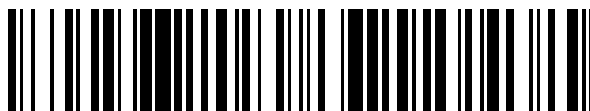


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 636**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

C07K 16/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2007** **E 07844538 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016** **EP 2076286**

54 Título: **Métodos para reducir la absorción de fosfato empleando un anticuerpo anti-Npt2B**

30 Prioridad:

25.10.2006 US 862876 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.06.2016

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(50.0%)
614 Walnut Street
Madison, WI 53705, US y
AOVATECHNOLOGIES, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**COOK, MARK;
PETKOVICH, MARTIN;
HELVIG, CHRISTIAN;
HELLESTAD, ERICA y
CRAWFORD, KEITH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 573 636 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

Métodos para reducir la absorción de fosfato empleando un anticuerpo anti-Npt2B

5 Antecedentes de la invención

El fósforo es un elemento indispensable en la nutrición humana y desempeña papeles estructurales y funcionales esenciales en la bioquímica, la integridad celular y los procesos fisiológicos del cuerpo. En alimentos que comprenden materia animal o vegetal, el fósforo puede hallarse como fosfato inorgánico (Pi) (p. ej., en su forma pentavalente en combinación con oxígeno como fosfato (PO_4^{3-})), que puede absorberse fácilmente en el tubo digestivo. Además, el fosfato puede encontrarse como un constituyente de biomacromoléculas, tales como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y azúcares. El material vegetal puede enriquecerse igualmente en ácido fítico ($\text{C}_6\text{H}_6[\text{OPO}(\text{OH})_2]_3$), que es la principal forma de almacenamiento de fosfato (fosfato fítico) en muchos tejidos vegetales (p. ej., salvado y semillas), lo que representa el 70 % a 80 % de fosfato en plantas. Los animales monogástricos generalmente no pueden absorber el ácido fítico o sales del mismo (fitato) y se eliminarán con las heces. El ácido fítico/fitato puede representar aproximadamente el 25 % de la ingesta de fosfato en la dieta diaria de un adulto.

El fosfato es un componente imprescindible de mineral óseo, ya que aproximadamente el 85 % de fosfato en el cuerpo de un adulto se encuentra en la matriz extracelular mineralizada, tal como huesos y dientes. Aproximadamente el 15 % de fosfato es intracelular (p. ej., en tejidos blandos) y aproximadamente el 0,1 % se encuentra en fluidos extracelulares (Tenenhouse *et al.*, *Vitamin D*, 2ª edición, Elsevier, 2005). El fosfato celular puede encontrarse asimismo en forma de fosfolípidos que constituyen la estructura de las membranas celulares. El fosfato es también un componente estructural esencial de ácidos nucleicos, tales como ADN y ARN así como nucleótidos, tales como adenosín trifosfato (ATP), que es una importante molécula almacenadora y de transferencia de energía y adenosín monofosfato cíclico, que es una importante molécula de señalización celular. Otras funciones fisiológicas de fosfato intracelular incluyen las siguientes: (1) fosforilación de una cantidad de enzimas proteicas, hormonas y moléculas de señalización celular para su activación; (2) mantenimiento del equilibrio ácido-base normal como un tampón fisiológico; y (3) inclusión de la molécula 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) que contiene fosfato en los glóbulos rojos. Un ser humano común contiene aproximadamente 700 a 1.000 gramos de fósforo (Lau K., *Phosphate Disorders*. Saunders; 1986:398-470), y consume y excreta aproximadamente un gramo a aproximadamente tres gramos de fósforo al día en forma de PO_4^{3-} .

Los seres humanos mantienen la homeostasis de fosfato mediante al menos tres rutas -- tubo digestivo, riñones, y huesos. El tubo digestivo participa en la homeostasis de fosfato como un órgano de absorción y excreción/resorción de fosfato. El hueso sirve como reservorio de fosfato que puede movilizarse en respuesta a diversas señales fisiológicas. La absorción gastrointestinal de fosfato dietético es muy eficiente, siendo los sitios principales de absorción el duodeno y el yeyuno (Delmez JA *et al.*, *Am J Kidney Dis*, 1992, 19:303-317). Una cantidad variable de fosfato dietético (10 % a 80 % de la cantidad ingerida) se excreta en las heces, en función de si la dieta es de origen vegetal (en gran medida fosfato inaccesible) o de origen tisular animal (digerible en gran parte). El fosfato inorgánico de los alimentos se absorbe en dos formas, una ruta transcelular activa a través de la membrana del borde en cepillo y una ruta paracelular pasiva a través de las uniones estrechas entre las células (Cross *et al.*, *Miner Electrolyte Metab* 1990, 16:115-124, y Walton J *et al.*, *Clin Sci* 1979, 56:407-412). Algunos informes basados en estudios en ratas indican que el transporte colónico de fosfato se media principalmente por la vía paracelular de difusión (Hu *et al.*, *Miner Electrolyte Metab*, 1997, 23:7-12; y Peters *et al.*, *Res Exp Med* (Berl), 1988, 188:139-149). Otros informes en base a estudios en ratas sugieren que el transporte activo transcelular es la ruta predominante en la absorción de fosfato en el intestino delgado (Eto *et al.*, *Drug Metab Pharmacokinet*, 2006, 21:217-221).

El riñón participa en la homeostasis de fosfato como un órgano de filtración, reabsorción y excreción de fosfato. El riñón es el principal órgano regulador que mantiene la homeostasis de fosfato. En los individuos adultos sanos, la excreción renal de fosfato diaria es igual a la cantidad de absorción gastrointestinal de fosfato diaria. No obstante, en estados de depleción de fosfato, los riñones reducen la excreción urinaria de fosfato a prácticamente cero (Knox F *et al.*, *Am J. Physiol.* 1977, 233:F261-F268). La reabsorción renal de fosfato se produce principalmente en el túbulo proximal. La excreción urinaria fraccional de fosfato puede variar entre 0,1 % a 20 %, representando de este modo un potente mecanismo homeostático. En la insuficiencia renal grave, tal como la producida por la enfermedad renal crónica, la hiperfosfatemia se produce a partir del aclaramiento inadecuado renal de fosfato.

Los principales factores reguladores de la homeostasis de fosfato son fosfato en suero y la hormona paratiroidea (HPT). El aumento de los niveles de fosfato en suero potencia la excreción urinaria de fosfato. HPT reduce la reabsorción tubular de fosfato y aumenta la excreción de fosfato soluble en la orina. Otros factores que afectan a la homeostasis de fosfato incluyen, entre otros, la edad, la dieta (es decir, la cantidad de fosfato ingerido y/o la forma química de fosfato ingerido), la enfermedad, los agentes farmacéuticos y la variación diaria.

La vitamina D, en especial, su forma activa 1,25-hidroxivitamina D (también denominada calcitriol), puede afectar asimismo a la homeostasis de fosfato al estimular directamente la absorción intestinal de fosfato. Además, la

vitamina D potencia la resorción ósea por medio de la movilización de calcio y fosfato en el plasma (Albaaj F & Hutchison A, *Drugs* 2003, 63:577-596).

Un ejemplo de homeostasis de fosfato anormal es hiperfosfatemia, que puede producirse por uno o más de los siguientes tres mecanismos. El primer mecanismo es la absorción excesiva de fosfato. El segundo mecanismo es la excreción reducida de fosfato. El tercer mecanismo es el desplazamiento de fosfato de los espacios intracelulares a los espacios extracelulares. La hiperfosfatemia severa puede causar parálisis, convulsiones y paro cardíaco. La hiperfosfatemia se produce en concentraciones de fosfato en suero superiores a 5 mg/dl, asociadas con un mayor riesgo de muerte (Block G *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004, 15:2208-2218). Una concentración de fosfato en suero fisiológico normal se considera generalmente como una concentración de fosfato en suero comprendida aproximadamente entre 2,4 mg/dl a aproximadamente 4,5 mg/dl (Block G & Port F, *Am. J. Kidney Dis.* 2000, 35:1226-1237).

Los pacientes con insuficiencia renal pueden desarrollar hiperfosfatemia como resultado de la excreción reducida de fosfato por el riñón. La hiperfosfatemia se produce cuando el suministro vascular a los riñones se reduce o cuando los glomérulos se dañan y cesa el filtrado de fosfato en la sangre. Como tal, la hiperfosfatemia es una consecuencia predecible de enfermedad renal y la mayoría de los pacientes que padecen enfermedad renal tienen o desarrollarán hiperfosfatemia. Ejemplos de dichas enfermedades renales incluyen, entre otros, enfermedad renal en estadio terminal, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, enfermedad renal poliquística, enfermedad renal crónica, necrosis tubular aguda (p. ej., estenosis de la arteria renal), infecciones que reducen la función renal (p. ej., septicemia o infección renal, tal como pielonefritis aguda), rechazo de trasplante renal y obstrucción del tracto urinario.

La hiperfosfatemia asociada a la enfermedad renal crónica conduce a patofisiologías graves en la homeostasis de calcio y fosfato, especialmente en caso de estar presente durante periodos prolongados de tiempo. Dichas patofisiologías incluyen, entre otros, hiperparatiroidismo, enfermedad ósea (p. ej., osteodistrofia renal) y calcificación en las articulaciones, pulmones, ojos y vasculatura. La hiperfosfatemia en pacientes que padecen enfermedad renal crónica se asocia de forma independiente con el riesgo de mortalidad y se desconoce el mecanismo exacto por el cual la hiperfosfatemia aumenta el riesgo de mortalidad. Para los individuos que exhiben insuficiencia renal, se ha asociado una elevación de fosfato en suero en el intervalo normal con la progresión de insuficiencia renal y un aumento del riesgo de acontecimientos cardiovasculares. Las Normas de Práctica Clínica de la Iniciativa para la Calidad de los Resultados de Enfermedades Renales de la Fundación Nacional del Riñón para el Metabolismo Óseo y Enfermedad en la Enfermedad Renal Crónica recomienda mantener el fosfato en suero inferior a 5,5 mg/dl, el producto de calcio-fosfato (Ca X P) inferior a 55 mg²/dl², y la hormona paratiroidea intacta (HPTi) entre 150 pg/ml y 300 pg/ml. Aunque la etiología no se demuestra por completo, el producto elevado de calcio-fosfato se ha considerado responsable de la calcificación de los tejidos blandos y enfermedad cardiovascular. La enfermedad cardiovascular es la causa de muerte en casi la mitad de los pacientes de diálisis.

Muchos pacientes con enfermedad renal necesitan tomar una forma activa de vitamina D, tal como 1 α , 25-dihidroxitamina D₃ para mantener la homeostasis de calcio y/o para tratar o prevenir la hipocalcemia y/o el hiperparatiroidismo secundario debido a que estos pacientes son deficientes en vitamina D activa. La vitamina D₃ se metaboliza primero a 25-hidroxitamina D₃ (también denominada calcidiol) en el hígado y, posteriormente a 1 α , 25-dihidroxitamina D₃ en el riñón. 1 α , 25-dihidroxitamina D₃ es mucho más activa que 25-hidroxitamina D₃. Los riñones con deterioro de la función no pueden convertir 25-hidroxitamina D₃ a 1 α , 25-dihidroxitamina D₃. El bajo nivel de 1 α , 25-dihidroxitamina D₃ estimula la glándula paratiroidea para secretar más HPT y se producen hiperplasia paratiroidea e hiperparatiroidismo secundario. El tratamiento convencional de hiperparatiroidismo secundario en individuos que padecen enfermedad renal crónica incluye vitamina D activa o sus análogos. Del mismo modo, aproximadamente el 70 % de los individuos con enfermedad renal en estadio terminal o insuficiencia reciben alguna forma de vitamina D. Como se ha discutido previamente, la vitamina D estimula la absorción intestinal de fosfato. Por lo tanto, los pacientes con enfermedad renal que toman vitamina D, tal como 1 α , 25-dihidroxitamina D₃ son más susceptibles a hiperfosfatemia y pueden presentar también su hiperfosfatemia existente exacerbada debido a una combinación del aumento de la absorción de fosfato con una disminución concomitante de la excreción de fosfato.

Los esfuerzos terapéuticos para reducir los niveles de fosfato en suero incluyen, entre otros, diálisis, reducción en la ingesta de fosfato dietético, administración de nicotinamida, y administración oral de aglutinantes insolubles de fosfato. Ejemplos de aglutinantes insolubles de fosfato incluyen, entre otros, compuestos de aluminio (p. ej., gel de hidróxido de aluminio Amphojel®), compuestos de calcio (p. ej., carbonato de calcio, acetato, tal como comprimidos de acetato de calcio PhosLo®, citrato, alginato, y sales cetoácidas), polímeros de intercambio aniónico (p. ej., polímeros funcionales de amina descritos en la patentes de Estados Unidos n.º 5.985.938, 5.980.881, 6.180.094, 6.423.754, y en la publicación PCT WO 95/05184, resinas de intercambio aniónico Dowex® en forma de cloruro, RenaGel®, y clorhidrato de guanidinio unido a polímero), compuestos inorgánicos, tales como carbonato de lantano tetrahidrato (Fosrenal™), sales férricas de citrato y acetato, y un material cerámico poroso a base de lantano (RenaZorb™).

El documento US 2002/0156266A1 desvela un cotransportador sodio-fosfato humano expresado en la superficie apical de las células epiteliales intestinales (huNpt2B) y los polipéptidos relacionados con ello, así como composiciones de ácido nucleico que codifican el mismo. Los polipéptidos del sujeto y composiciones de ácido nucleico encuentran uso en diversas aplicaciones, incluyendo investigación, diagnóstico y aplicaciones de exploración con agentes terapéuticos. También se describen métodos para inhibir la actividad de Npt2B en un huésped y métodos de tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad de Npt2B.

