENIADN
GGLREAFRAYRKWINDRRQGLEEPLLPGITFTNNQLFFLSYAHVRCNSYRPEAARE
QVQIGAHSP PQFRVNGAISNFEEFQKAFNCPPNSTMNRGMDSCLW

Figura 11

	Construcción de proteína	Actividad específica (UAF/seg/μg)	Representación esquemática
1	sPHEX	12,3	
2	Fc-sPHEX	5,75	
3	pCDNA3-RSV-NL1 furina-sPHEX	N/A	
4	D ₁₀ sPHEX	12,0	
5	D ₆ sPHEX	8,55	

 : Representa el dominio transmembrana mutado de PHEX

 : Representa el péptido señal de IgG1 humano

 : Representa la bisagra de dominios de cadena pesada de IgG1 humano, CH2 y CH3

 : Secuencia de extremo N 1 con el sitio de escisión de furina (RTVVKR|SV).

| : Sitio de escisión de furina

| : Sitio de escisión de señal de peptidasa

Figura 12

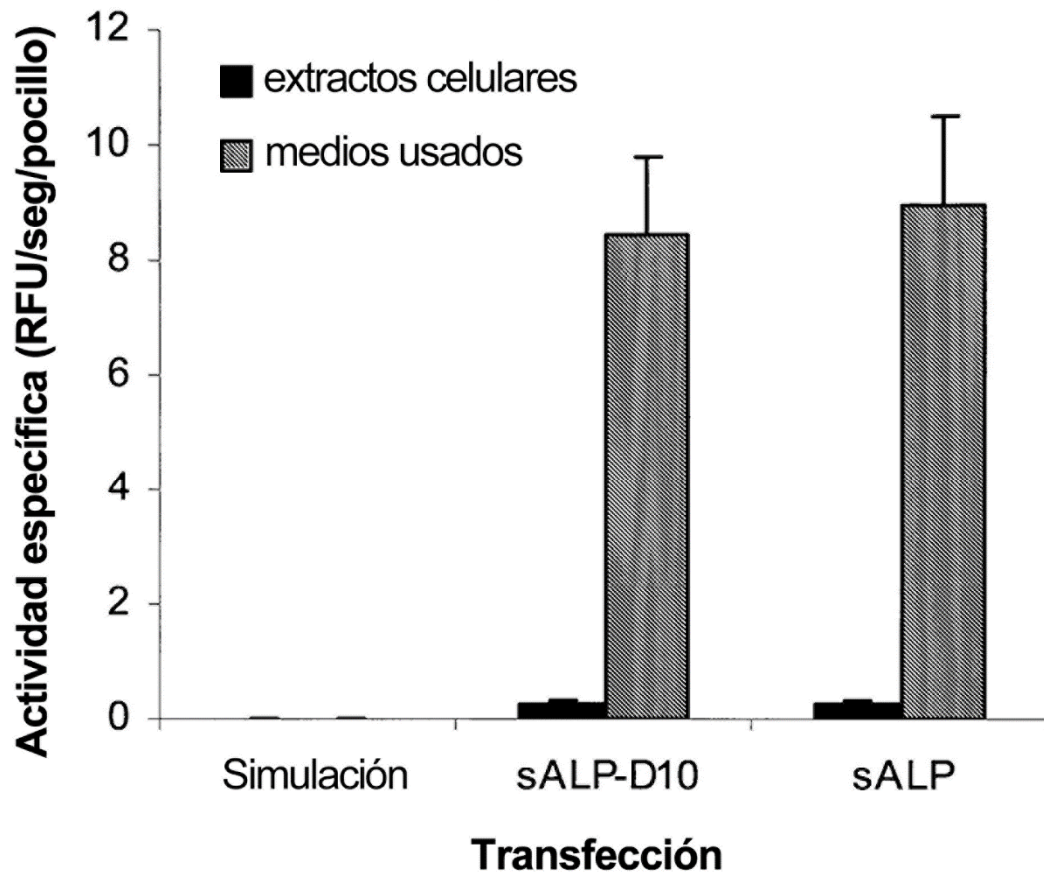


Figura 13

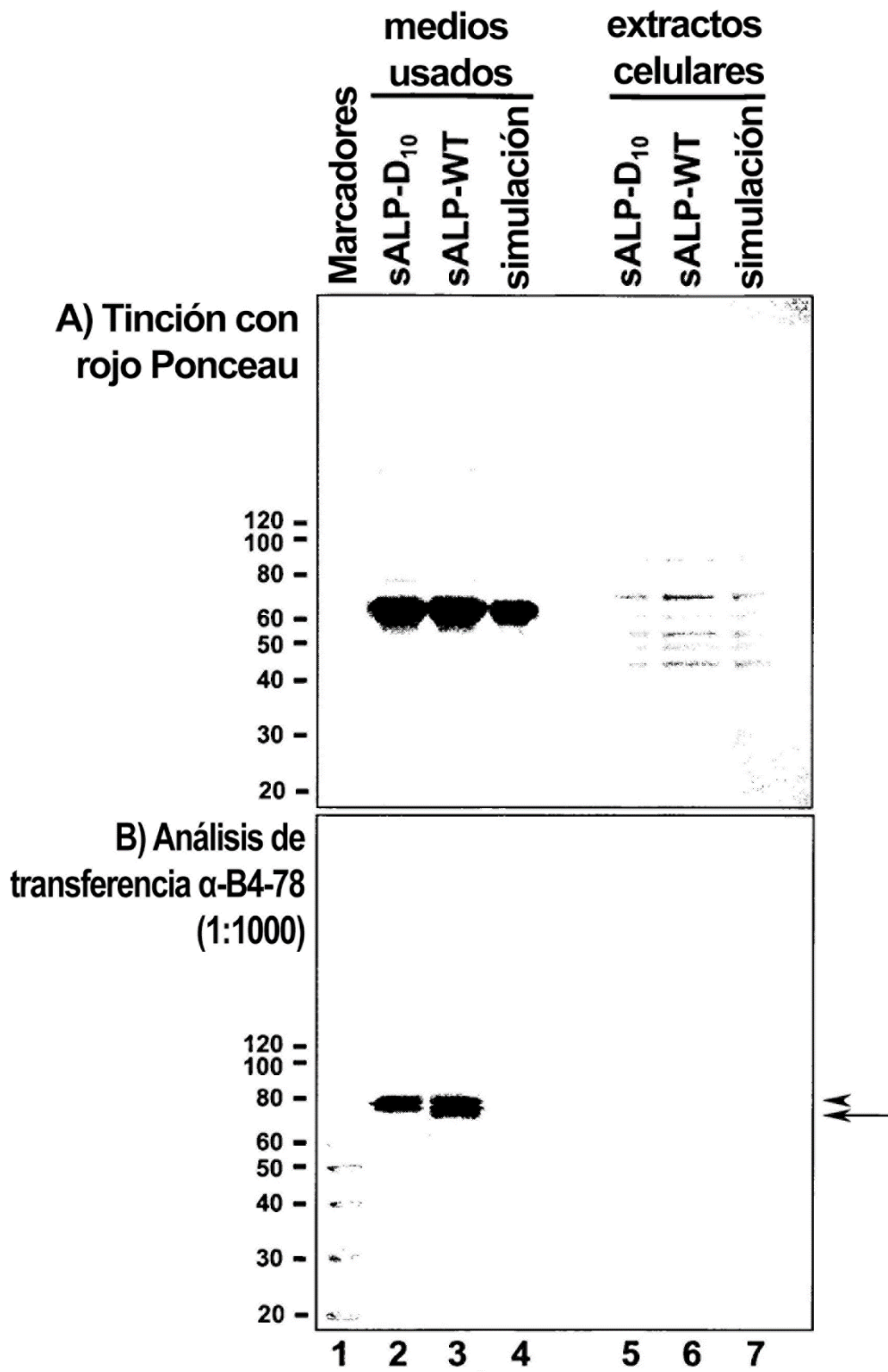


Figura 14

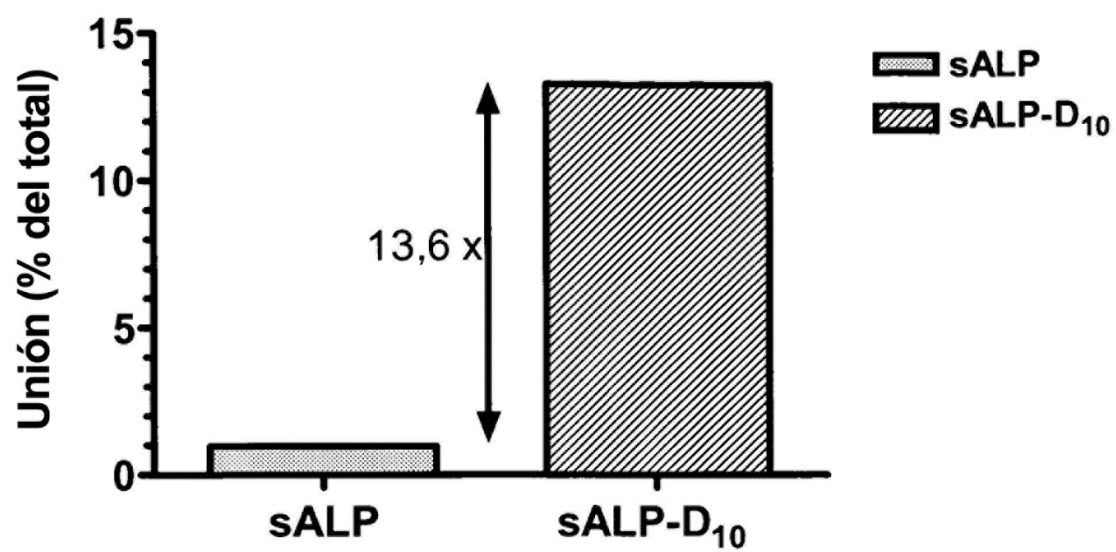


Figura 15

A

BamHI
 ~~~~~

|      |            |            |            |            |            |             |            |
|------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| 1    | GGATCCACCA | TGATTTACC  | ATTCTTAGTA | CTGGCCATTG | GCACCTGCCT | TACTAACTCC  | TTAGTGCCAG |
