

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

|                                                                    |                                                                                                                                                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (22) Data de pedido: <b>2008.05.12</b>                             | (73) Titular(es):<br><b>ENOBIA CANADA LIMITED PARTNERSHIP</b><br><b>2901 RACHEL STREET EAST, SUITE 23,</b><br><b>MONTREAL QUÉBEC H1W 4A4</b> <b>CA</b>                                            |
| (30) Prioridade(s): <b>2007.05.11 US 917589 P</b>                  |                                                                                                                                                                                                   |
| (43) Data de publicação do pedido: <b>2010.03.03</b>               |                                                                                                                                                                                                   |
| (45) Data e BPI da concessão: <b>2011.12.07</b><br><b>046/2012</b> | (72) Inventor(es):<br><b>PHILIPPE CRINE</b> <b>CA</b><br><b>ISABELLE LEMIRE</b> <b>CA</b><br><b>THOMAS P. LOISEL</b> <b>CA</b><br><b>GUY BOILEAU</b> <b>CA</b><br><b>PIERRE LEONARD</b> <b>CA</b> |
|                                                                    | (74) Mandatário:<br><b>MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA</b><br><b>RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA</b> <b>PT</b>                                                             |

(54) Epígrafe: **FOSFATASE ALCALINA DIRIGIDA AO OSSO, KITS E MÉTODOS PARA A UTILIZAÇÃO DA MESMA**

(57) Resumo:

UMA FOSFATASE ALCALINA DIRIGIDA AO OSSO, COMPREENDENDO UM POLIPEPTÍDEO COM A ESTRUTURA: Z-SALP-Y-SPACER-X-WN-V, EM QUE SALP É O DOMÍNIO EXTRACELULAR DA FOSFATASE ALCALINA; EM QUE V ESTÁ AUSENTE OU É UMA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE PELO MENOS UM AMINOÁCIDO; X ESTÁ AUSENTE OU É UMA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE PELO MENOS UM AMINOÁCIDO; Y ESTÁ AUSENTE OU É UMA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE PELO MENOS UM AMINOÁCIDO; Z ESTÁ AUSENTE OU É UMA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE PELO MENOS UM AMINOÁCIDO; E WN É UM POLIASPARTATO OU UM POLIGLUTAMATO EM QUE N = 10 A 16. KITS E MÉTODOS PARA A UTILIZAÇÃO DA MESMA.

## RESUMO

### "FOSFATASE ALCALINA DIRIGIDA AO OSSO, KITS E MÉTODOS PARA A UTILIZAÇÃO DA MESMA"

Uma fosfatase alcalina dirigida ao osso, compreendendo um polipeptídeo com a estrutura: Z-sALP-Y-spacer-X-W<sub>n</sub>-V, em que sALP é o domínio extracelular da fosfatase alcalina; em que V está ausente ou é uma sequência de aminoácidos de pelo menos um aminoácido; X está ausente ou é uma sequência de aminoácidos de pelo menos um aminoácido; Y está ausente ou é uma sequência de aminoácidos de pelo menos um aminoácido; Z está ausente ou é uma sequência de aminoácidos de pelo menos um aminoácido; e W<sub>n</sub> é um poliaspartato ou um poliglutamato em que n = 10 a 16. Kits e métodos para a utilização da mesma.

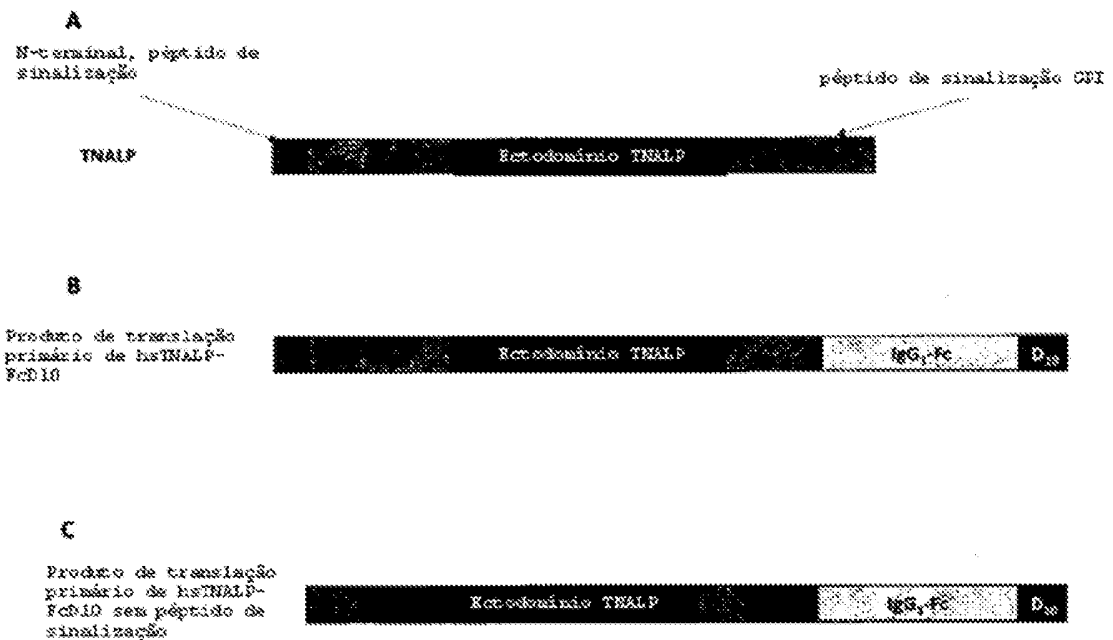


Figura 1

### **DESCRIÇÃO**

## **"FOSFATASE ALCALINA DIRIGIDA AO OSSO, KITS E MÉTODOS PARA A UTILIZAÇÃO DA MESMA"**

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a uma fosfatase alcalina dirigida ao osso, kits e métodos para a utilização da mesma.

### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

Hipofosfatasia (HPP) é uma forma rara, hereditária de raquitismo ou osteomalacia (Whyte 2001), com uma incidência na ordem de 1 por 2.500 nascimentos em Menonitas Canadianos (Greenberg, 1993) e de 1 em 100.000 nascimentos na população geral, para a forma mais grave da doença. As formas mais leves são mais prevalentes. Este "erro de metabolismo inato" é causado por uma ou mais mutações com perda de função no gene (*ALPL*), que codifica a isoenzima tecidual não específica da fosfatase alcalina (TNALP; também conhecida como ALP tipo fígado/osso/rim) (Weiss et al. 1988; Henthorn et al. 1992a; Henthorn et al. 1992b; Zurutuza et al. 1999; Millán 1995). A característica bioquímica é a atividade anormal de ALP no soro (hipofosfataseemia), a qual leva a níveis elevados de três substratos compostos fosfo: pirofosfato inorgânico ( $PP_i$ ), fosfoetanolamina (PEA) e piridoxal 5'-fosfato (PLP) no sangue e/ou urina (Whyte 1994).

A HPP apresenta uma gama impressionante de graus de gravidade, variando entre (mais grave para menos grave) perinatal, primeira infância, infância, adulto, e formas de

odontohipofosfatasia, classificadas historicamente de acordo com a idade no diagnóstico (Whyte 2001). Pode verificar-se ausência quase completa de mineralização óssea *in utero* com nado-morto, ou fraturas espontâneas e doença dentária ocorrendo apenas na idade adulta. A hipofosfatasia perinatal (letal) é expressa *in utero* e pode ser causa de nado-morto. Alguns recém-nascidos podem sobreviver vários dias, mas sofrem falhas respiratórias aumentadas devido à doença hipoplásica e raquítica do tórax. Em HPP pré-infantil, diagnosticada antes dos 6 meses de idade, o desenvolvimento após o nascimento parece normal até ao início de má alimentação, ganho de peso insuficiente, e aparecimento de raquitismo. A aparência radiológica é característica e apresenta mineralização esquelética enfraquecida, por vezes com desmineralização esquelética progressiva que leva a fraturas nas costelas e deformação do tórax. A hipofosfatasia infantil também apresenta uma expressão clínica muito variável. Perda prematura dos dentes decíduos resulta de aplasia, hipoplasia ou displasia do cemento dental que liga a raiz do dente ao ligamento periodontal. O raquitismo provoca estatura pequena e as deformidades esqueléticas podem incluir pernas arqueadas, aumento dos punhos, joelhos e tornozelos, como resultado de metáfise com aparência "flared". A HPP do adulto apresenta-se normalmente durante a meia-idade, embora haja frequentemente um passado de raquitismo e/ou perda precoce de dentes, seguida por um período saudável durante a adolescência e a primeira idade adulta. Fraturas de stress do metatarso recorrentes são comuns e a deposição de pirofosfato de cálcio dihidratado leva a ataques de artrite e artropatia por pirofosfato. A odontohipofosfatasia é diagnosticada quando a única anomalia clínica é doença dentária e estudos radiológicos e até biopsias ósseas não revelam qualquer sinal de raquitismo ou osteomalacia.