Fertel *et al* (*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 102(3), 1028-1033 (1981)) hacen referencia a la formación de anticuerpos frente a prostaglandinas en la yema de huevos de gallina. El presente documento describe una técnica que saca provecho del hecho que los anticuerpos producidos por gallinas inmunizadas se secretan en la yema de los huevos. Utilizando este procedimiento, los autores produjeron anticuerpos contra varias prostaglandinas y utilizaron estos anticuerpos para desarrollar procedimientos por radioinmunoensayo. Los resultados indican que el anticuerpo dirigido contra un hapteno puede obtenerse en un sistema de modelo animal relativamente barato sin emplear una técnica invasiva.

Hilfiker *et al* (*Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, vol. 95, págs. 14564-14569, noviembre de 1998) hacen referencia a la caracterización de un cotransportador de sodio-fosfato tipo II murino expresado en el intestino delgado de un mamífero. Los autores describen una isoforma de un cotransportador de Na/P_i tipo II renal de un mamífero. La homología de esta isoforma que describe cotransportadores tipo II de mamífero y no mamífero oscila entre 57 y 75 %. En base a las principales diversidades en el extremo terminal C, la nueva isoforma se concibió como un cotransportador de Na/P_i tipo IIb. El cotransportador de Na/P_i mediado por el cotransportador tipo IIb se estudió en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los resultados indican que el cotransportador de Na/P_i tipo IIb es electrogénico y difiere con respecto a la isoforma tipo II renal por la dependencia opuesta del pH. Se detectó la expresión del ARNm tipo IIb en diversos tejidos, incluyendo el intestino delgado. La proteína tipo IIb se detectó como una proteína de 108 kDa mediante membranas de Western utilizando pequeñas membranas del borde en cepillo intestinales aisladas y por medio de la inmunohistoquímica esta se localizó en la membrana luminal de los enterocitos de ratón. La expresión de la proteína tipo IIb de los bordes en cepillo de los enterocitos y las características de transporte sugieren que el cotransportador de Na/P_i tipo IIb descrito representa un candidato para el cotransportador de Na/P_i apical del intestino delgado.

Homann *et al* (*Archives of Oral Biology* (2005) 50, 759-768) investigaron la expresión y distribución intracelular de los cotransportadores de sodio-fosfato con el fin de esclarecer los mecanismos celulares y moleculares de la secreción de fosfato por las glándulas salivales humanas. Los autores aportaron una prueba molecular de la implicación de NPT2b en la secreción acinar de fosfato y la reabsorción ductal de fosfato.

Breve resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir la absorción de fosfato en un sujeto animal humano o no humano en riesgo de desarrollar o de haber desarrollado hiperfosfatemia. El método incluye la etapa de administrar por vía oral al sujeto un anticuerpo anti-cotransportador de sodio-fosfato de tipo 2B (Npt2B) intestinal (p. ej., un anticuerpo que se une a un bucle extracelular del Npt2B intestinal) en una cantidad eficaz para reducir o mantener la concentración de fosfato en suero en el sujeto. El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgY o un anticuerpo que se une a un epítipo en los aminoácidos 234-362 o aminoácidos 429-485 de la proteína Npt2B intestinal humana definida por la SEQ ID NO: 1. El método puede incluir igualmente la etapa de observar una reducción o estabilización de la concentración de fosfato en suero. Por ejemplo, las concentraciones de fosfato en suero antes y después del tratamiento con anticuerpos pueden medirse y compararse.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir los efectos secundarios de la terapia con vitamina D en un sujeto humano (p. ej., un sujeto humano que padece enfermedad renal, deficiencia en vitamina D, o ambas). El método incluye la etapa de administrar por vía oral al sujeto (a) un compuesto de vitamina D y (b) un anticuerpo anti-Npt2B intestinal, tal como un anticuerpo anti-Npt2B intestinal humano (SEQ ID NO: 1), en el que el anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para reducir la hiperfosfatemia inducida por el tratamiento con vitamina D. Por ejemplo, el nivel de fosfato en suero del sujeto puede reducirse o mantenerse. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgY. En otra realización, el anticuerpo se une a un epítipo en los aminoácidos 234-362 o aminoácidos 429-485 de la proteína Npt2B intestinal humana definida por la SEQ ID NO: 1. El método puede incluir además la etapa de observar una reducción o estabilización de la concentración de fosfato en suero. Por ejemplo, las concentraciones de fosfato en suero antes y después del tratamiento con anticuerpos pueden medirse y compararse.

Los métodos desvelados en el presente documento pueden emplearse para atenuar o prevenir la hiperfosfatemia. En algunas realizaciones, la concentración de fosfato en suero se reduce o se mantiene a un nivel o inferior a aproximadamente 150 %, 125 %, 120 %, 115 %, 110 %, o 105 % de una concentración máxima de fosfato en suero fisiológico en el intervalo normal aceptado. En algunas realizaciones, la concentración de fosfato en suero se reduce o se mantiene a un nivel en el intervalo normal. Para un sujeto humano, la concentración máxima normal-alta de fosfato en suero es 5,0 mg/dl. En una realización preferente, la concentración de fosfato en suero se reduce o se mantiene a 5,5 mg/dl o inferior o 5,0 mg/dl o inferior en un sujeto humano.

En algunas realizaciones de los métodos desvelados en este caso, el sujeto padece una enfermedad renal, recibe un compuesto de vitamina D (p. ej., 1 α , 25-dihidroxitamina D₃), o ambos. En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente humano que padece una enfermedad renal que toma un compuesto de vitamina D (p. ej., 1 α , 25-dihidroxitamina D₃) y presenta un nivel de fosfato en suero superior a 5,0 mg/dl o 5,5 mg/dl. Ejemplos de enfermedades renales incluyen enfermedad renal en estadio terminal, insuficiencia renal aguda, enfermedad renal poliquística, enfermedad renal crónica, necrosis tubular aguda, infecciones que reducen la función renal (p. ej., septicemia o infección renal, tal como pielonefritis aguda), rechazo de trasplante renal, u obstrucción del tracto urinario.

En algunas realizaciones de los métodos desvelados en este caso, el anticuerpo anti-Npt2B intestinal se administra de forma concomitante con un aglutinante de fosfato. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-Npt2B intestinal se administra con alimentos o próximo (es decir, aproximadamente una hora antes o después) al consumo de un alimento.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un esquema del antígeno peptídico de Npt2B intestinal humano. Se muestran los bucles extracelulares (ECL1-ECL4) e intracelulares (ICL1-ICL3) así como dominios transmembrana (1-8) de Npt2B intestinal humano. Los números 11-20 y 31-35 muestran dónde se encuentran los péptidos antigénicos utilizados para generar anticuerpos en los bucles extracelulares.

La Figura 2 muestra los efectos de nicotinamida (control positivo en la inhibición de la absorción de fósforo) y diversos anticuerpos del péptido anti-Npt2B intestinal en la absorción de fósforo por células Caco-2 *in vitro*. De izquierda a derecha los tratamientos son: 2A, control (anticuerpo de gallinas inyectadas con adyuvante), nicotinamida, y anticuerpos anti-péptido (PEG purificado a partir de yema de huevo) 16, 17, 18, y 19; 2B, control, nicotinamida, y anticuerpos anti-péptido (PEG purificado a partir de yema de huevo) 12, 13, 14, y 15.

Descripción detallada de la invención

En este caso se desvela que determinados anticuerpos anti-Npt2B intestinal pueden administrarse por vía oral a un sujeto animal humano o no humano para reducir la absorción de fosfato en el sujeto. Npt2B se asocia con la membrana del borde en cepillo intestinal (Hilfiker H *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 1998, 95:14564-14569). La técnica anterior sugiere que un anticuerpo anti-Npt2B intestinal no será eficaz en el bloqueo de la actividad Npt2B *in vivo* debido a que la membrana del borde en cepillo intestinal se recubre con una capa mucosa permeable solo en solutos de bajo peso molecular pero no en grandes macromoléculas (p. ej., anticuerpos/proteínas) con el fin de proteger la superficie mucosa de la degradación de las enzimas proteolíticas en el lumen intestinal (Atuma *et al.*, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, 280:922; y M. Mantle y A. Allen, 1989, *Gastrointestinal mucus*, págs. 202-229 en *Gastrointestinal Secretions*, J. S. Davison, ed., Butterworth y Co., Gran Bretaña). Además, se desconoce si un anticuerpo particular administrado por vía oral puede sobrevivir al ambiente ácido del estómago y permanecer activo. A pesar de la evidencia de la técnica anterior, por el contrario, los inventores han demostrado, al emplear anticuerpos contra Npt2B intestinal así como otra proteína fosfatasa alcalina intestinal asociada a la membrana del borde en cepillo intestinal (Nakano *et al.*, *Arch Histol Cytol* 2001, 64:483-491), que los anticuerpos administrados por vía oral pueden alcanzar y bloquear la actividad de una proteína asociada a la membrana del borde en cepillo intestinal (ejemplos a continuación). En los siguientes ejemplos, los inventores han demostrado que los anticuerpos anti-Npt2B intestinal administrados por vía oral pueden disminuir los niveles de fosfato en plasma, reducir la ganancia de peso corporal, reducir la ceniza ósea, y aumentar las excretas de fosfato.

A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos empleados en el presente documento poseen el mismo significado que el que habitualmente entiende un experto en la materia a la cual pertenece la invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención puede utilizarse cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se describen ahora los métodos y materiales preferentes.

Al describir las realizaciones y reivindicar la invención, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones expuestas a continuación.

Como se utiliza en el presente documento, "anticuerpo" incluye una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno particular, e incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. El término incluye asimismo formas desarrolladas por ingeniería genética, tales como anticuerpos quiméricos (p. ej., anticuerpos humanizados murinos) y anticuerpos heteroconjugados (p. ej., anticuerpos biespecíficos). El término incluye igualmente moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Las moléculas bivalentes y biespecíficas se describen p. ej., en Kostelny *et al.*, *J Immunol* 1992, 148:1547; Pack y Pluckthun, *Biochemistry* 1992, 31:1579; Zhu *et al.*, *Protein Sci* 1997, 6:781; Hu *et al.*, *Cancer Res.* 1996, 56:3055; Adams *et al.*, *Cancer Res.* 1993, 53:4026; y McCartney *et al.*, *Protein Eng.* 1995, 8:301. El término "anticuerpo" también incluye formas de unión a antígeno de anticuerpos, tales como fragmentos con capacidad de unión al antígeno (p. ej., Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y rIgG). El término también se refiere a fragmentos Fv de cadena sencilla recombinantes (Fvcs). Además, el término "anticuerpo" abarca un anticuerpo con un grupo estabilizante covalentemente unido al mismo

para que el anticuerpo sea más estable. Los anticuerpos con una afinidad K_d 10^{-4} M o menos pueden emplearse en la presente invención. Preferentemente, se emplean anticuerpos con una afinidad K_d de $\leq 10^{-5}$ M o $\leq 10^{-6}$ M. Más preferentemente, se emplean anticuerpos con una afinidad K_d de $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, o $\leq 10^{-9}$ M.

5 Como se utiliza en el presente documento, el término "hiperfosfatemia" se emplea ampliamente para describir una condición de un sujeto, en la que el fosfato en suero está presente en una concentración superior al intervalo normal médicamente aceptable.

10 Como se utiliza en el presente documento, el término "atenuar" o "prevenir" significa lograr un beneficio terapéutico o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico, se entiende la mejora o erradicación de la enfermedad subyacente que se está tratando. Por ejemplo, en un sujeto que padece hiperfosfatemia, el beneficio terapéutico incluye la mejora o erradicación de la hiperfosfatemia subyacente. Además, un beneficio terapéutico incluye la mejora o erradicación de uno o más de los síntomas patofisiológicos asociados con el trastorno subyacente, de forma tal que se observa una mejora en el sujeto, a pesar de que el sujeto aún pueda estar afectado por el trastorno subyacente. Por ejemplo, en un paciente que padece insuficiencia renal y/o hiperfosfatemia, un beneficio terapéutico se refiere no solo a una disminución del nivel de fosfato en suero del paciente sino también a una mejora en el paciente con respecto a otros trastornos que acompañan insuficiencia renal y/o hiperfosfatemia, tal como calcificación ectópica y osteodistrofia renal. Para beneficio profiláctico, un anticuerpo según la presente invención se administra a un paciente en riesgo de desarrollar hiperfosfatemia o a un paciente que presenta uno o más de los síntomas patofisiológicos de hiperfosfatemia aunque no se haya realizado un diagnóstico de hiperfosfatemia. Por ejemplo, un anticuerpo según la presente invención puede administrarse a un paciente con enfermedad renal crónica, en el que no se ha diagnosticado hiperfosfatemia. El beneficio profiláctico incluye la prevención o el retraso de hiperfosfatemia.

25 Como se utiliza en el presente documento, una cantidad eficaz de un anticuerpo es una cantidad que reduce el fosfato en suero de un sujeto que padece hiperfosfatemia, evita que el fosfato en suero aumente en un sujeto con o en riesgo de desarrollar hiperfosfatemia, o reduce la absorción de fosfato de los alimentos que pueden medirse, por ejemplo, aumentando el fosfato fecal o reduciendo o estabilizando el nivel de fosfato en suero.

30 Como se utiliza en el presente documento, "enfermedad renal" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que afecta a la función de los riñones, incluyendo aquellas enfermedades del riñón que provocan filtración pobre de fosfato e incluye enfermedades que afectan al flujo sanguíneo al riñón, así como anomalías funcionales y estructurales en los riñones. Ejemplos de enfermedad renal incluyen, entre otros, enfermedad renal en estadio terminal, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, enfermedad renal poliquística, enfermedad renal crónica (p. ej., enfermedad renal crónica en estadio I, II, III, IV, o V clasificada por las Normas de Práctica Clínica de la Iniciativa para la Calidad de los Resultados de Enfermedades Renales de la Fundación Nacional del Riñón, que se manifiesta como insuficiencia renal y en estadios tardíos de insuficiencia renal), necrosis tubular aguda (p. ej., estenosis de la arteria renal), infecciones que reducen la función renal (p. ej., septicemia o infección renal, como pielonefritis aguda), rechazo de trasplante renal, y obstrucción del tracto urinario.