| 71   | AGAAAGAGAA | AGACCCCAAG | TACTGGCGAG | ACCAAGCGCA | AGAGACACTG | AAATATGCCC  | TGGAGCTTCA |
| 141  | GAAGCTCAAC | ACCAACGTGG | CTAAGAATGT | CATCATGTTT | CTGGGAGATG | GGATGGGTGT  | CTCCACAGTG |
| 211  | ACGGCTGCC  | GCATCCTCAA | GGGTAGCTC  | CACCACAACC | CTGGGGAGGA | GACCGAGGTG  | GAGATGGACA |
| 281  | AGTTCCCTT  | CGTGGCCCTC | TCCAAGACGT | ACAACACCAA | TGCCCAGGTC | CCTGACAGCG  | CCGGCACCGC |
| 351  | CACCGCTAC  | CTGTGTGGGG | TGAAGGCCAA | TGAGGGCACC | GTGGGGGTAA | GCGCAGCCAC  | TGAGCGTTCC |
| 421  | CGGTGCAACA | CCACCCAGGG | GAACGAGGTC | ACCTCCATCC | TGCGCTGGGC | CAAGGACGCT  | GGGAAATCTG |
| 491  | TGGGCATTGT | GACCACCACG | AGAGTGAACC | ATGCCACCCC | CAGCGCCGCC | TACGCCCACT  | CGGCTGACCG |
| 561  | GGACTGGTAC | TCAGACAACG | AGATGCCCCC | TGAGGCCTTG | AGCCAGGGCT | GTAAAGGACAT | CGCCTACCAG |
| 631  | CTCATGCATA | ACATCAGGGA | CATTGACGTG | ATCATGGGGG | GTGGCCGGAA | ATACATGTAC  | CCCAAGAATA |
| 701  | AAACTGATGT | GGAGTATGAG | AGTGACGAGA | AAGCCAGGGG | CACGAGGCTG | GACGGCCTGG  | ACCTCGTTGA |