As formas clínicas graves de hipofosfatasia são normalmente herdadas como características autossômicas recessivas, com os pais destes doentes a apresentarem níveis anormalmente baixos de atividade de AP no soro (Whyte 2001). Para as formas menos graves de hipofosfatasia, ou seja, a forma adulta e odontohipofosfatasia, também foi documentado um padrão de hereditariedade autossômico dominante (Whyte 2001).

No esqueleto saudável, TNALP é uma ectoenzima presente na superfície da membrana plasmática de osteoblastos e condrócitos, incluindo nas membranas das suas vesículas da matriz sujeitas a rutura (MVs) (Ali et al. 1970; Bernard 1978) em que a enzima está particularmente enriquecida (Morris et al. 1992). A deposição de hidroxiapatite durante a mineralização óssea inicia-se normalmente no lúmen destas MVs (Anderson et al. 2005a). Microscopia eletrónica demonstrou que MVs deficientes em TNALP de doentes com HPP com sintomas graves e rato *Akp2<sup>-/-</sup>* (um modelo de rato deficiente para TNALP, ver a seguir) contêm cristais de hidroxiapatite, mas essa propagação de cristais extravascular parece retardada (Anderson 1997; Anderson 2004). Este defeito é atribuído à acumulação extracelular de PP<sub>i</sub>, um potente inibidor de calcificação (Meyer 1984), devido à deficiência na atividade de TNALP (Hessle et al. 2002; Harmey et al. 2004; Harmey et al. 2006).

Quando PP<sub>i</sub> está presente em concentrações próximas da fisiológica, na gama de 0,01-0,1 mM, tem a capacidade de estimular a mineralização em fémures de galinha em cultura de órgãos (Anderson e Reynolds 1973), e também por MVs de ratazana isolados (Anderson et al. 2005b), ao passo que em concentrações acima de 1 mM, PP<sub>i</sub> inibe a formação mineral

de fosfato de cálcio, pelo revestimento de cristais de hidroxiapatite, impedindo assim o crescimento de cristais de mineral, e auto-nucleação proliferativa. Por isso, PPI tem uma função fisiológica dupla; pode funcionar como um promotor da mineralização a baixas concentrações, mas também como um inibidor de mineralização a concentrações elevadas. Foi demonstrado que TNALP hidrolisa o inibidor de mineralização PPI, para facilitar a precipitação mineral e crescimento (Rezende et al. 1998). Estudos recentes usando ratos  $Akp2^{-/-}$  indicaram que a principal função de TNALP *in vivo* é restringir o tamanho do conjunto extracelular de PPI, para permitir mineralização esquelética apropriada (Hessle et al. 2002; Harmey et al. 2004).

A gravidade da hipofosfatasia é variável e modulada pela natureza da mutação em TNALP. Observou-se que todas as mutações missense na proximidade do local ativo da enzima, interface homodímero, domínio coroa, braço da extremidade amino e local de ligação de cálcio, afetam a atividade catalítica de TNALP (Zurutuza et al. 1999). Adicionalmente, observou-se que outras mutações missense, nonsense, frameshift e de alteração do local de splicing levam a proteínas mutantes aberrantes, ou defeitos de transporte intracelular que levam a atividade deficiente na superfície da célula. A variedade de mutações e o fato de a heterozigotia composta ser uma ocorrência comum em hipofosfatasia, também explicam a variedade na expressão e a penetrância incompleta frequentemente observadas nesta doença (Whyte 2001).

O progresso na forma humana da doença beneficia muito da existência do modelo animal de rato deficiente para TNALP ( $Akp2^{-/-}$ ). Estes ratos  $Akp2^{-/-}$  representam a HPP pré-infantil notavelmente bem, uma vez que eles nascem com um esqueleto

com mineralização normal, mas desenvolvem raquitismo aparente radiograficamente com cerca de 6 dias de idade, e morrem entre os dias 12-16, sofrendo de hipomineralização esquelética severa e episódios de apneia e convulsões epiléticas, atribuídas a alterações no metabolismo de PLP (vitamina B6) (Waymire et al. 1995; Narisawa et al. 1997; Fedde et al. 1999; Narisawa et al. 2001).

Demonstrou-se que algumas mutações no local ativo de TNALP afetam de forma diferente a capacidade da enzima para metabolizar PPI ou PLP (Di Mauro et al. 2002). PLP e PPI são ambos substratos naturais confirmados de TNALP e anomalias no metabolismo de PLP explicam as convulsões epiléticas observadas nos ratos  $Akp2^{-/-}$  (Waymire et al. 1995; Narisawa et al. 2001), ao passo que anomalias no metabolismo de PPI explicam o fenótipo esquelético neste modelo de hipofosfatasia em ratos (Hessle et al. 2002; Anderson et al. 2004; Harmey et al. 2004; Harmey et al. 2006; Anderson et al. 2005a).

Não existe nenhuma terapia médica estabelecida para HPP. Relatórios de casos de terapia de substituição enzimática (E.R.T.) usando infusões intravenosas (i.v.) de plasma rico em TNALP de doentes com doença de Paget do osso e ALP de placenta purificada, descrevem o insucesso da recuperação de crianças afetadas (Whyte et al 1982; Whyte et al 1984). Num outro estudo semelhante, Weninger et al. (Weninger et al. 1989) tentou ERT num menino que nasceu prematuramente com hipofosfatasia, severamente afetado, por infusões de TNALP de fígado humano purificado. O tratamento (1,2 IU/kg/min) começou com a idade de três semanas e foi repetido em intervalos semanais até às 10 semanas de idade, quando a criança morreu. Amostras de TNALP foram diluídas com 10 mL de solução salina fisiológica e administrados por

infusão ao longo de 30 minutos, via um cateter umbilical arterial. Não foram observados quaisquer efeitos secundários tóxicos ou alérgicos. A atividade de TNALP no soro aumentou de 3 IU/L antes do tratamento para um nível máximo de 195 IU/L com um tempo de semivida entre 37 e 62 horas. Estudos radiográficos sequenciais não mostraram, contudo, melhoria na mineralização óssea (Weninger et al. 1989).

Parece que a atividade de ALP tem de ser aumentada não na circulação, mas no próprio esqueleto. Esta hipótese é suportada por respostas aparentemente benéficas de duas meninas com HPP pré-infantil, seguido de transplante de medula, em que as células contendo TNALP foram introduzidas em todo o esqueleto (Whyte et al. 2003). Assim, parece haver uma necessidade de fornecer TNALP ativo ao esqueleto destes doentes. Estudos recentes indicaram que as sequências de poliaspartato conferem propriedades de localização no osso à TNALP recombinante (WO 2005/103263 por Crine et al.; Nishioka et al. 2006). A WO 2005/103263 divulga agentes terapêuticos que incluem sALP ligada a D10 e a sua utilização em substituição enzimática em HPP.

Um estudo recente mostrou que a forma mutante de TNALP R450C (embora Nasu et al. se refira a uma mutação R433C, a sua numeração aplica-se à forma madura da proteína e não a uma compreendendo o péptido de sinalização), produz uma proteína com uma estrutura ligada por uma ponte dissulfito entre os resíduos cisteína na posição 450 de cada subunidade, o que inibiu fortemente a sua atividade de fosfatase alcalina. Nasu et al. conclui que a perda de função resulta da ponte dissulfito intercadeia, e é a base molecular da hipofosfatasia letal associada a R450C (Nasu et al. 2006).

A presente descrição refere-se a um número de documentos, o conteúdo dos quais é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

Dadas as limitações correntes na gestão clínica e tratamento de doentes com HPP, era necessário um tratamento alternativo e eficiente. Assim, a presente invenção fornece uma terapia de substituição enzimática eficaz para o tratamento de HPP.

Tanto quanto o requerente sabe, e por oposição a esforços anteriores de terapia de substituição enzimática, nos quais ratos deficientes para TNALP ou crianças com HPP, nos quais TNALP ou outras isoenzimas ALP foram administradas por via intravenosa, a presente invenção marca a primeira vez em que foi documentada a resolução quase completa de alterações clínicas radiográficas e alterações bioquímicas apenas com substituição enzimática.