40 Como se utiliza en el presente documento, el término "vitamina D" se refiere ampliamente a los compuestos orgánicos denominados vitamina D₂, vitamina D₃, vitamina D₄, etc., y a sus metabolitos y formas hormonales que influyen en la homeostasis de calcio y fosfato. Ejemplos de compuestos de vitamina D incluyen, entre otros, vitamina D₂ (ergocalciferol), 25-hidroxivitamina D₂, 1 α , 25-dihidroxivitamina D₂, vitamina D₃ (colecalciferol), 25-hidroxivitamina D₃, 1 α , 25-dihidroxivitamina D₃, un análogo de cualquiera de los anteriores o que pueden ocupar sustancialmente el receptor intracelular de la vitamina D, y los descritos en Bouillon *et al.*, *Endocrine Reviews* 1995, 16:200-257. Los compuestos de vitamina D también incluyen aquellos que se encuentran actualmente disponibles comercialmente o en ensayos clínicos, incluyendo, entre otros, 19-nor-1 α ,25 dihidroxivitamina D₂ (paricalcitol), 1 α -hidroxivitamina D₂ (doxercalciferol), 1 α -hidroxivitamina D₃ (alfacalcidol), fármacos en investigación de Leo Pharmaceutical que incluyen EB 1089 (seocalcitol), KH 1060 (20-epi-22-oxa-24a,26a,27a-trihomo-1 α ,25-dihidroxi-D₃), MC 1288 y MC 903 (calcipotriol), fármacos de Roche Pharmaceutical que incluyen 1,25-dihidroxi-16-eno-D₃, 1,25-dihidroxi-16-eno-23-ino-D₃, y 25-dihidroxi-16-eno-23-ino-D₃, Chugai Pharmaceuticals 22-oxacalcitriol (22-oxa-1 α ,25-dihidroxi-D₃), 1 α hidroxi D₅ de la Universidad de Illinois, fármacos del Instituto de Química Médica-Schering AG que incluyen ZK 161422 y ZK 157202.

55 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir la absorción de fosfato en un sujeto animal humano o no humano en riesgo de desarrollar o haber desarrollado hiperfosfatemia. El método incluye la etapa de administrar por vía oral al sujeto un anticuerpo anti-cotransportador de sodio-fosfato de tipo 2B (Npt2B) intestinal (p. ej., un anticuerpo que se une a un bucle extracelular de Npt2B intestinal) en una cantidad eficaz para reducir o mantener la concentración de fosfato en suero en el sujeto. El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgY o un anticuerpo que se une a un epítipo en los aminoácidos 234-362 o aminoácidos 429-485 de la proteína Npt2B intestinal humana definida por la SEQ ID NO: 1. El método puede incluir además la etapa de observar una reducción o estabilización de la concentración de fosfato en suero. Por ejemplo, las concentraciones de fosfato en suero antes y después del tratamiento con anticuerpos pueden medirse y compararse.

65

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir los efectos secundarios de la terapia con vitamina D en un sujeto humano (p. ej., un sujeto humano que padece enfermedad renal, deficiencia en vitamina D, o ambas). El método incluye la etapa de administrar por vía oral al sujeto (a) un compuesto de vitamina D y (b) un anticuerpo anti-Npt2B intestinal, tal como un anticuerpo anti-Npt2B intestinal humano (SEQ ID NO: 1), en el que el anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para reducir la hiperfosfatemia inducida por la terapia con vitamina D. Por ejemplo, el nivel de fosfato en suero del sujeto puede reducirse o mantenerse. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgY. En otra realización, el anticuerpo se une a un epítipo en los aminoácidos 234-362 o aminoácidos 429-485 de la proteína Npt2B intestinal humana definida por la SEQ ID NO: 1. El método puede incluir además la etapa de observar una reducción o estabilización de la concentración de fosfato en suero. Por ejemplo, las concentraciones de fosfato en suero antes y después del tratamiento con anticuerpos pueden medirse y compararse.

Los métodos desvelados en este caso pueden emplearse para atenuar o prevenir la hiperfosfatemia. En algunas realizaciones, la concentración de fosfato en suero se reduce o se mantiene a un nivel o inferior a aproximadamente 150 %, 125 %, 120 %, 115 %, 110 %, o 105 % de una concentración máxima de fosfato en suero fisiológico en el intervalo normal aceptado. En algunas realizaciones, la concentración de fosfato en suero se reduce o se mantiene a un nivel en el intervalo normal. Para un sujeto humano, la concentración máxima normal-alta de fosfato en suero es 5,0 mg/dl. En una realización preferente, la concentración de fosfato en suero se reduce o se mantiene a 5,5 mg/dl o inferior o 5,0 mg/dl o inferior en un sujeto humano.

Los pacientes en riesgo de desarrollar o que han desarrollado hiperfosfatemia incluyen, entre otros, pacientes con: intoxicación por vitamina D a partir de la ingesta excesiva de compuestos de vitamina D; ingesta excesiva de fosfato, como el uso excesivo de laxantes o enemas que contienen fosfato; enfermedad renal o insuficiencia, tal como insuficiencia renal, ya sea aguda o crónica, descrita en el presente documento; hipoparatiroidismo primario; estados de resistencia a la HPT, tales como síndromes de resistencia tubular a HPT, incluyendo los diversos tipos de pseudohipoparatiroidismo (1a, 1b, 1c, y 2) o hipomagnesemia severa, que afecta a la secreción de HPT y causa resistencia HPT periférica; y/o condiciones en las que el fosfato intracelular se desplaza al espacio extracelular, tales como rabdomiolisis, lisis tumoral, deficiencia en insulina o acidosis aguda.

En algunas realizaciones, se aplican los métodos de la presente invención para reducir la absorción de fosfato en un sujeto humano o no humano que padece enfermedad renal, recibe un compuesto de vitamina D (por ejemplo, 1α , 25-dihidroxitamina D_3), o ambos.

Se conocen las secuencias de aminoácidos de Npt2B intestinal de diversas especies. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de Npt2B intestinal humano (SEQ ID NO: 1), Npt2B intestinal de ratón (SEQ ID NO: 2), Npt2B intestinal de rata (SEQ ID NO: 3), y Npt2B intestinal de pollo (SEQ ID NO: 4) pueden encontrarse en los números de acceso CNIB GenBank 095436, Q9DBP0, Q91109, y AAQ90408, respectivamente. Las proteínas Npt2B intestinal muestran cuatro bucles extracelulares conservados. Por ejemplo, la similitud de secuencia en todos los bucles entre las cuatro especies proporcionadas es alta (bucle 1: > 76 %, bucle 2: > 64 %, bucle 3: > 82,5 % y bucle 4: > 87,5 %) presentando las tres secuencias de mamíferos con un mayor porcentaje de identidad de secuencia que la secuencia de pollo. Para el Npt2B intestinal humano (SEQ ID NO: 1), los bucles extracelulares 1-4 son los aminoácidos 122-135, 234-362, 429-485, y 547-552, respectivamente. Para el Npt2B intestinal de ratón (SEQ ID NO: 2), los bucles extracelulares 1-4 son 125-138, 188-361, 440-461, y 549-554, respectivamente. Para el Npt2B intestinal de rata (SEQ ID NO: 3), los bucles extracelulares 1-4 son 112-136, 235-363, 430-486, y 548-551, respectivamente. Para el Npt2B intestinal de pollo (SEQ ID NO: 4), los bucles extracelulares 1-4 son 109-133, 185-358, 427-482, y 544-551, respectivamente.

Preferentemente, un anticuerpo que se une a un epítipo en el bucle extracelular 2 o 3 de una proteína Npt2B intestinal se utiliza para practicar los métodos de la presente invención. Por ejemplo, se utiliza un anticuerpo que se une a un epítipo en los aminoácidos 234-362 de la SEQ ID NO: 1 (es decir, bucle 2) o aminoácidos 429-485 de la SEQ ID NO: 1 (es decir, bucle 3). A este respecto, el anticuerpo puede unirse al menos a 4, 5, 6, 7, u 8 aminoácidos consecutivos en los aminoácidos 234-362 o 429-485 de la SEQ ID NO: 1 y, opcionalmente, posee una afinidad K_d de aproximadamente 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M o inferior. En algunas realizaciones, los anticuerpos que se unen a un epítipo en los aminoácidos 245-340 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 252-330 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 445-480 de la SEQ ID NO: 1, o aminoácidos 455-474 de SEQ ID NO: 1 se utilizan para practicar la presente invención. En algunas realizaciones, se utilizan anticuerpos contra un epítipo en los siguientes fragmentos del bucle 2 o 3 de Npt2B intestinal para practicar la presente invención: aminoácidos peptídicos 252-259, 278-285, 297-304, 323-330, 455-462, y 467-474 del Npt2B intestinal humano (SEQ ID NO: 1); fragmentos del Npt2B intestinal de ratón (SEQ ID NO: 2) que corresponden a los fragmentos Npt2B intestinal humano previos; fragmentos de Npt2B intestinal de rata (SEQ ID NO: 3) que corresponden a los fragmentos Npt2B intestinal humano previos; o fragmentos de Npt2B intestinal de pollo (SEQ ID NO: 4) que corresponden a los fragmentos Npt2B intestinal humano previos. En una realización, se utilizan anticuerpos contra un epítipo en los aminoácidos 323-330 o 455-462 de la proteína Npt2B intestinal humana (SEQ ID NO: 1) o un fragmento correspondiente de la proteína Npt2B intestinal de ratón, rata, o pollo para practicar la presente invención.

Los fragmentos correspondientes pueden identificarse fácilmente por un experto en la materia mediante cualquier programa de alineamiento familiar. Por ejemplo, Gapped BLAST puede utilizarse como se describe en Altschul *et al.* (*Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402, 1997). Gapped BLAST se encuentra disponible en la página web del CNIB. Cuando se utiliza el programa Gapped BLAST, pueden emplearse los parámetros por defecto del programa.

Ello se encuentra adecuadamente dentro de la capacidad de un experto en la técnica para fabricar un anticuerpo anti-Npt2B intestinal, tal como un anticuerpo IgY o anticuerpo que se une a un epítipo en un bucle extracelular de Npt2B. En algunas realizaciones, el anticuerpo empleado en el método se obtiene a partir de un huevo (p. ej., yema de huevo), en particular de un huevo aviar, tal como un huevo de gallina. El método de Polson, A., M. B. von Wechmar y M. H. van Regenmortel, "*Isolation of Viral IgY Antibodies from Yolks of Immunized Hens*," *Immunological Communications* 9:475-493 (1980), puede utilizarse para producir una preparación de anticuerpos de yema de huevo. Las gallinas ponedoras pueden inocularse con una proteína Npt2B intestinal o un fragmento inmunogénico de la misma de un bucle extracelular. Preferentemente, un adyuvante apto se administra junto con la inoculación para potenciar la inmunización. Un adyuvante útil para este fin es un adyuvante en emulsión de agua en aceite, tal como el adyuvante completo de Freund. La proteína Npt2B intestinal o un fragmento inmunogénico de la misma a partir de un bucle extracelular provoca que las gallinas produzcan anticuerpos anti-Npt2B intestinal que se transfieren de manera pasiva a la yema de huevo de los huevos puestos por las gallinas. Las yemas de huevo o los huevos enteros que contienen el anticuerpo pueden recogerse y homogeneizarse para formar una emulsión. La emulsión resultante puede secarse para formar un producto en polvo que contiene el anticuerpo. Este producto en polvo puede formularse a continuación de forma apropiada para la administración oral y luego se administra por vía oral a un sujeto animal humano o no humano. La preparación puede administrarse por vía oral como un complemento nutricional o alimenticio.

Se contemplan anticuerpos de cualquier clase o subclase de isotipo (p. ej., IgY, IgG, IgM, IgD, IgA, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) así como fragmentos de los mismos (cuando se producen por digestión enzimática o química de dichos anticuerpos) y la preparación de dichos anticuerpos por medios sintéticos o por expresión de secuencias génicas codificantes de dichos anticuerpos o fragmentos de los mismos, en una realización de IgY, los anticuerpos de las yemas de huevo de un animal aviar (p. ej., pollos, faisanes, patos, pavos, gansos y similares) se utilizan para practicar la presente invención (véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos n.º 5.080.895, 5.989.584 y 6.213.930). Los kits de purificación de anticuerpos de huevo comercialmente disponibles, tales como EGGstract® IgY Purification Systems (Promega; Madison, WI) o Eggcellent® Chicken IgY Purification (Pierce Biotechnology, Inc.; Rockford, IL), pueden utilizarse para purificar los anticuerpos. Los anticuerpos pueden purificarse asimismo en base a su afinidad con péptidos o fragmentos proteicos utilizando medios convencionales para la purificación por afinidad. Alternativamente, los huevos, las yemas de huevo o la yema de huevo seca en polvo que contienen los anticuerpos pueden mezclarse directamente con un alimento para el consumo oral o introducirse fácilmente en una pastilla, comprimido, o cápsula. Los genes codificantes de dichos anticuerpos también pueden identificarse empleando dichos anticuerpos por medio de técnicas de clonación molecular o de expresión en fagos bien establecidas que dan lugar a formas monoclonales completas o parciales de dichos anticuerpos que podrían utilizarse solos o en combinación.

Las composiciones que contienen anticuerpos anti-Npt2B intestinal según la presente invención pueden dosificarse, p. ej., una vez, dos veces o tres veces al día. La dosificación puede opcionalmente subdividirse de modo en la que una parte de la dosis prescrita se ingiere antes del consumo de alimentos o bebidas, otra parte se ingiere junto con alimentos o bebidas, y otras partes se ingieren en el momento próximo posterior a la ingesta de alimentos o bebidas. Los principios activos pueden administrarse por vía oral en forma de partículas o polvo espolvoreados o distribuidos en, o dentro de, alimentos; o disueltos o suspendidos en bebidas; o proporcionados en formas de dosificación sólida farmacéuticas, tales como comprimidos, cápsulas, y polvos, o en formas de dosificación líquida, tales como elixires, jarabes, y suspensiones. En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra con alimentos o próximo (es decir, aproximadamente una hora antes o después) al consumo de un alimento que contiene fosfato dietético. En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra de forma concomitante con un aglutinante de fosfato.