| 771  | CACCTGGAAG | AGCTTCAAAC | CGAGATACAA | GCACTCCAC  | TTCATCTGGA | ACCGCACGGA  | ACTCCTGACC |
| 841  | CTTGACCCC  | ACAATGTGGA | CTACCTATTG | GGTCTCTTCG | AGCCAGGGGA | CATGCAGTAC  | GAGCTGAACA |
| 911  | GGAACAACGT | GACGGACCGG | TCACTCTCCG | AGATGGTGGT | GGTGGCCATC | CAGATCCTGC  | GGAAGAACCC |
| 981  | CAAAGGCTTC | TTCTTGCTGG | TGGAAGGAGG | CAGAATTGAC | CACGGGCACC | ATGAAGGAAA  | AGCCAAGCAG |
| 1051 | GCCCTGCATG | AGGCGGTGGA | GATGGACCGG | GCCATCGGGC | AGGCAGGCAG | CTTGACCTCC  | TCGGAAGACA |
| 1121 | CTCTGACCGT | GGTCACTGCG | GACCAATCCC | ACGTCTTCAC | ATTTGGTGGA | TACACCCCCC  | GTGGCAACTC |
| 1191 | TATCTTTGGT | CTGGCCCCCA | TGCTGAGTGA | CACAGACAAG | AAGCCCTTCA | CTGCCATCCT  | GTATGGCAAT |
| 1261 | GGGCCTGGCT | ACAAGGTGGT | GGGCGGTGAA | CGAGAGAATG | TCTCCATGGT | GGACTATGCT  | CACAACAAC  |
| 1331 | ACCAGGCGCA | GTCTGCTGTG | CCCCTGCGCC | ACGAGACCCA | CGGCGGGGAG | GACGTGGCCG  | TCTTCTCCAA |
| 1401 | GGGCCCCATG | GCGCACCTGC | TGCACGGCGT | CCACGAGCAG | AACCTACGTC | CCCACGTGAT  | GGCGTATGCA |

XbaI  
 ~~~~~