### **sALP dirigida ao osso**

A composição dirigida ao osso da presente invenção compreende uma proteína de fusão incluindo, na ordem da extremidade amino para a extremidade carboxílica, uma sALP, um spacer, e um péptido para localização no osso carregado negativamente, em que o spacer compreende uma região de fragmento cristalizável (Fc) e o péptido é um poliaspartato ou poliglutamato W<sub>n</sub>, em que n = 10-16, e em que sA ALP consiste nos resíduos de aminoácidos 18-502 da Seq ID No. 8.

Existem quatro isoenzimas conhecidas de ALP, nomeadamente a fosfatase alcalina tecidual não específica descrita a seguir em maior detalhe, fosfatase alcalina da placenta (PALP) (por exemplo, [NP\_112603], [NP\_001623]), fosfatase alcalina das células germinativas (GCALP) (por exemplo, [P1D696]), e fosfatase alcalina intestinal (por exemplo, [NP\_001622]). Estas enzimas possuem estruturas tridimensionais muito semelhantes. Cada um dos seus locais catalíticos contém quatro domínios de ligação a metal para iões metálicos necessários à atividade enzimática, incluindo dois Zn e um Mg. Estas enzimas catalisam a hidrólise de monoésteres de ácido fosfórico e também catalisam uma reação de trans-fosforilação na presença de concentrações elevadas de aceitadores de fosfato. Foi demonstrado em particular que PALP é fisiologicamente ativa contra a fosfoetanolamina (PEA), pirofosfato inorgânico (PPi) e piridoxal 5'-fosfato (PLP), sendo os três substratos naturais conhecidos para TNALP (Whyte, 1995). Um alinhamento entre estas isoenzimas é apresentado na Figura 30.

### **TNALP**

Tal como indicado anteriormente, TNALP é uma proteína ligada à membrana ancorada através de um glicolípido na sua extremidade C-terminal (Swiss Prot, P05186). Esta âncora de glicolípido (GPI) é adicionada após a translação, depois da remoção de uma extremidade C-terminal hidrofóbica, a qual serve como âncora de membrana temporária e como sinal para a adição de GPI. Assim, a TNALP humana solúvel usada em todos os Exemplos seguintes é constituída por uma TNALP em que o primeiro aminoácido da sequência hidrofóbica da extremidade C-terminal, nomeadamente alanina, é substituído por um codão stop. Esta TNALP solúvel (aqui denominada

sTNALP) assim formada contém todos os aminoácidos da forma nativa ancorada de TNALP necessária para a formação do local catalítico, mas não tem a âncora de membrana GPI. TNALP, conhecidas incluem a TNALP humana [NP\_000469, AAI10910, AAH90861, AAH66116, AAH21289, AAI26166]; TNALP rhesus [XP-001109717], TNALP de ratazana [NP\_037191]; TNALP de cão [AAF64516], TNALP de porco [AAN64273]; TNALP de rato [NP\_031457], TNALP bovina [NP\_789828, NP\_776412, AAI18209, AAC33858] e TNALP de gato [NP\_001036028].

A composição dirigida ao osso divulgada inclui sequências que satisfazem uma sequência consenso derivada do domínio extracelular de ALP de isoenzimas ALP humanas, e de TNALPs funcionais conhecidas (humana, rato, ratazana, bovina, gato e cão). Tal como aqui utilizado, pretende-se que a terminologia "domínio extracelular" se refira a qualquer porção extracelular da proteína nativa (ou seja, sem o péptido de sinalização). Foi demonstrado que as sTNALPs recombinantes que retêm os aminoácidos originais de 1 a 501 (18 a 501 quando secretada) (ver Oda et al., J. Biochem 126: 694-699, 1999), aminoácidos 1 a 504 (18 a 504 quando secretada) (Patente US 6,905,689 por Bernd et al.) e aminoácidos 1 a 505 (18-505 quando secretada) (US 2007/0081984 por Tomatsu et al.), são enzimaticamente ativas. Os Exemplos aqui apresentados também mostram que uma sTNALP recombinante retendo os aminoácidos 1 a 502 (18 a 502 quando secretada) (Figura 3) da TNALP original, é enzimaticamente ativa. Isto indica que os resíduos de aminoácidos podem ser removidos da extremidade C-terminal da proteína nativa, sem afetar a sua atividade enzimática. De acordo com a presente invenção, a fosfatase alcalina dirigida ao osso compreende uma sALP, em que sALP consiste nos resíduos de aminoácidos 18-502 da Seq ID No. 8.

A Tabela 1 a seguir fornece uma lista de 194 mutações que se sabe que causam HPP. É divulgado que nos polipéptidos dirigidos ao osso da presente invenção, a sequência de ALP não inclui nenhuma destas mutações.

Assim, nas sALPs divulgadas, usando a numeração de uma sequência consenso derivada de um alinhamento de várias TNALPs e de isoenzimas ALP humanas, o aminoácido na posição 22 não é um resíduo de fenilalanina; o aminoácido na posição 33 (posição 11 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de cisteína; o aminoácido na posição 38 (posição 16 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 42 (posição 20 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de prolina; o aminoácido na posição 45 (posição 23 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 56 (posição 34 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina ou um resíduo de valina; o aminoácido na posição 67 (posição 45 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina, isoleucina ou valina; o aminoácido na posição 68 (posição 46 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 73 (posição 51 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina; o aminoácido na posição 76 (posição 54 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de cisteína, serina, prolina ou histidina; o aminoácido na posição 77 (posição 55 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 80 (posição 58 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina; o aminoácido na posição 81 (posição 59 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de asparagina; o aminoácido

na posição 105 (posição 83 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina; o aminoácido na posição 113 (posição 89 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 116 (posição 94 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 117 (posição 95 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina; o aminoácido na posição 119 (posição 97 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de glicina; o aminoácido na posição 121 (posição 99 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina ou treonina; o aminoácido na posição 125 (posição 103 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina; o aminoácido na posição 128 (posição 106 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de aspartato; o aminoácido na posição 133 (posição 111 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina; o aminoácido na posição 134 (posição 112 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina; o aminoácido na posição 137 (posição 115 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina ou valina; o aminoácido na posição 139 (posição 117 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de histidina ou asparagina; o aminoácido na posição 141 (posição 119 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de histidina; o aminoácido na posição 153 (posição 131 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de alanina ou isoleucina; o aminoácido na posição 167 (posição 145 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina ou valina; o aminoácido na posição 172 (posição 150 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina; o aminoácido na posição 175 (posição 153 na sequência sem o

péptido de sinalização) não é um resíduo de aspartato; o aminoácido na posição 176 (posição 154 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de tirosina ou arginina; o aminoácido na posição 181 (posição 159 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 182 (posição 160 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 184 (posição 162 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 186 (posição 164 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 189 (posição 167 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de triptofano; o aminoácido na posição 194 (posição 172 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de glutamato; o aminoácido na posição 196 (posição 174 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de lisina ou glicina; o aminoácido na posição 197 (posição 175 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 198 (posição 176 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de alanina; o aminoácido na posição 206 (posição 184 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de tirosina; o aminoácido na posição 208 (posição 186 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de glutamato; o aminoácido na posição 207 (posição 190 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de prolina; o aminoácido na posição 216 (posição 194 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de aspartato; o aminoácido na posição 217 (posição 195 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de fenilalanina; o aminoácido na posição 223 (posição 201 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 225 (posição 203 na

sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina ou alanina; o aminoácido na posição 226 (posição 204 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 228 (posição 206 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de triptofano ou glutamina; o aminoácido na posição 229 (posição 207 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de glutamato; o aminoácido na posição 231 (posição 209 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 240 (posição 218 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de glicina; o aminoácido na posição 251 (posição 229 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina; o aminoácido na posição 254 (posição 232 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 269 (posição 247 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina; o aminoácido na posição 277 (posição 255 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de cisteína, leucina ou histidina; o aminoácido na posição 280 (posição 258 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de prolina; o aminoácido na posição 295 (posição 237 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de fenilalanina; o aminoácido na posição 297 (posição 275 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de lisina; o aminoácido na posição 298 (posição 276 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 300 (posição 278 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de tirosina ou alanina; o aminoácido na posição 301 (posição 279 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina, treonina ou isoleucina; o aminoácido na posição 303 (posição 281 na sequência sem o péptido de sinalização) não