Composiciones farmacéuticas a modo de ejemplo según la presente invención comprenden IgY y opcionalmente componentes de huevo, o IgY y opcionalmente componentes de yema de huevo, opcionalmente con estabilizadores adicionales o transportadores farmacéuticamente aceptables. Los huevos enteros, o yemas de huevo, o yemas de huevo de las cuales los lípidos se eliminan parcialmente o en gran parte pueden emulsionarse, mezclarse opcionalmente con un compuesto de encapsulación o lioprotector, y someterse a secado por pulverización o liofilización para formar un producto en polvo.

Los anticuerpos de yema pueden purificarse parcialmente, p. ej., para eliminar grandes cantidades de lípidos. Véase Camenisch C *et al.*, *FASEB J.* 1999, 13:81-88; Akita E & Nakai S, *J. Immunol. Methods* 1993, 160:207-214; así como la publicación de la patente de Estados Unidos n.º 2004/0087522.

Las cápsulas o comprimidos pueden contener una formulación de liberación prolongada que puede proporcionarse en una dispersión de compuesto activo en hidroxipropilmetilcelulosa o material conocido relacionado para alterar la cinética de liberación del agente activo. Las formas de dosificación sólida pueden fabricarse como productos de liberación sostenida que proporcionan una liberación continua del medicamento durante un periodo de horas

empleando técnicas farmacéuticas conocidas. Los comprimidos obtenidos por compresión pueden edulcorarse o recubrirse con una película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger el comprimido de la atmósfera, o recubrirse de forma entérica para la desintegración selectiva en el tubo digestivo. Tanto las formas de dosificación oral sólida y líquida pueden contener colorantes y saborizantes que aumentan la aceptación del paciente.

Los estabilizadores son agentes protectores que mantienen la actividad de unión del anticuerpo en condiciones desnaturalizantes, tales como calor o ácido. El estabilizador no inhibe la interacción de los anticuerpos con el antígeno diana, de modo que el efecto biológico deseado también se mantiene. Estabilizadores a modo de ejemplo incluyen clara de huevo, albúmina o compuestos sacáridos. Preferentemente, el compuesto sacárido está presente en aproximadamente 5 % a 30 % del huevo líquido entero (en peso), y más preferentemente en la cantidad de 10 % a 20 % del huevo líquido entero (en peso). El anticuerpo se mezcla con un compuesto sacárido en una suspensión líquida y la suspensión se seca después para producir un sólido que contiene la proteína y el sacárido. Los compuestos sacáridos útiles como estabilizadores incluyen monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, monosacáridos alquilados, disacáridos alquilados, polisacáridos alquilados, alcoholes monosacáridos y alcoholes monosacáridos alquilados. Preferentemente, dichos compuestos sacáridos se componen o se basan en unidades monosacáridas de 5 o 6 átomos de carbono. Los monosacáridos son residuos de un único azúcar con la fórmula $(CH_2O)_n$, en la que n es 3 o más. Ejemplos de monosacáridos incluyen, entre otros, glucosa, ribosa, fructosa, galactosa, talosa, arabinosa, fucosa, manosa, xilosa y eritrosa. Los monosacáridos en todas las formas isómeras, tales como α -isómeros, β -isómeros, isómeros D e isómeros L poseen actividad. Los disacáridos son moléculas con dos residuos monosacáridos unidos por un enlace glicosídico. Ejemplos de disacáridos que pueden emplearse en la presente invención incluyen, entre otros, trehalosa, maltosa, sacarosa, lactosa, maltosa y lactulosa. Los polisacáridos son moléculas con tres o más monosacáridos unidos entre sí en cadenas no ramificadas o cadenas ramificadas lineales. El almidón, el glicógeno y la celulosa son ejemplos de polisacáridos con cientos o incluso miles de residuos monosacáridos. El almidón puede contener cadenas no ramificadas lineales (amilosa) o cadenas altamente ramificadas (amilopectina). El glicógeno contiene cadenas ramificadas y la celulosa contiene cadenas no ramificadas lineales. Los monosacáridos alquilados, disacáridos alquilados y polisacáridos alquilados son monosacáridos, disacáridos y polisacáridos con al menos uno de los grupos hidrógeno sustituidos con un grupo alquilo. Los alcoholes monosacáridos son polioles acíclicos que contienen tres o más grupos hidroxilo. Estos pueden formarse al convertir los grupos cetona o aldehído de los monosacáridos a grupos hidroxilo. Ejemplos de alcoholes monosacáridos incluyen, entre otros, glicerina, manitol, sorbitol, xilitol, lactitol, isomalt, maltitol, e hidrolizados de almidón hidrogenado. Los alcoholes monosacáridos alquilados son alcoholes monosacáridos con al menos uno de los grupos hidrógeno sustituido con un grupo alquilo.

Los anticuerpos también pueden unirse a un sustrato de matriz (polimérica o no polimérica) para fines de potenciar la eficacia o estabilidad de los anticuerpos y a continuación se administran.

La invención se comprenderá mejor tras la consideración de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Inhibición del transporte de fosfato por anticuerpos anti-Npt2B intestinal

Materiales y métodos

Animales: Se utilizaron gallinas ponedoras Single Comb White Leghorn para la producción de anticuerpos (3 gallinas por antígeno peptídico). Cada antígeno peptídico Npt2B intestinal humano (véase la Tabla 1 a continuación para la secuencia y la Fig. 1 para la localización de la proteína cotransportadora) se preparó conjugando un péptido a la globulina gamma bovina utilizando el procedimiento de glutaraldehído convencional.

Tabla 1. La secuencia aminoácida de péptidos se empleó para producir anticuerpos de huevo. Las secuencias de aminoácidos se basan en regiones conservadas previstas de Npt2B intestinal entre especies animales. Las regiones de interés incluyen una superficie hidrófila en los bucles extracelulares 1-3.

Péptido arbitrario n.º (SEQ ID NO)	secuencia de aminoácidos (posiciones de aminoácidos en la SEQ ID NO:1)	ubicación de la enzima
11 (SEQ ID NO:5)	LVGGKMAG (124-131)	ECL-1 ¹
12 (SEQ ID NO:6)	FHFKNGED (252-259)	ECL-2 PRÓXIMO A D-3
13 (SEQ ID NO:7)	LKVITKPF (264-271)	ECL-2 PRÓXIMO A D-3
14 (SEQ ID NO:8)	LDKKVISQ (278-285)	ECL-2 SUPERIOR A D-3,4
15 (SEQ ID NO:9)	SLVKIWCK (297-304)	ECL-2 SUPERIOR A D-3,4
16 (SEQ ID NO:10)	TSPSLCWT (323-330)	ECL-2 PRÓXIMO A D-4
17 (SEQ ID NO:11)	YPLTLGSN (455-462)	ECL-3 PRÓXIMO A D-6
18 (SEQ ID NO:12)	TTAILAAL (467-474)	ECL-3 PRÓXIMO A D-6
19 (SEQ ID NO:13)	VQSSSVFT (430-437)	ECL-3 PRÓXIMO A D-5

Péptido arbitrario n.º (SEQ ID NO)	secuencia de aminoácidos (posiciones de aminoácidos en la SEQ ID NO:1)	ubicación de la enzima
20 (SEQ ID NO:14)	LIGIGVIT (443-450)	ECL-3 PRÓXIMO A D-5
31 (SEQ ID NO:15)	EVATHYLE (235-242)	ECL-2 PRÓXIMO A D-3
32 (SEQ ID NO:16)	GIQNWTKM (332-339)	ECL-2 PRÓXIMO A D-4
33 (SEQ ID NO:17)	FVNFHLPD (354-361)	ECL-2 PRÓXIMO A D-4
34 (SEQ ID NO:18)	SPGNALRS (476-483)	ECL-2 PRÓXIMO A D-4
35 (SEQ ID NO:19)	ENIAKQCH (345-352)	ECL-3 PRÓXIMO A D-6

¹ECL = bucle extracelular. Existen 8 dominios transmembrana (D) en Npt2B intestinal y 4 bucles extracelulares (ECL). Próximo a D es el más próximo al dominio. T = superior que significa espaciado a intervalos iguales entre los dominios expuestos. Véase la Fig. 1.

Preparación de la conjugación: Si bien el procedimiento para la conjugación de péptidos a proteínas transportadoras puede variar considerablemente (puede obtenerse un número de kits de conjugación de Pierce Scientific), así como la naturaleza de las proteínas transportadoras, el método utilizado en los estudios descritos en este ejemplo implicaba el uso del procedimiento de glutaraldehído para la conjugación del péptido deseado a la proteína transportadora de globulina gamma bovina (GgB). GgB (4 mg) se mezcló en 0,8 ml de tampón de acetato de sodio 0,1 M (pH = 7) con 4 mg del péptido deseado. Se añadieron 0,52 ml de glutaraldehído 0,02 M (en tampón de acetato de sodio 0,1 M) gota a gota (para evitar la formación de espuma) a la mezcla de proteína transportadora peptídica. La mezcla se agitó durante 2 horas. A continuación se añadieron 20 mg de glicina para detener la reacción. La mezcla se dejó reposar durante 1 hora y luego se dializó contra la solución salina tamponada fosfato (pH = 7) durante la noche (PM = 6.000-8.000). El conjugado dializado se congeló a -80 °C hasta su uso.

Preparado vacunal y uso: Para preparar una vacuna para cada gallina se diluyeron 0,5 mg de conjugado a una concentración final de 0,5 ml de STF y se mezcló con 0,5 ml de adyuvante completo de Freund (primera inyección) o adyuvante incompleto (vacuna de refuerzo) para formar una emulsión de agua en aceite capaz de resistir una microesfera cuando se aplicaron gotas en agua con hielo. A continuación, se le inyectó a la gallina en cuatro sitios (en cada muslo y en cada pechuga) con 0,25 ml de vacuna de emulsión por vía intramuscular. La inyección de refuerzo con adyuvante incompleto se realizó 7 días más tarde. Cada péptido mostrado en la Tabla 1 se conjugó por separado a GgB y se inyectó en 3 gallinas ponedoras.

Preparación de la muestra del anticuerpo: Los picos de los anticuerpos se alcanzaron a los 21 días, por lo tanto, los huevos se recogieron desde el día 21 al día 110. En aproximadamente 30 días, las yemas de huevo de cada gallina se separaron de los huevos enteros, se mezclaron y se liofilizaron. Se recogió una muestra de huevos de cada gallina, las yemas se separaron e IgY era polietileno purificado utilizando procedimientos descritos en Polson *et al.*, *Immunol. Commun.* 1980, 9:475-493). Los anticuerpos preparados utilizando este método se congelaron (-20 °C) y sirvieron como reactivos para cultivo celular y ensayo enzimático *in vitro*.

Células: Las células Caco-2 se obtuvieron de CACT (n.º HTB-37, CACT). La línea celular Caco-2 es una línea celular de adenocarcinoma colorrectal y se utilizó para mostrar los enterocitos intestinales en este estudio.

Ensayo de absorción de fosfato: El medio procedente de una monocapa subconfluente de células Caco-2 se eliminó y las células se lavaron con un tampón A (137 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl, 2,8 mM de CaCl₂, 1,2 mM de MgSO₄, 14 mM de Tris-HCl, pH 7,4 = tampón de sodio) o con un tampón B (137 mM de cloruro de colina, 5,4 mM de KCl, 2,8 mM de CaCl₂, 1,2 mM de MgSO₄, 14 mM de Tris-HCl, pH 7,4 = tampón libre de sodio). Un ml de tampón A o B que contiene el anticuerpo a 0,1 mg/ml se añadió a las células y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Después de una hora de incubación, el tampón A o tampón B se aspiró y se añadieron 100 µl de tampón A o tampón B que contiene K₂H³²PO₄ (1 µCi/ml). Las células se incubaron durante otros 20 min a 37 °C. Durante el periodo de incubación, la placa se agitó de forma continua a 100 rpm/minuto. La absorción de fosfato finalizó por la eliminación de los tampones de absorción y lavando las células con una solución quelante helada (14 mM de Tris-HCl, pH 7,4 y 137 mM de cloruro de colina). Se lisaron las células y se recogieron utilizando una solución al 1 % de Triton X-100. Las alícuotas se añadieron al líquido de centelleo y la radiactividad se determinó mediante recuento por centelleo líquido. La diferencia de radiactividad recuperada entre los ensayos, utilizando los dos tampones (tampón A y tampón B), representa el transporte de sodio dependiente de fosfato.

Resultados

Como se muestra en la Fig. 2 con células Caco-2, los anticuerpos contra los péptidos 12, 14, 15, 16, 17, y 18 inhibieron el transporte de fosfato. La eficacia relativa de inhibición era 16>17>18>12>15=14. Los anticuerpos contra el péptido 16 y péptido 17 eran más eficaces que la nicotinamida (control positivo para inhibir la absorción de fósforo) en la inhibición de transporte de fosfato.

Ejemplo 2

Efecto de anticuerpos anti-Npt2B intestinal en la ganancia de peso corporal, concentración de fosfato en plasma, y excreta de fosfato.

Materiales y métodos

La producción de anticuerpos anti-Npt2B intestinal humano utilizando diversos péptidos Npt2B se ha descrito en el Ejemplo 1 previo. En lugar de anticuerpos IgY purificados, se empleó directamente yema seca en polvo que contiene los anticuerpos del estudio de alimentación expuesto en este ejemplo.