1471	GCCTGCATCG	GGGCCAACCT	CGGCCACTGT	GCTCCTGCCA	GCTCGTAGTC	TAGA	
------	------------	------------	------------	------------	------------	------	--

B

1	MISFPLVLAI	GTCLTNSLVP	EKEKDPKYWR	DQAQETLKYA	LELQKLNTNV
51	AKNVIMFLGD	GMGVSTVTAA	RILKGQLHHN	PGEETRLEMD	KFPFVALSKT
101	YNTNAQVPDS	AGTATAYLCG	VKANEGTVGV	SAATERSRCN	TTQNEVTSI
151	LRWAKDAGKS	VGIVTTRVN	HATPSAAYAH	SADRDWYSDN	EMPPEALSQG
201	CKDIAYQLMH	NIRDIDVIMG	GGRKMYPKN	KTDVEYESDE	KARGTRLDGL
251	DLVDTWKSFK	PRYKHSFIW	NRTELLTLDP	HNVDYLLGLF	EPGDMQYELN
301	RNNVTDPSLS	EMVVVAIQIL	RKNPKGFLL	VEGGRIDHGH	HEGKAKQALH
351	EAVEMDRAIG	QAGSLTSSSD	TLTVVTADHS	HVFTFGGYTP	RGNSIFGLAP
401	MLSDTDKKPF	TAILYGNPGP	YKVVGGEREN	VSMVDYAHNN	YQAQSAVPLR
451	HETHGGEDVA	VFSKGPMABL	LHGVHEQNYV	PHVMAYAACI	GANLGHCAPA
501	SS				