é um resíduo de aspartato; o aminoácido na posição 304 (posição 282 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de lisina; o aminoácido na posição 305 (posição 283 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de prolina; o aminoácido na posição 312 (posição 290 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 313 (posição 291 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina ou leucina; o aminoácido na posição 317 (posição 295 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de lisina; o aminoácido na posição 332 (posição 310 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina; o aminoácido na posição 333 (posição 311 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de cisteína, glicina ou leucina; o aminoácido na posição 334 (posição 312 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 340 (posição 318 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de aspartato; o aminoácido na posição 345 (posição 323 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina ou glutamato; o aminoácido na posição 354 (posição 332 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 360 (posição 338 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de aspartato; o aminoácido na posição 361 (posição 339 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina ou isoleucina; o aminoácido na posição 377 (posição 355 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 380 (posição 358 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina; o aminoácido na posição 383 (posição 361 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 384 (posição 362 na

sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 387 (posição 365 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina; o aminoácido na posição 388 (posição 366 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 395 (posição 373 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 397 (posição 375 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de cisteína ou histidina; o aminoácido na posição 398 (posição 376 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de alanina; o aminoácido na posição 401 (posição 379 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 405 (posição 383 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina ou valina; o aminoácido na posição 406 (posição 384 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 412 (posição 390 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de glicina; o aminoácido na posição 416 (posição 394 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 417 (posição 395 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de alanina; o aminoácido na posição 420 (posição 398 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina; o aminoácido na posição 423 (posição 401 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina; o aminoácido na posição 426 (posição 404 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina; o aminoácido na posição 429 (posição 407 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de alanina; o aminoácido na posição 430 (posição 408 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina; o aminoácido na posição 432

(posição 410 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de cisteína ou aspartato; o aminoácido na posição 434 (posição 412 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de prolina; o aminoácido na posição 435 (posição 413 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de lisina; o aminoácido na posição 442 (posição 420 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de histidina; o aminoácido na posição 451 (posição 429 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de prolina; o aminoácido na posição 456 (posição 434 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de histidina ou cisteína; o aminoácido na posição 458 (posição 436 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de lisina; o aminoácido na posição 460 (posição 438 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina; o aminoácido na posição 461 (posição 439 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina ou aspartato; o aminoácido na posição 462 (posição 440 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de triptofano ou arginina; o aminoácido na posição 465 (posição 443 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina ou leucina; o aminoácido na posição 472 (posição 450 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 473 (posição 451 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 474 (posição 452 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 479 (posição 457 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina; o aminoácido na posição 482 (posição 460 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de lisina ou glicina; o aminoácido na posição 484 (posição 462 na sequência sem o

péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 495 (posição 473 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina; o aminoácido na posição 496 (posição 474 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de fenilalanina; o aminoácido na posição 497 (posição 475 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina.

Também é divulgado que, quando sTNALP é usada nas sALPs dirigidas ao osso da presente invenção, usando a numeração da sequência de TNALP humana, o aminoácido na posição 17 não é um resíduo de fenilalanina; o aminoácido na posição 28 (posição 11 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de cisteína; o aminoácido na posição 33 (posição 16 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 37 (posição 20 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de prolina; o aminoácido na posição 40 (posição 23 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 51 (posição 34 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina ou valina; o aminoácido na posição 62 (posição 45 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina, isoleucina ou valina; o aminoácido na posição 63 (posição 46 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 68 (posição 51 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina; o aminoácido na posição 71 (posição 54 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de cisteína, serina, prolina ou histidina; o aminoácido na posição 72 (posição 55 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 75 (posição 58 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina; o

aminoácido na posição 76 (posição 59 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de asparagina; o aminoácido na posição 100 (posição 83 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina; o aminoácido na posição 108 (posição 89 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 111 (posição 94 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 112 (posição 95 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina; o aminoácido na posição 114 (posição 97 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de glicina; o aminoácido na posição 116 (posição 99 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina ou treonina; o aminoácido na posição 120 (posição 103 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina; o aminoácido na posição 123 (posição 106 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de aspartato; o aminoácido na posição 128 (posição 111 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina; o aminoácido na posição 129 (posição 112 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina; o aminoácido na posição 132 (posição 115 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina ou valina; o aminoácido na posição 134 (posição 117 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de histidina ou asparagina; o aminoácido na posição 136 (posição 119 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de histidina; o aminoácido na posição 148 (posição 131 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de alanina ou isoleucina; o aminoácido na posição 162 (posição 145 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina ou valina; o aminoácido na posição 167 (posição 150 na sequência sem o

péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina; o aminoácido na posição 170 (posição 153 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de aspartato; o aminoácido na posição 171 (posição 154 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de tirosina ou arginina; o aminoácido na posição 176 (posição 159 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 177 (posição 160 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 179 (posição 162 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 181 (posição 164 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 184 (posição 167 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de triptofano; o aminoácido na posição 189 (posição 172 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de glutamato; o aminoácido na posição 191 (posição 174 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de lisina ou glicina; o aminoácido na posição 192 (posição 175 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 193 (posição 176 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de alanina; o aminoácido na posição 201 (posição 184 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de tirosina; o aminoácido na posição 203 (posição 186 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de glutamato; o aminoácido na posição 207 (posição 190 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de prolina; o aminoácido na posição 211 (posição 194 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de aspartato; o aminoácido na posição 212 (posição 195 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de fenilalanina; o aminoácido na posição 218 (posição 201 na

sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 220 (posição 203 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina ou alanina; o aminoácido na posição 221 (posição 204 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 223 (posição 206 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de triptofano ou glutamina; o aminoácido na posição 224 (posição 207 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de glutamato; o aminoácido na posição 226 (posição 209 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 235 (posição 218 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de glicina; o aminoácido na posição 246 (posição 229 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina; o aminoácido na posição 249 (posição 232 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 264 (posição 247 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina; o aminoácido na posição 272 (posição 255 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de cisteína, leucina ou histidina; o aminoácido na posição 275 (posição 258 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de prolina; o aminoácido na posição 289 (posição 272 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de fenilalanina; o aminoácido na posição 291 (posição 274 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de lisina; o aminoácido na posição 292 (posição 275 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 294 (posição 277 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de tirosina ou alanina; o aminoácido na posição 295 (posição 278 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de

valina, treonina ou isoleucina; o aminoácido na posição 297 (posição 280 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de aspartato; o aminoácido na posição 298 (posição 281 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de lisina; o aminoácido na posição 299 (posição 282 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de prolina; o aminoácido na posição 306 (posição 289 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 307 (posição 290 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina ou leucina; o aminoácido na posição 311 (posição 294 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de lisina; o aminoácido na posição 326 (posição 309 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina; o aminoácido na posição 327 (posição 310 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de cisteína, glicina ou leucina; o aminoácido na posição 328 (posição 311 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 334 (posição 317 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de aspartato; o aminoácido na posição 339 (posição 322 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina ou glutamato; o aminoácido na posição 348 (posição 331 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 354 (posição 337 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de aspartato; o aminoácido na posição 355 (posição 338 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina ou isoleucina; o aminoácido na posição 371 (posição 354 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 374 (posição 357 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina; o aminoácido na posição 377 (posição 360 na

sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 378 (posição 361 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de valina; o aminoácido na posição 381 (posição 364 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina; o aminoácido na posição 382 (posição 365 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 389 (posição 372 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 391 (posição 374 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de cisteína ou histidina; o aminoácido na posição 392 (posição 375 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de alanina; o aminoácido na posição 395 (posição 378 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 399 (posição 382 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina ou valina; o aminoácido na posição 400 (posição 383 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 406 (posição 389 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de glicina; o aminoácido na posição 410 (posição 393 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 411 (posição 394 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de alanina; o aminoácido na posição 414 (posição 397 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina; o aminoácido na posição 417 (posição 400 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina; o aminoácido na posição 420 (posição 403 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina; o aminoácido na posição 423 (posição 406 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de alanina; o aminoácido na posição 424