Se asignaron pollos macho Single Comb White Leghorn de un día de vida (2 cercados de cinco pollos) a una dieta control o una dieta de anticuerpos (1 g/kg dieta de anticuerpo de yema de huevo liofilizada) a uno de los 14 péptidos de Npt2B (péptidos 11-20 y 31-34 de la Tabla 1). La dieta control es una dieta adecuada de nutrientes convencionales basada en harina de maíz-soja y contenía 1 g/kg dieta de adyuvante inyectado en la yema de huevo seca en polvo del control. La dieta de anticuerpo es la misma que la dieta control salvo que el producto en polvo del anticuerpo específico para péptido sustituyó al polvo de control. Los pollos se alimentaron con las dietas durante 21 días. A continuación, se determinaron los pesos corporales, se recogieron muestras de sangre para determinar el nivel total de fósforo en plasma empleando un analizador Roche/Hitachi (basado en la reacción de fosfato con molibdato de amonio para formar fosfomolibdato de amonio sin reducción), y la muestra de excretas de los últimos 3 días de dietas se recogieron para cada cercado y se analizaron para el fósforo total (peso seco).

Resultados

Como se muestra en la Tabla 2, los anti-péptidos 11, 13, 15-17, 20, 31, y 32 suprimieron la ganancia de peso corporal; los anti-péptidos 20, 32, y 34 redujeron los niveles de fosfato en plasma; y los anti-péptidos 11, 12, 14, 17-20, y 32 aumentaron las excretas de fósforo.

Tabla 2. El efecto de alimentación con un anticuerpo de huevo (1 g/kg dieta) para seleccionar péptidos de Npt2B intestinal en la ganancia de peso corporal, concentración de fósforo en plasma, y excretas de fósforo.¹

tratamiento	Ganancia de peso corporal (g) ²	Fosfato en sangre (mg/dl) ³	Excreta de fosfato (%) ⁴	Promedio de excreta de fosfato ⁴
control	183 ± 8,4	6,6 ± 0,5	1,24, 1,26	1,25
anti-péptido 11	164 ± 6,1 ⁶	6,6 ± 0,2	1,3, 1,44	1,37
anti-péptido 12	180 ± 5,9	6,2 ± 0,4	1,38, 1,46	1,42
anti-péptido 13	166 ± 10 ⁷	6,3 ± 0,4	1,16, 1,34	1,25
anti-péptido 14	175 ± 3,9	6,6 ± 0,2	1,42, 1,22	1,32
anti-péptido 15	170 ± 8,6 ⁷	6,7 ± 0,4	1,38, 1,18	1,28
anti-péptido 16	145 ± 14 ⁵	6,7 ± 0,3	1,02, 1,22	1,12
anti-péptido 17	165 ± 7,5 ⁶	6,3 ± 0,1	1,32, 1,5	1,41
anti-péptido 18	178 ± 6,2	6,6 ± 0,1	1,7, 1,2	1,45
anti-péptido 19	176 ± 8,0	6,4 ± 0,3	1,32, 1,34	1,33
anti-péptido 20	170 ± 10 ⁷	6,0 ± 0,2 ⁹	1,36, 1,5	1,43
anti-péptido 31	169 ± 7,0 ⁷	6,3 ± 0,2	1,16, 1,12	1,14
anti-péptido 32	163 ± 9,2 ⁵	5,7 ± 0,3 ⁸	1,28, 1,4	1,34
anti-péptido 33	177 ± 9,5	6,6 ± 0,2	1,14, 1,18	1,16
anti-péptido 34	182 ± 5,2	6,0 ± 0,2 ¹⁰	1,22, 1,24	1,23

¹Dos cercados de cinco pollos macho Single Comb White Leghorn de un día de vida se alimentaron con un nutriente adecuado (dieta de iniciación de pollo para aves de corral UW-Standard) con yema de huevo en polvo de control (1 g/kg dieta de yema de huevo seca de gallinas inyectadas con solo adyuvantes) o yema de huevo en polvo (1 g/kg dieta) de gallinas inmunizadas con los antígenos peptídicos indicados. Los pollos se criaron durante 3 semanas y se midió la ganancia de peso corporal durante este periodo (menos peso inicial). A los 21 días de vida, a todos los pollos se les tomó muestras de sangre, se recogió y se analizó el plasma del fósforo. Se recogieron todas las excretas a partir de los soportes para excrementos situados bajo cada cercado para pollos durante los últimos 3 días del estudio, se recogieron y se analizaron para el fósforo total.

²Ganancia ± error estándar = peso en el día 21 menos peso inicial.

³Fósforo en plasma ± error estándar.

⁴Se tomaron muestras a dos cercados y se analizaron. Se muestran los valores brutos (% de materia seca) y la media. 6*, 5**, 7*** indican p < 0,05**, p < 0,07* y p < 0,1*** con respecto al control.

⁵p < 0,05; ⁶p < 0,07; ⁷p < 0,1; ⁸p = 0,07; ⁹p = 0,13; y ¹⁰p = 0,16.

Ejemplo 3

Efecto de anticuerpos anti-Npt2B intestinal en la ganancia de peso corporal, concentración de fosfato en plasma, y ceniza ósea

Materiales y métodos

La producción de anticuerpos anti-Npt2B intestinal humano utilizando el péptido 16 se ha descrito en el Ejemplo 1 previo. En lugar de anticuerpos IgY purificados, se empleó directamente yema seca en polvo que contiene los anticuerpos del estudio de alimentación expuesto en este ejemplo.

A los pollos de engorde de siete días de vida se les asignó una dieta control (4 cercados de 5 pollos de engorde) o una dieta con anticuerpos (1 g/kg dieta de anticuerpo de yema de huevo liofilizada) (8 cercados de 5 pollos de engorde). La dieta control es una dieta adecuada de nutrientes convencionales y contenía 1 g/kg dieta de yema de huevo en polvo inyectada con adyuvante de control. La dieta de anticuerpo es la misma que la dieta de control salvo que el producto en polvo del anticuerpo anti-péptido 16 sustituye el polvo de control. Las dietas se iniciaron cuando los pollos tenían 7 días de vida y se alimentaron hasta los 21 días de edad. Los pesos corporales se determinaron en el día 14 y día 21. En el día 21, se recogieron muestras de sangre para determinar el nivel total de fósforo en plasma empleando un analizador Roche/Hitachi (basado en la reacción de fosfato con molibdato de amonio para formar fosfomolibdato de amonio sin reducción), y la tibia derecha se extrajo para determinar la ceniza ósea seca libre de grasa (el éter se extrae, se seca, y se calcina en un horno de mufla y la relación de ceniza/hueso libre de grasa seco se determinó y se convirtió en %).

Resultados

Como se muestra en la Tabla 3, los pollos de engorde alimentados con anticuerpos contra péptido 16 redujeron en el día 14 la ganancia de peso corporal en comparación con los pollos de engorde alimentados con el anticuerpo de yema en polvo con adyuvante del control (413 g contra 495 g del grupo de dieta del antipéptido 16 y grupo de dieta del control, respectivamente, $p = 0,08$). El fósforo en plasma no difirió entre estos dos grupos de tratamiento (6,12 mg/dl frente a 6,14 mg/dl para el grupo de dieta del anti-péptido 16 y grupo de dieta de control, respectivamente). Los pollos de engorde alimentados con el anticuerpo contra péptido 16 redujeron el contenido mineral óseo en comparación con los pollos de engorde alimentados con el anticuerpo de yema en polvo con adyuvante del control (0,524 % frente a 0,539 % para el grupo de dieta de anti-péptido 16 y grupo de dieta de control, respectivamente). Los pollos de engorde son razas de crecimiento muy rápido en relación con Leghorn. El peso corporal durante las primeras 3 semanas en pollos de engorde aumenta desde 35 gramos a aproximadamente 500-600 gramos (un aumento de más de 15 veces), mientras que en Leghorn el incremento es de 35 g hasta solo aproximadamente 180 g (incremento 5-6 veces). Por consiguiente, la ganancia de peso corporal en el pollo de engorde puede ser un indicador sensible al fósforo disponible dietético. A partir de los datos de ceniza ósea, la prioridad para mantener fosfato en sangre es mayor en esta raza que el fortalecimiento de huesos y el crecimiento muscular. Esto respalda que el crecimiento es el indicador más sensible en esta raza.

Tabla 3. El efecto de alimentación con un anticuerpo de huevo (1 g/kg dieta) contra péptido 16 de Npt2B intestinal en la ganancia de peso corporal, concentración de fósforo en plasma, y ceniza ósea.

	Control	Anti-péptido 16
Ganancia de peso corporal (g)	495 ± 15*	413 ± 16*
Fosfato en plasma (mg/dl)	6,14 ± 0,31	6,12 ± 0,19*
Ceniza ósea (%)	0,539 ± 0,005**	0,524 ± 0,005**
*Los pollos de engorde alimentados con anticuerpo contra péptido 16 redujeron en el día 14 la ganancia de peso corporal en comparación con los pollos de engorde alimentados con el anticuerpo de yema en polvo con adyuvante del control ($p = 0,0003$).		
**Los pollos de engorde alimentados con anticuerpo contra péptido 16 redujeron el contenido de mineral óseo en comparación con los pollos de engorde alimentados con el anticuerpo de yema en polvo con adyuvante del control ($p = 0,02$).		

Ejemplo 4

El anticuerpo administrado por vía oral puede alcanzar y bloquear la actividad de una proteína asociada a la membrana del borde en cepillo intestinal

Materiales y métodos

Preparación del anticuerpo: Las gallinas ponedoras Single Comb White Leghorn se utilizaron para la producción de anticuerpos (3 gallinas por antígeno peptídico). La fosfatasa alcalina intestinal de pollo se adquirió en Worthington. Para preparar una vacuna para cada gallina se diluyeron 0,5 mg de fosfatasa alcalina intestinal de pollo a una concentración final de 0,5 ml de STF y se mezcló con 0,5 ml de adyuvante completo de Freund (primera inyección) o adyuvante incompleto (vacuna de refuerzo) para formar una emulsificación de agua en aceite capaz de resistir una microesfera cuando se aplicaron gotas en agua con hielo. A continuación, se le inyectó a la gallina en cuatro sitios

(en cada muslo y en cada pechuga) con 0,25 ml de vacuna de emulsión por vía intramuscular. La inyección de refuerzo en adyuvante incompleto se realizó 7 días más tarde.

Los picos de los anticuerpos se alcanzaron a los 21 días, por lo tanto, los huevos se recogieron desde el día 21 al día 110. En aproximadamente 30 días, las yemas de huevo de cada gallina se separaron de los huevos enteros, se mezclaron y se liofilizaron. La yema de huevo seca en polvo que contiene el anticuerpo se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso en estudios de alimentación animal.

Experimento animal: El modelo de pollo utilizado en este estudio se describió en Biehl y Baker, *J. Nutr.* 1997, 127:2054-2059, con la excepción de anticuerpos contra fosfatas alcalinas intestinales. El control negativo utilizado en este estudio era una dieta deficiente en Pi (Pi = fosfato inorgánico, que es en gran medida fosfatos minerales o fosfato procedente de tejidos animales y productos tales como leche y huevos), en la que el fósforo dietético utilizado era fosfato fítico. Como se muestra en los resultados siguientes, este tratamiento dietético produjo niveles bajos de fósforo en plasma. El control positivo era la misma dieta que el control negativo, pero suplementado con 1 α -hidroxivitamina D₃ (20 μ g/kg dieta, Sigma). Como se muestra en los resultados siguientes, este tratamiento dietético aumentó los niveles de fósforo en sangre en comparación con el control negativo. Todos los tratamientos dietéticos restantes eran el control positivo más el anticuerpo (1 g de yema de huevo seca en polvo producida como ya se ha descrito). Los controles positivos y negativos se alimentaron con 1 g/kg dieta de yema seca en polvo de gallinas inyectadas con el adyuvante. Estas yemas de huevo en polvo carecían de anticuerpos específicos.

Se utilizó un total de 3 tratamientos (control negativo, control positivo, control positivo más anticuerpos anti-fosfatasa alcalina intestinal de pollo). A cada uno de los pollos macho Single Comb White Leghorn de seis días de vida se les asignó los tratamientos dietéticos. Los pollos se alimentaron con los tratamientos dietéticos durante 10 días, se pesaron, después se recogieron muestras de sangre para determinar la concentración de fósforo en plasma empleando un analizador Roche/Hitachi (basado en la reacción de fosfato con molibdato de amonio para formar fosfomolibdato de amonio sin reducción).

Resultados

Los anticuerpos contra fosfatasa alcalina intestinal de pollo eran eficaces en reducir los niveles de fósforo en plasma (Tabla 4).

Tabla 4. Fósforo en plasma de los pollos alimentados con anti-fosfatasas alcalinas intestinales (FAI) en presencia de vitamina D¹ activa

Tratamiento dietético	Fosfato en plasma	
	(mg/dl)	Error estándar
Deficiente en Pi	3,92	0,35
Vitamina D ² activa	6,70	0,51
FAI*** de pollo	4,73	0,29

¹Los pollos Leghorn de un día de vida (n=6) se alimentaron con una dieta deficiente en Pi que contiene fósforo fítico con la adición de solo 1 α -hidroxivitamina D₃ (vitamina D activa, 20 μ g/kg dieta) o la adición de 1 α -hidroxivitamina D₃ más un anticuerpo de huevo (1 g/kg dieta de anticuerpo de yema de huevo seca en polvo) contra fosfatasa alcalina intestinal de pollo. El fósforo en plasma se midió tras 10 días con alimentación a base de la dieta.

²Los pollos de la dieta de vitamina D activa (1 α -hidroxivitamina D₃) habían aumentado el fósforo en plasma en relación con los pollos con dieta deficiente en Pi (p = 0,0004).

³Los pollos alimentados con la dieta de vitamina D activa (1 α -hidroxivitamina D₃), suplementada con anticuerpos contra fosfatasa alcalina intestinal de pollo habían reducido el fósforo en plasma en relación con el tratamiento único con vitamina D activa a p <0,05.

Ejemplo 5

Reducir el nivel de fosfato en suero en animales urémicos inducidos por adenina

El modelo animal utilizado en este ejemplo es el modelo de rata urémica inducida por adenina (véanse, p. ej., Yokazawa *et al.*, *Nephron* 1986, 44:230-234; Katsumata *et al.*, *Kid Intl* 2003, 64:441-450; y Levi R *et al.*, *J Am Soc Nephrol* 2006, 17:107-112).