Figura 16

A

```

BamHI
~~~~~
1   GGATCCACCA TGATTTCACC ATTCTTAGTA CTGGCCATTG GCACCTGCCT TACTAACTCC TTAGTGCCAG
71  AGAAAGAGAA AGACCCCAAG TACTGGCGAG ACCAAGCGCA AGAGACACTG AAATATGCCC TGGAGCTTCA
141 GAAGCTCAAC ACCAACGTGG CTAAGAATGT CATCATGTTC CTGGGAGATG GGATGGGTGT CTCCACAGTG
211 ACGGCTGCCC GCATCCTCAA GGGTCAGCTC CACCACAACC CTGGGGAGGA GACCAGGCTG GAGATGGACA
281 AGTTCCCCTT CGTGGCCCTC TCCAAGACGT ACAACACCAA TGCCCAGGTC CCTGACAGCG CCGGCACCGC
351 CACCGCCTAC CTGTGTGGGG TGAAGGCCAA TGAGGGCACC GTGGGGGTAA GCGCAGCCAC TGAGCGTTCC
421 CGGTGCAACA CCACCCAGGG GAACGAGGTC ACCTCCATCC TGCCTGTTGG CAAGGACGCT GGGAAATCTG
491 TGGGCATTGT GACCACCACG AGAGTGAACC ATGCCACCCC CAGCGCCGCC TACGCCCACT CGGCTGACCG
561 GGACTGGTAC TCAGACAACG AGATGCCCCC TGAGGCCTTG AGCCAGGGCT GTAAGGACAT CGCCTACCAG
631 CTCATGCATA ACATCAGGGA CATTGACGTG ATCATGGGGG GTGGCCGAA ATACATGTAC CCCAAGAATA
701 AAAGTATGAT GGAGTATGAG AGTGACGAGA AAGCCAGGGG CACGAGGCTG GACGGCCTGG ACCTCGTTGA
771 CACCTGGAAG AGCTTCAAAC CGAGATACAA GCACTCCCAC TTCATCTGGA ACCGCACGGA ACTCCTGACC
841 CTTGACCCCC ACAATGTGGA CTACCTATTG GGTCTCTTCG AGCCAGGGGA CATGCAGTAC GAGCTGAACA
911 GGAACAACGT GACGGACCCG TCACTCTCCG AGATGGTGGT GGTGGCCATC CAGATCTGTC GGAAGAACCC
981 CAAAGGCTTC TTCTTGCTGG TGAAGGAGG CAGAATTGAC CACGGGCACC ATGAAGGAAA AGCCAAGCAG
1051 GCCCTGCATG AGGCGGTGGA GATGGACCGG GCCATCGGGC AGGCAGGCAG CTTGACCTCC TCGGAAGACA
1121 CTCTGACCGT GGTCACTGCG GACCATTCCC ACCTCTTCAC ATTTGGTGGG TACACCCCCC GTGGCAACTC
1191 TATCTTTGGT CTGGCCCCCA TGCTGAGTGA CACAGACAAG AAGCCCTTCA CTGCCATCCT GTATGGCAAT
1261 GGGCCTGGCT ACAAGGTGGT GGGCGGTGAA CGAGAGAATG TCTCCATGGT GGAATATGCT CACAACAAC
1331 ACCAGGCGCA GTCTGCTGTG CCCCTGCGCC ACAGAGACCA CGGCGGGGAG GACGTGGCCG TCTTCTCCAA
1401 GGGCCCCATG GCGCACCTGC TGCACGCGCT CCACGAGCAG AACTACGTCC CCCACGTGAT GGCATATGCA
1471 GCCTGCATCG GGGCCAACCT CGGCCACTGT GCTCCTGCCA GCTCGGATGA CGACGATGAT GACGATGATG

XbaI
~~~~~
1541 ACGACTAGTC TAGA

```

B

```

1   MISPLVLAI GTCLTNSLVP EKEKDPKYWR DQAQETLKYA LELQKLNTNV
51  AKNVIMFLGD GMGVSTVTAA RILKGQLHHN PGEETRLEMD KFPFVALSKT
101 YNTNAQVPDS AGTATAYLCG VKANEGTVGV SAATERSRCN TTQNEVTSI
151 LRWAKDAGKS VGIVTTTRVN HATPSAAYAH SADRWDYSDN EMPPEALSQ
201 CKDIAYQLMH NIRDIDVIMG GGRKMYPKN KTDVEYESDE KARGTRLDGL
251 DLVDTWKSFK PRYKHSFIW NRTELLTLDP HNVLYLLGLF EPGDMQYELN
301 RNNVTDPSLS EMVVVAIQIL RKNPKGFFLL VEGGRIDHGH HEGKAKQALH
351 EAVEMDRAIG QAGSLTSSD TLTVVTADHS HVFTFGGYTP RGNSIFGLAP
401 MLSDDTKKPF TAILYNGPG YKVVGGEREN VSMVDYAHNN YQAQSAVPLR
451 HETHGGEDVA VFSKGPM AHL LHVHEQNYV PHVMAYAACI GANLGHCAPI
501 SSDDDDDDDD DD