(posição 407 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina; o aminoácido na posição 426 (posição 409 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de cisteína ou aspartato; o aminoácido na posição 428 (posição 411 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de prolina; o aminoácido na posição 429 (posição 412 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de lisina; o aminoácido na posição 436 (posição 419 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de histidina; o aminoácido na posição 445 (posição 428 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de prolina; o aminoácido na posição 450 (posição 433 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de histidina ou cisteína; o aminoácido na posição 452 (posição 435 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de lisina; o aminoácido na posição 454 (posição 437 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina; o aminoácido na posição 455 (posição 438 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina ou aspartato; o aminoácido na posição 456 (posição 439 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de triptofano ou arginina; o aminoácido na posição 459 (posição 442 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de metionina ou leucina; o aminoácido na posição 466 (posição 449 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 467 (posição 450 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 468 (posição 451 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de treonina; o aminoácido na posição 473 (posição 456 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina; o aminoácido na posição 476 (posição 459 na sequência sem o péptido de

sinalização) não é um resíduo de lisina ou glicina; o aminoácido na posição 478 (posição 461 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de leucina; o aminoácido na posição 489 (posição 472 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de serina; o aminoácido na posição 490 (posição 473 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de fenilalanina; o aminoácido na posição 491 (posição 474 na sequência sem o péptido de sinalização) não é um resíduo de arginina. Também é divulgado que, um ou mais Xs são definidos como sendo qualquer um dos aminoácidos encontrados nesta posição nas sequências de alinhamento ou um resíduo que constitui uma substituição conservada ou semiconservada de qualquer um destes aminoácidos. É ainda divulgado que os Xs são definidos como sendo qualquer um dos aminoácidos de um dos aminoácidos encontrados nesta posição nas sequências do alinhamento. Por exemplo, o resíduo de aminoácido na posição 51 (posição 34 na sequência sem péptido de sinalização) é um resíduo de alanina ou valina; o resíduo de aminoácido na posição 177 (posição 160 na sequência sem péptido de sinalização) é um resíduo de alanina ou serina; o resíduo de aminoácido na posição 212 (posição 195 na sequência sem péptido de sinalização) é um resíduo de isoleucina ou valina; o resíduo de aminoácido na posição 291 (posição 274 na sequência sem péptido de sinalização) é um resíduo de ácido glutâmico ou ácido aspártico; e o resíduo de aminoácido na posição 374 (posição 357 na sequência sem péptido de sinalização) é um resíduo de valina ou isoleucina.

É ainda divulgado que o fragmento sALP na proteína de fusão dirigida ao osso, consiste em qualquer um dos fragmentos de uma sequência consenso derivada de um alinhamento de isoenzimas ALP humanas e TNALPs de várias espécies de

mamíferos, correspondendo aos resíduos de aminoácidos 18-498, 18-499, 18-500, 18-501, 18-502, 18-503, 18-504 ou 18 a 505 da TNALP humana. Estes fragmentos consenso são resíduos de aminoácidos 23 a 508, 23 a 509, 23 a 510, 23 a 511, 23 a 512, 23 a 513, 23 a 514 e 23 a 515 da SEQ ID NO: 15, respetivamente. Nestes fragmentos consenso, X é um aminoácido qualquer, exceto um aminoácido correspondendo a uma mutação patogénica na posição da TNALP humana como indicado na Tabela 1. É ainda divulgado que estes fragmentos consenso são resíduos de aminoácidos 23 a 508, 23 a 509, 23 a 510, 23 a 511, 23 a 512, 23 a 513, 23 a 514 e 23 a 515 da SEQ ID NO: 18, respetivamente. Nestes fragmentos consenso, X é um aminoácido encontrado naquela posição na ALP de cada uma das espécies de isoenzimas ALP humanas do alinhamento do qual o consenso foi derivado, mas não é um aminoácido correspondendo a uma mutação patogénica naquela posição da TNALP humana, tal como indicado na Tabela 1 (ver Figura 30).

É ainda divulgado que o fragmento sALP na proteína de fusão dirigida ao osso da presente invenção, consiste em qualquer um dos fragmentos de uma sequência consenso derivada de um alinhamento de TNALPs de várias espécies de mamíferos, correspondendo aos resíduos de aminoácidos 18-498, 18-499, 18-500, 18-501, 18-502, 18-503, 18-504 e 18 a 505 de TNALP humana. Estes fragmentos consenso são resíduos de aminoácidos 18-498, 18-499, 18-500, 18-501, 18-502, 18-503, 18-504 e 18 a 505 da SEQ ID NO: 16, respetivamente. Nestes fragmentos consenso, X é um aminoácido qualquer, exceto um aminoácido correspondendo a uma mutação patogénica naquela posição da TNALP humana, tal como indicado na Tabela 1. É ainda divulgado que estes fragmentos consenso são resíduos de aminoácidos 18-498, 18-499, 18-500, 18-501, 18-502, 18-503, 18-504 e 18 a 505 da SEQ ID NO: 19, respetivamente.

Nestes fragmentos consenso, X é um aminoácido qualquer encontrado naquela posição na TNALP de cada uma das espécies do alinhamento, do qual o consenso é derivado, mas não é um aminoácido correspondendo a uma mutação patogénica naquela posição da TNALP humana, tal como indicado na Tabela 1 (ver Figura 31).

Tabela 1: Mutações patogênicas na TPA1F humana

| Número total de mutações 188 |                   |                                |                            |                          |                         |                    |                 |         |                    |
|------------------------------|-------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------|---------|--------------------|
| Exão                         | Alteração de base | Alteração de aminoácido        |                            | Referência               | Forma clínica no doente | Genótipo do doente | % Tipo selvagem | E. coli |                    |
|                              |                   | Nomenclatura não standardizada | Nomenclatura standardizada |                          |                         |                    |                 |         |                    |
| 1                            | c.-195C>T         |                                |                            | Taillandier et al. 2000  | peri-natal              | C-195C>T/C184 Y    |                 | na      | Mutação silenciosa |
| 2                            | c.17T>A           | L-12K                          | P-16K                      | Taillandier et al. 2000  | infantil                | L-12X/?            |                 | na      | Mutação silenciosa |
| 2                            | c.50C>T           | S-1F                           | P-817F                     | Mornet et al. 1998       | Pré-infantil            | S-1F/G38S          | 19.0            | 1       | I                  |
| 3                            | c.83A>G           | Y11C                           | P-728C                     | Taillandier et al. 2001  | Pré-infantil            | Y11C/R119H         | 7.2             | 2       |                    |
| 3                            | c.98C>T           | A16V                           | P-233V                     | Henthorn et al. 1992     | infantil                | A16V/Y419H         |                 | -       |                    |
| 3                            | c.110T>C          | L20P                           | P-137P                     | Verzeilles Lab oct. 2003 | peri-natal              | L20P/L20P          |                 | +       |                    |
| 3                            | c.119C>T          | A23V                           | P-440V                     | et al. 1998              | peri-natal              | A23V/G456S         | 2.3             | 1       |                    |
| 3                            | c.132C>T          | Q27X                           | P-Q44X                     | Mornet Z, não publicado  | peri-natal              | Q27X/c.662in       |                 | na      | Mutação silenciosa |
| 3                            | c.151G>T          | A34S                           | P-A51S                     | Munn et al. 2002         | Pré-infantil            | A34S/T117H         |                 | +       |                    |
| 3                            | c.152G>T          | A34V                           | P-A51V                     | Taillandier et al. 2001  | Pré-infantil            | A34V/V442M         |                 | +       |                    |
| 4                            | c.184A>T          | M45L                           | P-M62L                     | Taillandier et al. 1999  | Pré-infantil            | M45L/c.1172d       | 27.4            | 1       |                    |
| 4                            | c.184A>G          | M45V                           | P-M62V                     | Spentchian et al. 2003   | Pré-infantil            | M45V/M45V          |                 | +       |                    |

## (Continuação)

| 1    | c.-196C>T  |      |             | Taillandier et al. 2000 | peri-natal   | C.-196C>T/c184 Y       |     | na | data o local de início da transcrição                   |
|------|------------|------|-------------|-------------------------|--------------|------------------------|-----|----|---------------------------------------------------------|
| 4    | c.186G>C   | M451 | P.M6211     | Taillandier et al. 2000 | infantil     | M451/E174K             | 0   | 15 | +                                                       |
| 4    | c.187G>C   | G46R | I p. G63R   | Spentchian et al. 2003  | pré-infantil | G46R/G46R              |     | +  |                                                         |
| 4    | c.188G>T   | G46V | P. G63V     | Lia-Baldini et al. 2001 | pré-infantil | G46V/N                 | 0.8 | 3  | +                                                       |
| 4    | c.208C>T   | T61M | P. T68M (1) | Crino et al. 2002       | I infantil   | T61M/A160T             | 6.2 | 4  | +                                                       |
| 4    | c.211C>T   | R54C | P. R71C     | et al. 1992             | pré-infantil | R54C/D277A             | 0   | 17 | +                                                       |
| 4    | c.211C>A   | R54S | P. R71S     | Crino et al. 2002       | infantil     | R54S/?                 | 2.9 | 4  | +                                                       |
| 4    | c.212G>C   | R54P | P. R71P     | Henthorn et al. 1992    | peri-natal   | R54P/Q190P             |     | +  |                                                         |
| 4    | c.212G>A   | R54H | P. R71H     | Taillandier et al. 2001 | peri-natal   | R23V/R54H              |     | +  |                                                         |
| 4    | c.219T>C   | I65T | P. I72T     | Versaille s lab oct.    | 2004 odonto  | I65T/N                 |     | -  |                                                         |
| 4    | c.223G>A   | G58S | P. G71S     | Mornet et al. 1998      | pré-infantil | S-1P/G58S              | 3.5 | 1  | +                                                       |
| 4    | c.227A>G   | Q69R | P. Q76R     | Mornet et al. 2001      | pré-infantil | Q69R/T117N             |     | -  |                                                         |
| IVS4 | c.298-2A>G |      |             | Taillandier et al. 2000 | peri-natal   | c.298-2A>G/c.997+3 A>C |     | na | data mutação afetando a sequência da região codificante |
| S    | c.299C>T   | T83M | P. T100M    | Mornet et al. 2001      | pré-infantil | S3M/E174K              |     | +  |                                                         |