Las ratas (p. ej., ratas macho Sprague Dawley de aproximadamente 175-250 g, hasta 10 ratas por grupo) se alimentaron con una dieta control o una dieta de adenina inducida por uremia (p. ej., que contiene adenina al 0,75 %) durante un periodo de semanas (p. ej., 3 a 5 semanas o más). Las ratas alimentadas con la dieta de adenina desarrollarán hiperfosfatemia con un nivel de fosfato en suero superior a 4,4 mmol/l. Estas ratas también desarrollarán deficiencia en vitamina D₃, (1 α -hidroxivitamina D₃ y 1 α , 25-dihidroxivitamina D₃). El tratamiento oral diario de estas ratas alimentadas con la dieta de adenina aumentó la cantidad del anticuerpo anti-Npt2B intestinal, como los descritos en el Ejemplo 1 dará lugar a una reducción dependiente de la dosis de los niveles de fosfato en suero. Si estos anticuerpos se administran en las primeras 4 semanas de tratamiento con adenina y de aquí en

adelante, estos anticuerpos anti-Npt2B intestinales prevendrán, retrasarán o revertirán el desarrollo de hiperfosfatemia en estas ratas.

En otros grupos, a las ratas alimentadas con la dieta de adenina se les administra una forma de vitamina D (p. ej., 25-hidroxivitamina D o derivados de los mismos o un agente de vitamina D activa, tal como 1 α , 25-dihidroxivitamina D₃) para prevenir o corregir la deficiencia en vitamina D activa. Este tratamiento hará que las ratas sean más susceptibles a hiperfosfatemia y exacerbará la hiperfosfatemia en estas ratas una vez desarrollada. Tratando estas ratas que recibieron vitamina D (p. ej., 1 α , 25-dihidroxivitamina D₃) por vía oral con el aumento de la dosis de anticuerpo anti-Npt2B intestinal, tal como los descritos en el Ejemplo 1, se reducirán los niveles de fosfato en suero de estas ratas de manera dependiente de la dosis. Si los anticuerpos se administran en las primeras 4 semanas de tratamiento con adenina y de aquí en adelante, estos anticuerpos anti-Npt2B intestinales prevendrán o retrasarán el desarrollo o la exacerbación de hiperfosfatemia.

Pueden realizarse experimentos similares empleando otros animales urémicos inducidos por adenina, tales como perros, cerdos y monos.

Ejemplo 6

Reducir el nivel de fosfato en suero en ratas nefrectomizadas 5/6

Para nefrectomía 5/6 (véase, p. ej., Cozzolino M *et al.*, *Kidney Int.* 2003, 64:1653-61), varias ramas de la arteria renal izquierda se ligaron y el riñón derecho se extirpó. Las ratas nefrectomizadas 5/6 (p. ej., ratas macho Sprague Dawley, aproximadamente 175-250 g, hasta 10 ratas por grupo) se alimentaron con una dieta rica en fosfato (p. ej., fosfato al 0,9 %). Estas ratas se volverán urémicas semanas después de la cirugía (p. ej., 4 a 8 semanas) y desarrollarán insuficiencia renal, hiperfosfatemia, y deficiencia en vitamina D₃ activa (1 α -hidroxivitamina D₃ y 1 α , 25-dihidroxivitamina D₃). El tratamiento oral diario de estas ratas nefrectomizadas 5/6 alimentadas con la dieta rica en fosfato con aumento de la cantidad de anticuerpo anti-Npt2B intestinal, tal como los descritos en el Ejemplo 1, reducirá el nivel de fosfato en suero de manera dependiente de la dosis en estas ratas. Si los anticuerpos tales como los descritos en el Ejemplo 1 se administran en las primeras semanas después de la cirugía y de aquí en adelante, estos prevendrán o retrasarán el desarrollo de hiperfosfatemia en estas ratas.

En otros grupos, a las ratas nefrectomizadas 5/6 alimentadas con la dieta rica en fosfato se les administra una forma de vitamina D (p. ej., 25-hidroxivitamina D o derivados de los mismos o un agente de vitamina D activa, tal como 1 α , 25-dihidroxivitamina D₃) para prevenir o corregir la deficiencia en vitamina D activa. No obstante, este tratamiento hará que las ratas sean más susceptibles a la hiperfosfatemia y exacerbará la hiperfosfatemia en estas ratas una vez desarrollada. El tratamiento de estas ratas que recibieron vitamina D (p. ej., 1 α , 25-dihidroxivitamina D₃) por vía oral con aumento de dosis del anticuerpo anti-Npt2B intestinal, tal como los descritos en el Ejemplo 1, reducirá el nivel de fosfato en suero. Si los anticuerpos se administran en las primeras semanas de la cirugía y de aquí en adelante, estos anticuerpos anti-Npt2B intestinales prevendrán o retrasarán el desarrollo o la exacerbación de hiperfosfatemia en estas ratas.

La presente invención no tiene por objeto limitar los ejemplos precedentes, pero abarca todas estas modificaciones y variaciones incluidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Cook, Mark
Petkovich, Martin
Helvig, Christian
Hellestad, Erica
Crawford, Keith

<120> MÉTODOS PARA REDUCIR LA ABSORCIÓN DE FOSFATO

<130> 960296.00427

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 690

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 573 636 T3

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

ES 2 573 636 T3

180										185										190										
Ser	Ile	Thr	Asn	Thr	Ile	Val	Ala	Leu	Met	Gln	Val	Gly	Asp	Arg	Ser															
		195					200					205																		
Glu	Phe	Arg	Arg	Ala	Phe	Ala	Gly	Ala	Thr	Val	His	Asp	Phe	Phe	Asn															
	210					215					220																			
Trp	Leu	Ser	Val	Leu	Val	Leu	Leu	Pro	Val	Glu	Val	Ala	Thr	His	Tyr															
	225				230					235					240															
Leu	Glu	Ile	Ile	Thr	Gln	Leu	Ile	Val	Glu	Ser	Phe	His	Phe	Lys	Asn															
				245					250					255																
Gly	Glu	Asp	Ala	Pro	Asp	Leu	Leu	Lys	Val	Ile	Thr	Lys	Pro	Phe	Thr															
			260					265					270																	
Lys	Leu	Ile	Val	Gln	Leu	Asp	Lys	Lys	Val	Ile	Ser	Gln	Ile	Ala	Met															
		275					280					285																		
Asn	Asp	Glu	Lys	Ala	Lys	Asn	Lys	Ser	Leu	Val	Lys	Ile	Trp	Cys	Lys															
		290				295					300																			
Thr	Phe	Thr	Asn	Lys	Thr	Gln	Ile	Asn	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Thr	Ala															
					310					315					320															
Asn	Cys	Thr	Ser	Pro	Ser	Leu	Cys	Trp	Thr	Asp	Gly	Ile	Gln	Asn	Trp															
				325					330					335																
Thr	Met	Lys	Asn	Val	Thr	Tyr	Lys	Glu	Asn	Ile	Ala	Lys	Cys	Gln	His															
			340					345					350																	
Ile	Phe	Val	Asn	Phe	His	Leu	Pro	Asp	Leu	Ala	Val	Gly	Thr	Ile	Leu															
		355					360					365																		
Leu	Ile	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Leu	Cys	Gly	Cys	Leu	Ile	Met	Ile	Val															
	370					375					380																			
Lys	Ile	Leu	Gly	Ser	Val	Leu	Lys	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Val	Ile	Lys															
					390					395					400															
Lys	Thr	Ile	Asn	Thr	Asp	Phe	Pro	Phe	Pro	Phe	Ala	Trp	Leu	Thr	Gly															
				405					410					415																
Tyr	Leu	Ala	Ile	Leu	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Thr	Phe	Ile	Val	Gln	Ser															
			420					425					430																	
Ser	Ser	Val	Phe	Thr	Ser	Ala	Leu	Thr	Pro	Leu	Ile	Gly	Ile	Gly	Val															
		435					440					445																		
Ile	Thr	Ile	Glu	Arg	Ala	Tyr	Pro	Leu	Thr	Leu	Gly	Ser	Asn	Ile	Gly															

ES 2 573 636 T3

450 455 460
 Thr Thr Thr Thr Ala Ile Leu Ala Ala Leu Ala Ser Pro Gly Asn Ala
 465 470 475 480
 Leu Arg Ser Ser Leu Gln Ile Ala Leu Cys His Phe Phe Phe Asn Ile
 485 490 495
 Ser Gly Ile Leu Leu Trp Tyr Pro Ile Pro Phe Thr Arg Leu Pro Ile
 500 505 510
 Arg Met Ala Lys Gly Leu Gly Asn Ile Ser Ala Lys Tyr Arg Trp Phe
 515 520 525
 Ala Val Phe Tyr Leu Ile Ile Phe Phe Phe Leu Ile Pro Leu Thr Val
 530 535 540
 Phe Gly Leu Ser Leu Ala Gly Trp Arg Val Leu Val Gly Val Gly Val
 545 550 555 560
 Pro Val Val Phe Ile Ile Ile Leu Val Leu Cys Leu Arg Leu Leu Gln
 565 570 575
 Ser Arg Cys Pro Arg Val Leu Pro Lys Lys Leu Gln Asn Trp Asn Phe
 580 585 590
 Leu Pro Leu Trp Met Arg Ser Leu Lys Pro Trp Asp Ala Val Val Ser
 595 600 605
 Lys Phe Thr Gly Cys Phe Gln Met Arg Cys Cys Cys Cys Cys Arg Val
 610 615 620
 Cys Cys Arg Ala Cys Cys Leu Leu Cys Gly Cys Pro Lys Cys Cys Arg
 625 630 635 640
 Cys Ser Lys Cys Cys Glu Asp Leu Glu Glu Ala Gln Glu Gly Gln Asp
 645 650 655
 Val Pro Val Lys Ala Pro Glu Thr Phe Asp Asn Ile Thr Ile Ser Arg
 660 665 670
 Glu Ala Gln Gly Glu Val Pro Ala Ser Asp Ser Lys Thr Glu Cys Thr
 675 680 685
 Ala Leu
 690

<210> 2
 <211> 697
 <212> PRT
 <213> ratón

<400> 2

Met Ala Pro Trp Pro Glu Leu Glu Asn Ala Gln Pro Asn Pro Gly Lys
1 5 10 15

Phe Ile Glu Gly Ala Ser Gly Pro Gln Ser Ser Ile Pro Ala Lys Asp
20 25 30

Lys Glu Ala Ser Lys Thr Asn Asp Asn Gly Thr Pro Val Ala Lys Thr
35 40 45

Glu Leu Leu Pro Ser Tyr Ser Ala Leu Val Leu Ile Glu Glu His Pro
50 55 60

Glu Gly Thr Asp Pro Trp Asp Leu Pro Glu Leu Gln Asp Thr Gly Ile
65 70 75 80

Lys Trp Ser Glu Arg Asp Thr Lys Gly Lys Thr Leu Cys Ile Phe Gln
85 90 95

Gly Val Gly Lys Phe Ile Leu Leu Leu Gly Phe Leu Tyr Leu Phe Val
100 105 110

Cys Ser Leu Asp Val Leu Ser Ser Ala Phe Gln Leu Val Gly Gly Lys
115 120 125

Val Ala Gly Gln Phe Phe Ser Asn Asn Ser Ile Met Ser Asn Pro Val
130 135 140

Ala Gly Leu Val Ile Gly Val Leu Val Thr Val Met Val Gln Ser Ser
145 150 155 160

Ser Thr Ser Ser Ser Ile Ile Val Ser Met Val Ala Ser Ser Leu Leu
165 170 175

Thr Val Arg Ala Ala Ile Pro Ile Ile Met Gly Ala Asn Ile Gly Thr
180 185 190

Ser Ile Thr Asn Thr Ile Val Ala Leu Met Gln Ala Gly Asp Arg Asn
195 200 205

Glu Phe Arg Arg Ala Phe Ala Gly Ala Thr Val His Asp Phe Phe Asn
210 215 220

Trp Leu Ser Val Phe Val Leu Leu Pro Leu Glu Ala Ala Thr His Tyr
225 230 235 240

Leu Glu Ile Leu Thr Asn Leu Val Leu Glu Thr Phe Lys Phe Gln Asn
245 250 255

Gly Glu Asp Ala Pro Asp Ile Leu Lys Val Ile Thr Asp Pro Phe Thr
260 265 270

ES 2 573 636 T3

Lys Leu Ile Ile Gln Leu Asp Lys Lys Val Ile Gln Gln Ile Ala Met
 275 280 285
 Gly Asp Ser Ala Ala Gln Asn Lys Ser Leu Ile Lys Ile Trp Cys Lys
 290 295 300
 Ser Ile Thr Asn Val Thr Glu Met Asn Val Thr Val Pro Ser Thr Asp
 305 310 315 320
 Asn Cys Thr Ser Pro Ser Tyr Cys Trp Thr Asp Gly Ile Gln Thr Trp
 325 330 335
 Thr Ile Gln Asn Val Thr Gln Lys Glu Asn Ile Ala Lys Cys Gln His
 340 345 350
 Ile Phe Val Asn Phe Ser Leu Pro Asp Leu Ala Val Gly Ile Ile Leu
 355 360 365
 Leu Thr Val Ser Leu Val Val Leu Cys Gly Cys Leu Ile Met Ile Val
 370 375 380
 Lys Leu Leu Gly Ser Val Leu Arg Gly Gln Val Ala Thr Val Ile Lys
 385 390 395 400
 Lys Thr Leu Asn Thr Asp Phe Pro Phe Pro Phe Ala Trp Leu Thr Gly
 405 410 415
 Tyr Leu Ala Ile Leu Val Gly Ala Gly Met Thr Phe Ile Val Gln Ser
 420 425 430
 Ser Ser Val Phe Thr Ser Ala Met Thr Pro Leu Ile Gly Ile Gly Val
 435 440 445
 Ile Ser Ile Glu Arg Ala Tyr Pro Leu Thr Leu Gly Ser Asn Ile Gly
 450 455 460
 Thr Thr Thr Thr Ala Ile Leu Ala Ala Leu Ala Ser Pro Gly Asn Thr
 465 470 475 480
 Leu Arg Ser Ser Leu Gln Ile Ala Leu Cys His Phe Phe Phe Asn Ile
 485 490 495
 Ser Gly Ile Leu Leu Trp Tyr Pro Ile Pro Phe Thr Arg Leu Pro Ile
 500 505 510
 Arg Leu Ala Lys Gly Leu Gly Asn Ile Ser Ala Lys Tyr Arg Trp Phe
 515 520 525
 Ala Val Phe Tyr Leu Ile Phe Phe Phe Phe Val Thr Pro Leu Thr Val
 530 535 540