```

Figura 17

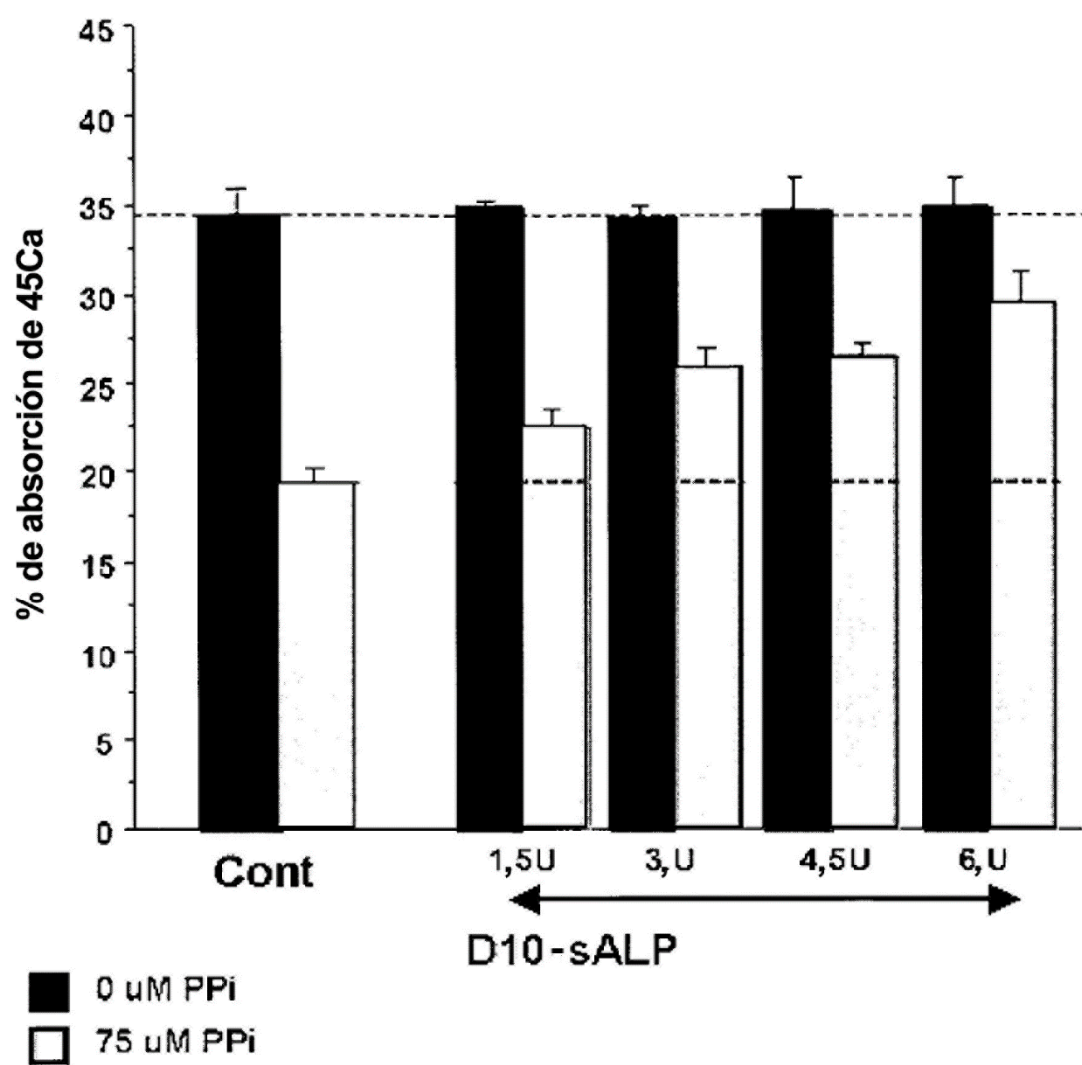


Figura 18