## (Continuação)

|   |                         |            |                     |  |                                            |                  |                                       |     |            |    |                                                 |
|---|-------------------------|------------|---------------------|--|--------------------------------------------|------------------|---------------------------------------|-----|------------|----|-------------------------------------------------|
| 1 | c.-196C>T               |            |                     |  | Taillandier et al.<br>2003                 | peri-natal       | C.-<br>196C>T/C184 Y                  |     |            | na | Ateta o<br>local de<br>início da<br>transcrição |
| 5 | c.303_311del            | N85_N87del | P.N102 N<br>104del_ |  | Versaille<br>s Lab Jul<br>2007             | peri-natal       | c.303_311del/<br>G474R                |     |            | na | Deleção                                         |
| 5 | c.323C>T                | P31L       | P.P108L             |  | HERASSE<br>et al.<br>2003                  | odonto           | P31L/N                                | 0.4 | ráp<br>pub | -  |                                                 |
| 5 | c.331G>A                | A34T       | P.A111T             |  | Goesskl-<br>Sonne et<br>al. 1998<br>et al. | odonto           | A34T/?                                |     |            | +  |                                                 |
| 5 | c.334G>A                | G33S       | P.G112S             |  | Witters<br>et al.<br>2004                  | pré-<br>infantil | G33S/G374C                            |     |            | -  |                                                 |
| 5 | c.340G>A                | A37T       | P.A114T             |  | Munn et<br>al. 2001                        | pré-<br>infantil | A37T/G277A                            |     |            | +  |                                                 |
| 5 | c.341C>G                | A37G       | P.A114G             |  | Drequet<br>et al.<br>2004                  | peri-natal       | A37G+C.348<br>349insAACGT C<br>/G303R |     |            | +  |                                                 |
| 5 | c.343_349ins<br>A CCGTC |            |                     |  | Drequet<br>et al.<br>2004                  | peri-natal       | A37G+C.348<br>349insAACGT C<br>/G303R |     |            | na | Das<br>mutações<br>missense e<br>inserção       |
| 5 | c.346G>T                | A39S       | P.A116S             |  | Versaille<br>s Lab Jul<br>2007             | adulto           | A39S/M400S                            |     |            | +  |                                                 |
| 5 | c.346G>A                | A39T       | P.A116T             |  | Hu et al.<br>2000                          | adulto           | A39T/N                                | 0.8 | 3          | +  |                                                 |
| 5 | c.358G>A                | G103R      | P.G120R             |  | Mornet et<br>al. 1998                      | peri-natal       | G103R/G48+1<br>G>A                    |     |            | +  |                                                 |
| 5 | c.358C>A                | A106D      | P.A123D             |  | Spentchia<br>n et al.<br>2006              | perinatal        | A106D/G249_<br>H250del                |     |            | -  |                                                 |
| 5 | c.362G>A                | V111W      | P.V123W             |  | Munn et<br>al. 2002                        | peri-natal       | V111W/G206 W                          |     |            | -  |                                                 |
| 5 | c.365G>A                | G112R      | P.G123R             |  | Mornet et<br>al. 1998                      | peri-natal       | G112R/G474 R                          |     |            | +  |                                                 |

## (Continuação)

|   |                   |       |         |                                                                                 |                                 |                                |      |    |    |                                                 |
|---|-------------------|-------|---------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|------|----|----|-------------------------------------------------|
| 1 | c.-195C>T         |       |         | Taillandi<br>er et al.<br>2000                                                  | peri-natal                      | C.-<br>195C>T/C184 Y           |      |    | na | Ateta D<br>local de<br>início da<br>transcrição |
| 5 | c.388_391del<br>G |       |         | Spentchia<br>n et al.<br>2003<br>Spentchia<br>n et al.<br>2003 TIA<br>91delGTAA | peri-natal                      | E294K/388_3<br>E294K/388_3     |      |    | na | Mutação<br>frameshift                           |
| 5 | c.389delT         |       |         | Spentchia<br>n et al.<br>2003<br>Spentchia<br>n et al.<br>2003                  | peri-natal                      | c.389delT/c.3<br>c.389delT/c.3 |      |    | na | Mutação<br>frame-shift                          |
| 5 | c.392delG         |       |         | Munn et<br>al. 2002                                                             | peri-natal/<br>pré-<br>infantil | c.392delG/33                   |      |    | na | Frame-shift<br>Mutação                          |
| 5 | c.394G>A          | A115T | p.A132T | Versaille<br>s lab Jul<br>2008                                                  | adulto                          | A115T/T174K                    |      |    |    |                                                 |
| 5 | c.395C>T          | A115V | p.A132V | Maranabe<br>et al.<br>2001                                                      | adulto                          | A115V/?                        | 16.9 | 14 | -  |                                                 |
| 5 | c.400_401AC>      | T117H | p.T134H | Munn et<br>al. 2002                                                             | peri-natal                      | T117H/F310d<br>el              |      |    | -  |                                                 |
| 5 | c.401C>A          | T117N | p.T134N | Taillandi<br>er et al.<br>2000                                                  | peri-natal                      | T117N/T117N<br>20.5            |      | 5  | -  |                                                 |
| 5 | c.406C>T          | E119C | p.E136C | Versaille<br>s lab<br>Oct. 2003                                                 | cdonto                          | R119C/T119 H                   |      |    | -  |                                                 |
| 5 | c.407G>A          | E119H | p.E136H | Taillandi<br>er et al.<br>1995                                                  | pré-<br>infantil                | R119H/G145 V                   | 33.4 | 1  | -  |                                                 |
| 5 | c.442A>G          | T131A | p.T138A | Mithigard<br>et al.<br>2005                                                     | peri-natal                      | T131A/?                        |      |    | -  |                                                 |
| 5 | c.448C>T          | T131I | p.T138I | Spentchia<br>n et al.<br>2003                                                   | pré-<br>infantil                | T131I/G145S                    |      |    | -  |                                                 |
| 5 | c.480delT         |       |         | Versaille<br>s lab.<br>Jan. 2008                                                | peri-natal                      | c.480delT/32<br>08W            |      |    | na | Deleção                                         |

## (Continuação)

| 1 | C.-1950>T |       |         | Taillandier et al. 2000    | peri-natal   | C.-1950>T/C184 Y |      | na | Afeta o local de início da transcrição |
|---|-----------|-------|---------|----------------------------|--------------|------------------|------|----|----------------------------------------|
| 5 | C.484G>A  | G145S | P.G162S | Spentchia et al. 2003      | pré-infantil | T1311/G145S      |      | +  |                                        |
| 6 | C.486G>T  | G145V | P.G161V | Taillandier et al. 1999    | pré-infantil | 119H/G145 V      | 1.3  | +  |                                        |
| 6 | C.500C>T  | T150M | P.T167M | Versaille e Lab. oct. 2003 | pré-infantil | T150M/Z174K      | 0    | +  |                                        |
| 6 | C.508A>G  | N153D | P.N170D | Mornet et al. 1998         | peri-natal   | N153D/N153 D     | 0    | -  |                                        |
| 6 | C.511C>T  | H164Y | P.H171Y | Taillandier et al. 1999    | pré-infantil | H164Y/Z174K      | 2.1  | -  |                                        |
| 6 | C.512A>G  | H164R | P.H171R | Mornet Z. unpublished      | adulto       | H164R/Z174K      |      | -  |                                        |
| 6 | C.526G>A  | A159T | P.A176T | Taillandier et al. 2000    | infantil     | A159T/Z229S      | 45.4 | +  |                                        |
| 6 | C.529G>A  | A160T | P.A177T | Goekci-Sone et al. 1998    | adulto       | A160T/F310L      | 88.8 | -  |                                        |
| 6 | C.536G>A  | A162T | P.A179T | Wales et al. 1998          | peri-natal   | A162T/A162T      | 18   | +  |                                        |
| 6 | C.542C>T  | S164L | P.S181L | Lia-Baldini et al. 2001    | pré-infantil | S164L/del (ex1)  | 1.3  | -  |                                        |
| 6 | C.544delG |       |         | Taillandier et al. 1999    | peri-natal   | G232V/S44del     |      | na | Mutação frame-shift                    |
| 6 | C.550C>T  | A167W | P.A184W | Mornet et al. 1998         | peri-natal   | A167W/W253       | 0.6  | +  |                                        |
| 6 | C.567C>A  | E172E | P.D189E | Spentchia et al. 2003      | peri-natal   | D172E/E172E      |      | -  |                                        |