Phe Gly Leu Ser Leu Ala Gly Trp Pro Val Leu Val Gly Val Gly Val
545 550 555 560

Pro Ile Ile Leu Leu Leu Leu Val Leu Cys Leu Arg Met Leu Gln
565 570 575

Phe Arg Cys Pro Arg Ile Leu Pro Leu Lys Leu Arg Asp Trp Asn Phe
580 585 590

Leu Pro Leu Trp Met His Ser Leu Lys Pro Trp Asp Asn Val Ile Ser
595 600 605

Leu Ala Thr Thr Cys Phe Gln Arg Arg Cys Cys Cys Cys Arg Val
610 615 620

Cys Cys Arg Val Cys Cys Met Val Cys Gly Cys Lys Cys Cys Arg Cys
625 630 635 640

Ser Lys Cys Cys Arg Asp Gln Gly Glu Glu Glu Glu Lys Glu Gln
645 650 655

Asp Ile Pro Val Lys Ala Ser Gly Ala Phe Asp Asn Ala Ala Met Ser
660 665 670

Lys Glu Cys Gln Asp Glu Gly Lys Gly Gln Val Glu Val Leu Ser Met
675 680 685

Lys Ala Leu Ser Asn Thr Thr Val Phe
690 695

<210> 3
<211> 695
<212> PRT
<213> rata

<400> 3

Met Ala Pro Trp Pro Glu Leu Glu Asn Ala His Pro Asn Pro Asn Lys
1 5 10 15

Phe Ile Glu Gly Ala Ser Gly Pro Gln Ser Ser Ile Pro Asp Lys Asp
20 25 30

Lys Gly Thr Ser Lys Thr Asn Asp Ser Gly Thr Pro Val Ala Lys Ile
35 40 45

Glu Leu Leu Pro Ser Tyr Ser Ala Leu Val Leu Ile Glu Glu Pro Pro
50 55 60

Glu Gly Asn Asp Pro Trp Asp Leu Pro Glu Leu Gln Asp Asn Gly Ile
65 70 75 80

ES 2 573 636 T3

Lys	Trp	Ser	Glu	Arg 85	Asp	Ser	Lys	Gly	Lys 90	Ile	Leu	Cys	Ile	Phe	Gln 95
Gly	Ile	Gly	Lys 100	Phe	Ile	Leu	Leu	Leu 105	Gly	Phe	Leu	Tyr	Leu 110	Phe	Val
Cys	Ser	Leu 115	Asp	Val	Leu	Ser	Ser 120	Ala	Phe	Gln	Leu	Val 125	Gly	Gly	Lys
Met	Ala 130	Gly	Gln	Phe	Phe	Ser 135	Asn	Asn	Ser	Ile	Met 140	Ser	Asn	Pro	Val
Ala 145	Gly	Leu	Val	Ile	Gly 150	Val	Leu	Val	Thr	Val 155	Met	Val	Gln	Ser	Ser 160
Ser	Thr	Ser	Ser	Ser 165	Ile	Ile	Val	Ser	Met 170	Val	Ala	Ser	Ser	Leu 175	Leu
Ser	Val	Arg	Ala 180	Ala	Ile	Pro	Ile	Ile 185	Met	Gly	Ala	Asn	Ile 190	Gly	Thr
Ser	Ile	Thr 195	Asn	Thr	Ile	Val	Ala 200	Leu	Met	Gln	Ala	Gly 205	Asp	Arg	Asn
Glu	Phe 210	Arg	Arg	Ala	Phe	Ala 215	Gly	Ala	Thr	Val	His 220	Asp	Phe	Phe	Asn
Trp 225	Leu	Ser	Val	Leu	Val 230	Leu	Leu	Pro	Leu	Glu 235	Ala	Ala	Thr	His	Tyr 240
Leu	Glu	Lys	Leu	Thr 245	Asn	Leu	Val	Leu	Glu 250	Thr	Phe	Ser	Phe	Gln 255	Asn
Gly	Glu	Asp	Ala 260	Pro	Asp	Ile	Leu	Lys 265	Val	Ile	Thr	Asp	Pro 270	Phe	Thr
Lys	Leu	Ile 275	Ile	Gln	Leu	Asp	Lys 280	Lys	Val	Ile	Gln	Gln 285	Ile	Ala	Met
Gly	Asp 290	Ser	Glu	Ala	Gln	Asn 295	Lys	Ser	Leu	Ile	Lys 300	Ile	Trp	Cys	Lys
Thr 305	Ile	Ser	Asn	Val	Ile 310	Glu	Glu	Asn	Val	Thr 315	Val	Pro	Ser	Pro	Asp 320
Asn	Cys	Thr	Ser	Pro 325	Ser	Tyr	Cys	Trp	Thr 330	Asp	Gly	Ile	Gln	Thr 335	Trp
Thr	Ile	Gln	Asn 340	Val	Thr	Glu	Lys	Glu 345	Asn	Ile	Ala	Lys	Cys 350	Gln	His

Ile Phe Val Asn Phe Ser Leu Pro Asp Leu Ala Val Gly Ile Ile Leu
355 360 365

Leu Thr Val Ser Leu Leu Ile Leu Cys Gly Cys Leu Ile Met Ile Val
370 375 380

Lys Leu Leu Gly Ser Val Leu Arg Gly Gln Val Ala Thr Val Ile Lys
385 390 395 400

Lys Thr Leu Asn Thr Asp Phe Pro Phe Pro Phe Ala Trp Leu Thr Gly
405 410 415

Tyr Leu Ala Ile Leu Val Gly Ala Gly Met Thr Phe Ile Val Gln Ser
420 425 430

Ser Ser Val Phe Thr Ser Ala Met Thr Pro Leu Ile Gly Ile Gly Val
435 440 445

Ile Ser Ile Glu Arg Ala Tyr Pro Leu Thr Leu Gly Ser Asn Ile Gly
450 455 460

Thr Thr Thr Thr Ala Ile Leu Ala Ala Leu Ala Ser Pro Gly Asn Thr
465 470 475 480

Leu Arg Ser Ser Leu Gln Ile Ala Leu Cys His Phe Phe Phe Asn Ile
485 490 495

Ser Gly Ile Leu Leu Trp Tyr Pro Ile Pro Phe Thr Arg Leu Pro Ile
500 505 510

Arg Leu Ala Lys Gly Leu Gly Asn Ile Ser Ala Lys Tyr Arg Trp Phe
515 520 525

Ala Val Phe Tyr Leu Ile Phe Phe Phe Leu Leu Thr Pro Leu Thr Val
530 535 540

Phe Gly Leu Ser Leu Ala Gly Trp Pro Val Leu Val Gly Val Gly Val
545 550 555 560

Pro Ile Ile Leu Leu Ile Leu Leu Val Leu Cys Leu Arg Met Leu Gln
565 570 575

Ala Arg Cys Pro Arg Ile Leu Pro Leu Lys Leu Arg Asp Trp Asn Phe
580 585 590

Leu Pro Leu Trp Met His Ser Leu Lys Pro Trp Asp Asn Ile Ile Ser
595 600 605

Leu Ala Thr Ser Cys Phe Gln Arg Arg Cys Cys Cys Cys Cys Arg Val
610 615 620

ES 2 573 636 T3

Cys Cys Arg Val Cys Cys Met Val Cys Gly Cys Lys Cys Cys Arg Cys
 625 630 635 640
 Ser Lys Cys Cys Lys Asn Leu Glu Glu Glu Lys Glu Gln Asp Val
 645 650 655
 Pro Val Lys Ala Ser Gly Gly Phe Asp Asn Thr Ala Met Ser Lys Glu
 660 665 670
 Cys Gln Asp Glu Gly Lys Gly Gln Val Glu Val Leu Gly Met Lys Ala
 675 680 685
 Leu Ser Asn Thr Thr Val Phe
 690 695

<210> 4
 <211> 674
 <212> PRT
 <213> pollo

<400> 4

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

Ser Ser Ile Ile Val Ser Met Val Ser Ser Thr Leu Leu Thr Val Gln
165 170 175

Ser Ala Ile Pro Ile Ile Met Gly Ala Asn Ile Gly Thr Ser Val Thr
180 185 190

Asn Thr Ile Val Ala Leu Met Gln Ala Gly Asp Arg Asn Glu Phe Arg
195 200 205

Arg Ala Phe Ala Gly Ala Thr Ile His Asp Phe Phe Asn Trp Leu Ala
210 215 220

Val Phe Ala Leu Leu Pro Ile Glu Val Ile Ser Gly Tyr Leu Tyr His
225 230 235 240

Leu Thr Asn Val Ile Val Glu Ser Phe His Leu Glu Ser Gly Glu Asp
245 250 255

Ala Pro Glu Leu Leu Lys Val Ile Thr Asp Pro Phe Thr Lys Leu Ile
260 265 270

Ile Glu Leu Asp Lys Ser Val Ile Asn Ala Ile Ala Thr Asn Asp Glu
275 280 285

Ser Ala Lys Asn Lys Ser Leu Val Lys Val Trp Cys Ile Thr Glu Thr
290 295 300

Asn Val Thr Leu Gln Asn Val Thr Ile Pro Pro Ser Glu Asn Cys Thr
305 310 315 320

Ser Ser Glu Leu Cys Trp Ser Glu Gly Asn Val Thr Trp Thr Met Lys
325 330 335

Asn Ile Ser Glu Thr Glu Tyr Ile Thr Lys Cys Arg His Leu Phe Ala
340 345 350

Glu Thr Asp Leu Pro Asp Leu Ala Ile Gly Leu Ile Leu Leu Ala Leu
355 360 365

Ser Leu Leu Val Leu Cys Ser Cys Leu Val Met Ile Val Lys Leu Leu
370 375 380

Asn Ser Val Leu Lys Gly Gln Val Ala Ser Val Ile Lys Lys Thr Ile
385 390 395 400

Asn Thr Asp Phe Pro Phe Pro Phe Thr Trp Leu Ala Gly Tyr Leu Ala
405 410 415

Met Leu Ala Gly Ala Gly Met Thr Phe Val Val Gln Ser Ser Ser Val
420 425 430

Phe Thr Ser Ala Ile Thr Pro Leu Val Gly Ile Gly Val Ile Ser Ile
435 440 445

Glu Arg Ser Tyr Pro Leu Thr Leu Gly Ala Asn Ile Gly Thr Thr Thr
450 455 460

Thr Ala Ile Leu Ala Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Thr Leu Lys Tyr
465 470 475 480

Ser Leu Gln Ile Ala Leu Cys His Phe Phe Phe Asn Val Ser Gly Ile
485 490 495

Ile Leu Phe Tyr Pro Leu Pro Phe Thr Arg Leu Pro Ile Arg Met Ser
500 505 510

Lys Ser Leu Gly Asn Ile Thr Ala Lys Tyr Arg Trp Phe Ala Ile Phe
515 520 525

Tyr Leu Leu Ile Cys Phe Phe Leu Leu Pro Leu Phe Val Phe Gly Leu
530 535 540

Ser Leu Ala Gly Trp Pro Val Leu Leu Gly Val Cys Leu Pro Leu Leu
545 550 555 560

Ala Leu Phe Ile Ala Val Ile Val Ile Asn Ile Met Gln Thr Arg Arg
565 570 575

Pro His Ser Leu Pro Glu Lys Leu Gln Asn Trp Asp Phe Leu Pro Ile
580 585 590

Trp Met His Ser Leu Glu Pro Trp Asp Asn Met Ile Met Ser Ser Leu
595 600 605

Ala Phe Cys Gly Lys His Cys Cys Gly Phe Cys Lys Cys Cys Lys Val
610 615 620

Asn Ala Glu Gln Glu Gly Ala Lys Asp Asn Gln Leu Lys Thr Met Glu
625 630 635 640

Val Tyr Glu Asn Thr Ile Ala Met Ala Asp Glu Glu Arg Gly Val Arg
645 650 655

Arg Ala Pro Ala Ala Ala Cys Val Glu Lys Thr Gly Thr Asn Asn Thr
660 665 670

Ala Leu

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 5

		Leu Val Gly Gly Lys Met Ala Gly
		1 5
5	<210> 6 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> péptido sintético	
10	<400> 6	
		Phe His Phe Lys Asn Gly Glu Asp
		1 5
15	<210> 7 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> péptido sintético	
20	<400> 7	
		Leu Lys Val Ile Thr Lys Pro Phe
		1 5
25	<210> 8 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> péptido sintético	
30	<400> 8	
		Leu Asp Lys Lys Val Ile Ser Gln
		1 5
35	<210> 9 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> péptido sintético	
40	<400> 9	
		Ser Leu Val Lys Ile Trp Cys Lys
		1 5
45	<210> 10 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> péptido sintético	
50	<400> 10	
		Thr Ser Pro Ser Leu Cys Trp Thr
		1 5
	<210> 11 <211> 8	

	<212> PRT <213> Artificial	
5	<220> <223> péptido sintético <400> 11	Tyr Pro Leu Thr Leu Gly Ser Asn 1 5
10	<210> 12 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	
15	<220> <223> péptido sintético <400> 12	Thr Thr Ala Ile Leu Ala Ala Leu 1 5
20	<210> 13 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	
25	<220> <223> péptido sintético <400> 13	Val Gln Ser Ser Ser Val Phe Thr 1 5
30	<210> 14 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	
35	<220> <223> péptido sintético <400> 14	Leu Ile Gly Ile Gly Val Ile Thr 1 5
40	<210> 15 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	
45	<220> <223> péptido sintético <400> 15	Glu Val Ala Thr His Tyr Leu Glu 1 5
50	<210> 16 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	
55	<220> <223> péptido sintético	

	<400> 16	
		Gly Ile Gln Asn Trp Thr Met Lys 1 5
5	<210> 17 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	
10	<220> <223> péptido sintético	
	<400> 17	
		Phe Val Asn Phe His Leu Pro Asp 1 5
15	<210> 18 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	
20	<220> <223> péptido sintético	
	<400> 18	
		Ser Pro Gly Asn Ala Leu Arg Ser 1 5
25	<210> 19 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	
30	<220> <223> péptido sintético	
	<400> 19	
		Glu Asn Ile Ala Lys Cys Gln His 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo IgY anti-cotransportador de sodio-fosfato de tipo 2B (Npt2B) intestinal que se une a Npt2B de la SEQ ID NO: 1 para su uso en un método para reducir la absorción de fosfato en un sujeto animal humano o no humano en riesgo de desarrollar o de haber desarrollado hiperfosfatemia, el método comprende la etapa de:
5 administrar dicho anticuerpo por vía oral al sujeto en una cantidad eficaz para reducir o mantener la concentración de fosfato en suero en el sujeto.
- 10 2. El anticuerpo IgY anti-Npt2B intestinal para su uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto es un sujeto humano.
3. El anticuerpo IgY anti-Npt2B intestinal para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el sujeto padece una enfermedad renal.
15 4. El anticuerpo IgY anti-Npt2B intestinal para su uso según la reivindicación 3, en el que la enfermedad renal se selecciona entre enfermedad renal en estadio terminal, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, enfermedad renal poliquística, enfermedad renal crónica, necrosis tubular aguda, una infección que reduce la función renal, y una obstrucción del tracto urinario.
20 5. El anticuerpo IgY anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sujeto recibe un compuesto de vitamina D.
6. El anticuerpo IgY anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo se obtiene a partir de un huevo aviar.
25 7. El anticuerpo IgY anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo se administra con un aglutinante de fosfato.
- 30 8. El anticuerpo IgY anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además las etapas de medir la concentración de fosfato en suero tras administrar el anticuerpo anti-Npt2B intestinal y comparar la concentración antes de administrar el anticuerpo anti-Npt2B intestinal.
- 35 9. Un anticuerpo anti-cotransportador de sodio-fosfato de tipo 2B (Npt2B) intestinal que se une a un epítipo en los aminoácidos 234-362 de la SEQ ID NO: 1 para su uso en un método para reducir la absorción de fosfato en un sujeto animal humano o no humano en riesgo de desarrollar o de haber desarrollado hiperfosfatemia, comprendiendo el método la etapa de:
40 administrar dicho anticuerpo por vía oral al sujeto en una cantidad eficaz para reducir o mantener la concentración de fosfato en suero en el sujeto.
10. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo anti-Npt2B intestinal se une a un epítipo en los aminoácidos 245-340 de la SEQ ID NO: 1.
- 45 11. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según la reivindicación 9 o 10, en el que el anticuerpo anti-Npt2B intestinal se une a un epítipo en los aminoácidos 252-330 de la SEQ ID NO: 1.
12. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el sujeto es un sujeto humano.
50 13. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que el sujeto padece una enfermedad renal.
14. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según la reivindicación 13, en el que la enfermedad renal se selecciona entre enfermedad renal en estadio terminal, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, enfermedad renal poliquística, enfermedad renal crónica, necrosis tubular aguda, una infección que reduce la función renal, y una obstrucción del tracto urinario.
55 15. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en el que el sujeto recibe un compuesto de vitamina D.
16. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgY.
- 60 17. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, en el que el anticuerpo se administra con un aglutinante de fosfato.
65

18. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17, que comprende además las etapas de medir la concentración de fosfato en suero tras administrar el anticuerpo anti-Npt2B intestinal y comparar la concentración antes de administrar el anticuerpo anti-Npt2B intestinal.
- 5 19. Un anticuerpo anti-cotransportador de sodio-fosfato de tipo 2B (Npt2B) intestinal que se une a un epítipo en los aminoácidos 429-485 de la SEQ ID NO: 1 para su uso en un método para reducir la absorción de fosfato en un sujeto animal humano o no humano en riesgo de desarrollar o de haber desarrollado hiperfosfatemia, comprendiendo el método la etapa de:
- 10 administrar dicho anticuerpo por vía oral al sujeto en una cantidad eficaz para reducir o mantener la concentración de fosfato en suero en el sujeto.
20. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según la reivindicación 19, en el que el anticuerpo anti-Npt2B intestinal se une a un epítipo en los aminoácidos 445-480 de la SEQ ID NO: 1.
- 15 21. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según la reivindicación 19 o 20, en el que el anticuerpo anti-Npt2B intestinal se une a un epítipo en los aminoácidos 455-474 de la SEQ ID NO: 1.
22. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que el sujeto es un sujeto humano.
- 20 23. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en el que el sujeto padece una enfermedad renal.
- 25 24. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según la reivindicación 23, en el que la enfermedad renal se selecciona entre enfermedad renal en estadio terminal, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, enfermedad renal poliquística, enfermedad renal crónica, necrosis tubular aguda, una infección que reduce la función renal, y una obstrucción del tracto urinario.
- 30 25. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, en el que el sujeto recibe un compuesto de vitamina D.
26. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgY.
- 35 27. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26, en el que el anticuerpo se administra con un aglutinante de fosfato.
- 40 28. El anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 27, que comprende además las etapas de medir la concentración de fosfato en suero tras administrar el anticuerpo anti-Npt2B intestinal y comparar la concentración antes de administrar el anticuerpo anti-Npt2B intestinal.
29. Un compuesto de vitamina D y un anticuerpo anti-cotransportador de sodio-fosfato de tipo 2B (Npt2B) intestinal que se une a Npt2B de la SEQ ID NO: 1 para su uso en un método para reducir los efectos secundarios de la terapia con vitamina D en un ser humano, que comprende la etapa de:
- 45 administrar dicho compuesto de vitamina D y dicho anticuerpo por vía oral al sujeto, en el que dicho anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para reducir la hiperfosfatemia inducida por una terapia con vitamina D.
- 50 30. El compuesto de vitamina D y un anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según la reivindicación 29, en el que el sujeto padece una enfermedad renal.
31. El compuesto de vitamina D y un anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según la reivindicación 29 o 30, en el que el sujeto presenta deficiencia en vitamina D.
- 55 32. El compuesto de vitamina D y un anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, en el que el anticuerpo se administra con un aglutinante de fosfato.
- 60 33. El compuesto de vitamina D y un anticuerpo anti-Npt2B intestinal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32, que comprende además las etapas de medir la concentración de fosfato en suero tras administrar el anticuerpo anti-Npt2B intestinal y comparar la concentración antes de administrar el anticuerpo anti-Npt2B intestinal.

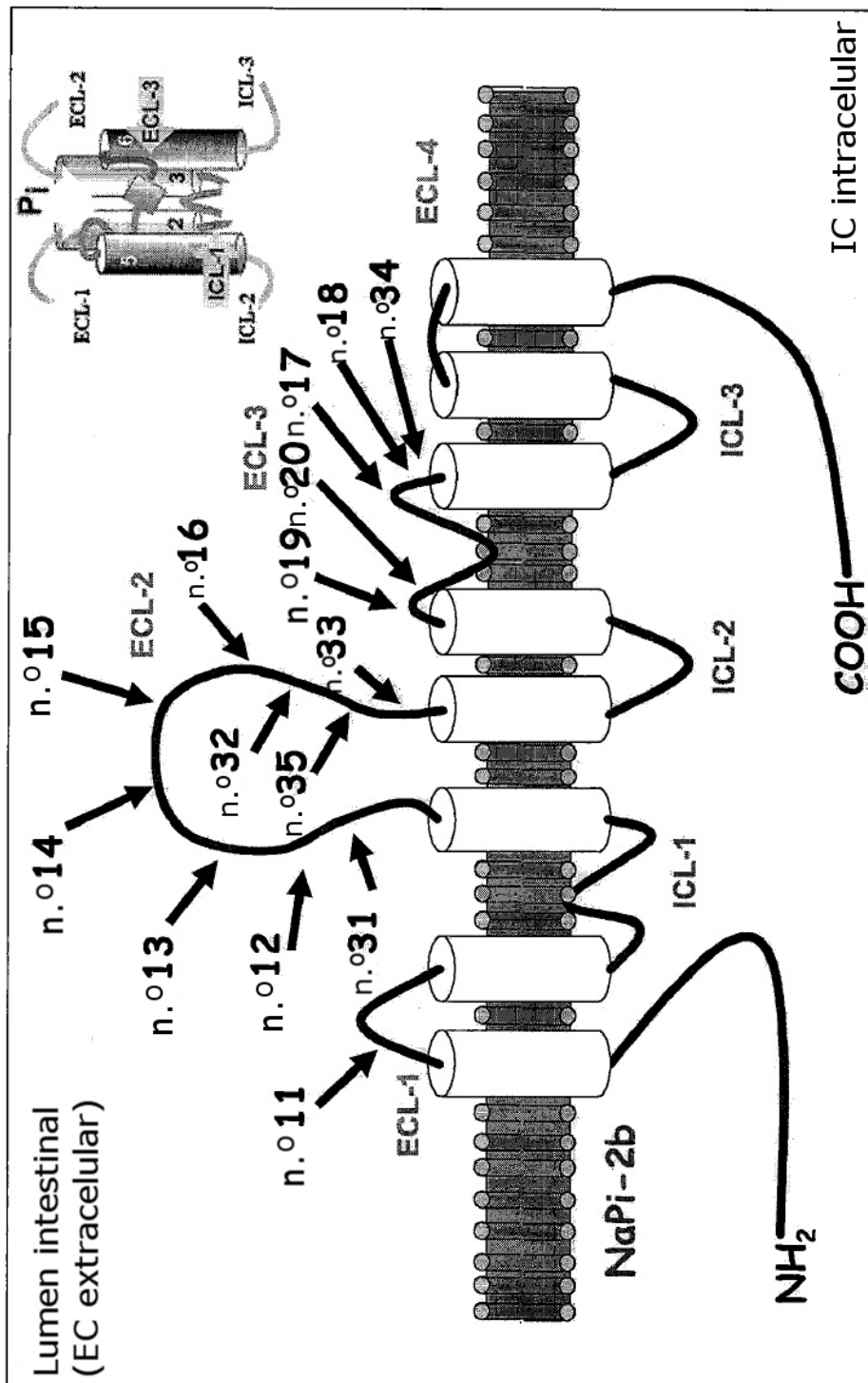


FIG. 1

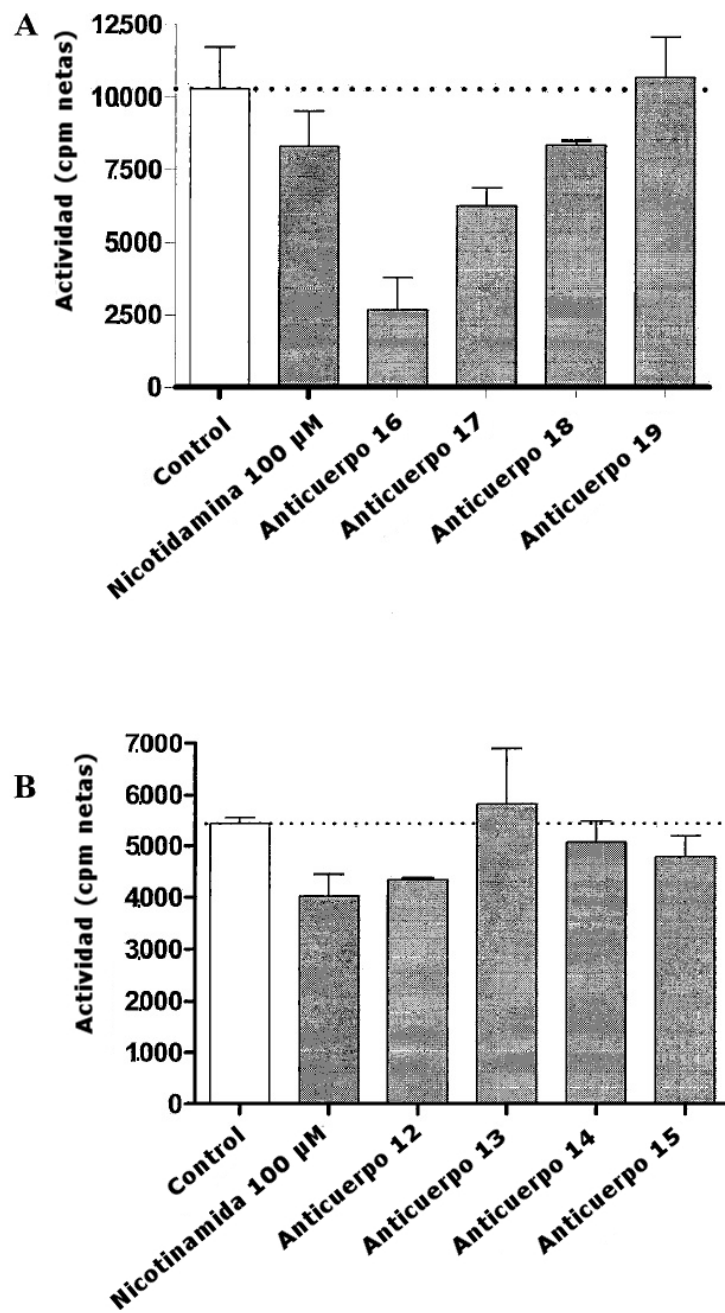


FIG. 2