## (Continuação)

| i    | C.-195C>T      |         |              | Taillandier et al. 2000         | peri-natal      | C.-195C>T/C184 Y                |        | na | Afecta o local de início da transcrição |
|------|----------------|---------|--------------|---------------------------------|-----------------|---------------------------------|--------|----|-----------------------------------------|
| 5    | C.568_570del A | N173del | p.M190del    | Michigami et al. 2005 AC 173del | peri-natal      | c.1559delT/N                    |        | -  | Deleção de 1 a.a.                       |
| 6    | C.571S>A       | Z174K   | p.Z191K      | Renthorn et al. 1992            | pré-infantil    | Z174K/D361V                     | 88.0 1 | -  |                                         |
| 6    | C.572A>G       | Z174C   | p.Z191G 1998 | Gosaki-Sone et al.              | odonto          | Z174S/c.1559 delT               |        | -  |                                         |
| 6    | C.575T>C       | M175T   | p.M192T      | Versaille s lab Jul 2007        | pré-infantil    | M175T/Z234K                     |        | -  |                                         |
| 6    | C.577C>G       | P176A   | p.P193A      | Munn et al. 2002                | adulto          | A97T/P176A                      |        | +  |                                         |
| 6    | C.602G>A       | C184Y   | p.C201Y      | Taillandier et al. 1999         | C.-peri-natal   | 195C>T/C184 Y                   |        | -  |                                         |
| 6    | C.609C>G       | D186Z   | p.D203Z      | Versaille s lab oct. 2007       | 2004 Peri-natal | D186Z/D186Z                     |        | -  |                                         |
| 6    | C.620A>C       | Q190P   | p.Q207P      | Renthorn et al. 1992            | peri-natal      | Z54E/Q190P                      |        | +  |                                         |
| 6    | C.631A>G       | N194D   | p.N211D      | Taillandier et al. 2001         | pré-infantil    | Z59T/M194D                      |        | +  |                                         |
| 6    | C.634A>T       | I195F   | p.I212T      | Souka et al. 2002               | peri-natal      | I195T/Z337D                     |        | -  |                                         |
| IVS6 | C.648+1G>T     |         |              | Brun-Beath et al. 2005          | peri-natal      | C.648+1G>T/ Z277A               |        |    | Afecta o splicing                       |
| IVS6 | C.648+1G>A     |         |              | Marnett et al. 1998             | peri-natal      | G103A/c.648+1G>A                |        | na | Afecta o splicing                       |
| IVS6 | C.649-         |         |              | Versaille s lab Jul 2005        | peri-natal      | C.649-1_3delinsAA/c 1_3delinsAA |        |    | Mutação frame-shift                     |

## (Continuação)

| 1 | C.-198C>I   |       | Taillandi<br>er et al.<br>2000              | peri-natal       | C.-<br>198C>I/C184 Y     |      | na  | Afeta o<br>local da<br>início da<br>transcrição |
|---|-------------|-------|---------------------------------------------|------------------|--------------------------|------|-----|-------------------------------------------------|
| 7 | C.-663T>C   | I201T | P. I218T<br>Utech et<br>al. 2005<br>Contact | peri-natal       | I201T/R374C              | 3.7  | unp | -                                               |
| 7 | 659G>T      | G203V | P. G220V<br>Taillandi<br>er et al.<br>2001  | odonto           | E174K/G203V              |      | +   |                                                 |
| 7 | 659G>C      | G203A | P. G220A<br>Spentchia<br>n et al.<br>2003   | peri-natal       | G203A/G203               |      | +   |                                                 |
| 7 | 662ins>S    |       | Mornet E.<br>não<br>publicado               | peri-natal       | Q27X/662ins              |      | na  | Mutação<br>frame-shift                          |
| 7 | C.-662del>S |       | Spentchia<br>n et al.<br>2003               | peri-natal       | R255L/C.-662d            |      | na  | Mutação<br>frame-shift                          |
| 7 | C.-662G>T   | G204V | Versaille<br>s 198<br>oct. 2004             | peri-natal       | G204V/M338<br>G204V/M338 |      | +   |                                                 |
| 7 | C.-667C>T   | R206W | Mornet et<br>al. 1998                       | peri-natal       | R206W/?                  | 2.8  | 3   | -                                               |
| 7 | C.-668C>A   | R206Q | Morn et<br>al. 2002                         | peri-natal       | R206Q/deleção            |      | -   |                                                 |
| 7 | C.-670A>G   | R207E | Mochizuki<br>et al.<br>2000                 | pré-<br>infantil | R207E/G409C              | 40   | 15  | +                                               |
| 7 | C.-677T>C   | R209T | Baumgarten<br>er-Sigl<br>et al.<br>2007     | pré-<br>infantil | R209T/T354I              |      | -   |                                                 |
| 7 | C.-704A>G   | R218S | Taillandi<br>er et al.<br>2001              | adulto           | R218S/A382S              | 3.6  | 7   | +                                               |
| 7 | C.-738C>T   | R229S | Taillandi<br>er et al.<br>2000              | infantil         | A159T/R229S              | 4.4  | 5   | -                                               |
| 7 | C.-748G>T   | G232V | Fedde et<br>al. 1996                        | peri-natal       | G232V/N                  | 34.5 | 3   | +                                               |
| 7 | C.-971A>G   | R247R | Versaille<br>s 198<br>Jan. 2007             | peri-natal       | R247R/D361V              |      | -   |                                                 |

## (Continuação)

|      |               |              |          |                         |              |                       |     |    |                                         |
|------|---------------|--------------|----------|-------------------------|--------------|-----------------------|-----|----|-----------------------------------------|
| 1    | c.-195C>T     |              |          | Taillandier et al. 2000 | peri-natal   | C.-195C>T/C184 Y      |     | na | Afecta o local de início da transcrição |
| 8    | c.797_802del  | S249_H250del | p.S266_H | Spentchia et al. 2006   | peri-natal   | A106D/S249_H250del    |     |    | Deleção de 2 a.a.                       |
| 8    | c.809G>A      | W283X        | p.W270X  | Worner et al. 1998      | peri-natal   | R167W/W253            |     | na | Nonense Mutação                         |
| 8    | C.814C>T      | R255C        | p.R272C  | Spentchia et al. 2006   | peri-natal   | R255C/T117H           |     | -  |                                         |
| 8    | c.815G>T      | R255L        | p.R272L  | Spentchia et al. 2003   | peri-natal   | R255L/c.862d          |     | -  |                                         |
| 8    | c.818G>A      | R255H        | p.R272H  | Brun-Heath et al. 2005  | Pré-infantil | R255H/R255 H          | 6.8 | 16 |                                         |
| 8    | c.824T>C      | L258F        | p.L275F  | Oximp et al. 2002       | infantil     | L258F/A160T           | 9.3 | 4  |                                         |
| 8    | c.853_854insG | Y268X        | p.Y285X  | Machigami et al. 2006   | peri-natal   | c1559delT/Y268X       |     | na | Mutação nonense                         |
| IVS8 | c.863+5G>A    |              |          | Taillandier et al. 1999 | Pré-infantil | c.862+8G>A/c.862+5G>A |     | na | Afecta o splicing                       |
| 9    | c.866C>T      | L272F        | p.L289F  | Sugimoto et al. 1998    | Pré-infantil | L272F/?               | 5.0 | 8  |                                         |
| 9    | c.871G>A      | Z274K        | p.Z291K  | Worner et al. 1998      | Pré-infantil | Z174K/Z274K           | 8.9 | 1  |                                         |
| 9    | c.871G>T      | Z274K        | p.Z291K  | Taillandier et al. 2000 | peri-natal   | A94T/Z274K            |     | -  | Mutação nonense                         |
| 9    | c.874C>A      | P275T        | p.P292T  | Brun-Heath et al. 2003  | Pré-infantil | P275T/A16V            | 4.0 | 16 |                                         |
| 9    | c.876_881delA | G276_P277del |          | Spentchia et al. 2003   | peri-natal   | e1/c.962delG          |     | na |                                         |

## (Continuação)

|   |                    |       |         |                                |                       |                            |        |    |                                                 |
|---|--------------------|-------|---------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|--------|----|-------------------------------------------------|
| 1 | c.-195C>T          |       |         | Taillandi<br>er et al.<br>2000 | peri-natal            | C.-<br>195C>T/C184 Y       |        | na | Afeta o<br>local de<br>início da<br>transcrição |
| 9 | c.880G>T           | D277Y | P.D294Y | Taillandi<br>er et al.<br>2001 | pré-<br>infantil      | M159T/D277Y                |        | -  |                                                 |
| 9 | c.881A>C           | D277A | P.D294A | Henthorn<br>et al.<br>1992     | pré-<br>infantil      | S54C/D277A                 | 0 17   | -  |                                                 |
| 9 | c.883A>G           | M278V | P.M295V | Wernet et<br>al. 2001          | infantil              | E174K/M278V                |        | -  |                                                 |
| 9 | c.884T>C           | M278I | P.M295I | Brun-<br>Heath et<br>al. 2005  | peri-natal            | M278I/S206                 | 8.5 16 | -  |                                                 |
| 9 | c.885G>A           | M278I | P.M295I | Michigami<br>et al.<br>2005    | peri-natal            | M278I/c.1539<br>delT       |        | -  |                                                 |
| 9 | c.889T>G           | Y280D | P.Y297D | Brun-<br>Heath et<br>al. 2005  | infantil              | P119H/Y280D                | 1.3 16 | -  |                                                 |
| 9 | c.893G>A           | Z281K | P.Z298K | Orino et<br>al. 1994           | pré-<br>infantil      | Z281K/1559d                |        | -  |                                                 |
| 9 | c.896T>C           | L282F | P.L299P | Versaille<br>s lab<br>oct.     | 2003 pré-<br>infantil | L282P/L282F                | 9.7 15 | -  |                                                 |
| 9 | c.917A>T           | D289V | P.D306V | Taillandi<br>er et al.<br>1999 | pré-<br>infantil      | D289V/D289V                | 0 12   | -  |                                                 |
| 9 | c.919C>T           | P290S | P.P307S | Versaille<br>s lab<br>oct.     | 2004 pré-<br>infantil | P290S/M450I                |        | +  |                                                 |
| 9 | c.920C>T           | P290L | P.P307L | Versaille<br>s lab<br>jul.     | 2006<br>infantil      | P290L/S164L                |        |    |                                                 |
| 9 | c.928_929del<br>TC |       |         | Brun-<br>Heath et<br>al. 2005  | peri-natal            | T394A/c.928_<br>929delTC   |        |    | Mutação<br>frame-shift                          |
| 9 | c.931G>A           | Z294K | P.Z311Z | Spentchia<br>n et al.<br>2003  | peri-natal            | Z294K/c.328<br>331delGTA-  |        |    |                                                 |
| 9 | c.962delG          |       |         | Spentchia<br>n et al.<br>2003  | peri-natal            | G276_D277d<br>el/c.962delG |        | na | Mutação<br>frame-shift                          |

## (Continuação)

|      |                      |         |           |                                 |                         |                                          |     |    |                                                  |
|------|----------------------|---------|-----------|---------------------------------|-------------------------|------------------------------------------|-----|----|--------------------------------------------------|
| 1    | c.-196C>T            |         |           | Taillandi<br>er et al.<br>2000  | peri-natal              | C.-<br>196C>T/C184 Y                     |     | na | Afasta o<br>local de<br>início da<br>transcrição |
| 9    | c.578G>C             | G309R   | P.G326R   | Litmanová<br>et al.<br>2002     | peri-natal              | G309R/E274K                              |     | +  |                                                  |
| 9    | c.981_983del<br>C TT | F310del | P.F327del | Crimp et<br>al. 1997<br>9delT   | pré-<br>infantil        | F310del/c.155                            | -10 | 15 | Amino-ácido<br>Deleção                           |
| 9    | c.979T>G             | F310C   | P.F327C   | Mornet et<br>al. 2001           | peri-natal              | (T117M/F310C                             |     | +  |                                                  |
| 9    | c.979_980TT<br>GG    | F310G   | P.F327G   | Taillandi<br>er et al.<br>2001  | adulto                  | E174K/F310G                              |     | +  |                                                  |
| 9    | c.979T>C             | F310L   | P.F327L   | Caoco et<br>al. 1996            | pré-<br>infantil        | F310/G439K                               | 72  | 9  |                                                  |
| 9    | c.982T>A             | F311L   | P.F328L   | Michigami<br>et al.<br>2005     | peri-natal<br>não lesal | F311L/T33M                               | -10 | 15 |                                                  |
| IVS9 | c.997+2T>A           |         |           | Taillandi<br>er et al.<br>2000  | peri-natal              | c.997+2T>A/C<br>472S                     |     | na | Afasta o<br>splicing                             |
| IVS9 | c.997+2T>G           |         |           | Brum-<br>Heath et<br>al. 2005   | peri-natal              | c.997+2T>G/c<br>c.997+2T>G/c<br>997+2T>G |     |    | Afasta o<br>splicing                             |
| IVS9 | c.997+3A>C           |         |           | Mornet et<br>al. 1998           | peri-natal              | c.997+3A>C/c<br>997+3A>C                 |     | na | Afasta o<br>splicing                             |
| IVS9 | c.998-1G>T           |         |           | Taillandi<br>er et al.<br>2001  | peri-natal              | E174K/c.998-<br>1G>T                     |     | na | Afasta o<br>splicing                             |
| 10   | c.1001G>A            | G317D   | P.G334D   | Greenberg<br>et al.<br>1993     | peri-natal              | E317D/G317D                              | 0   | 10 |                                                  |
| 10   | c.1015G>A            | G322R   | P.G339R   | Munn et<br>al. 2002             | peri-natal              | G322R/A159T                              |     | -  |                                                  |
| 10   | c.1015G>A            | G322E   | P.G339E   | Versaille<br>s lab<br>oct. 2004 | pré-<br>infantil        | G322E/V111 W                             |     | -  |                                                  |

## (Continuação)

| 1  | C.-195C>T              |              |                    | Taillandi<br>ex et al.<br>2000           | Seri-natal       | C.-<br>195C>T/C184 Y         |      | na | Ata o<br>local de<br>início da<br>transcrição |
|----|------------------------|--------------|--------------------|------------------------------------------|------------------|------------------------------|------|----|-----------------------------------------------|
| 10 | C.1042G>A              | A331T        | P.A342T            | Taillandi<br>ex et al.<br>2000           | Pré-<br>Infantil | E174K/A331T                  | 39.2 | 5  | -                                             |
| 10 | C.1044_1055d<br>e 1    | L332_A335del | P.L349_A3<br>52del | Spentchia<br>n et al.<br>2006            | peri-natal       | L332_A335del<br>/G47R        |      |    | Deleção de<br>4 a.á.                          |
| 10 | C.1062G>C              | E337D        | P.E354D            | Spuka et<br>al. 2002                     | peri-natal       | I195F/E337D                  |      | +  |                                               |
| 10 | C.1064A>C              | M338T        | P.M355T            | Versaille<br>e lab.<br>Oct. 2004         | peri-natal       | G204V/M338 T                 |      | -  |                                               |
| 10 | C.1065G>A              | M338I        | P.M355I            | Versaille<br>s lab.<br>Jan. 2008         | Pré-<br>Infantil | M338I/E374C                  |      | -  |                                               |
| 10 | C.1101_1103d<br>e 1CTC | S361del      | P.S358del          | Versaille<br>s lab.<br>Oct. 2004         | peri-natal       | C.1101_1103d<br>e 1CTC/T372I |      |    | Deleção de<br>1 a.á.                          |
| 10 | C.1112C>T              | T354I        | P.T371I            | Zaumgarten<br>ex-Silgi<br>et al.<br>2007 | Pré-<br>Infantil | M209I/T354I                  |      | -  |                                               |
| 10 | C.1120G>A              | V357M        | P.V374M            | Versaille<br>e lab<br>Oct. 2004          | adulto           | V357M/E281K                  |      | +  |                                               |
| 10 | C.1130C>T              | A360V        | P.A377V            | Moznet et<br>al. 2001                    | peri-natal       | A360V/A360V                  |      | +  |                                               |
| 10 | C.1139A>T              | D361V        | P.D378V            | Hemhorn<br>et al.<br>1992                | Pré-<br>Infantil | E174Z/D361V                  | 1.2  | 3  | +                                             |
| 10 | C.1142A>G              | H364R        | P.H361 R           | Taillandi<br>ex et al.<br>2000           | Pré-<br>Infantil | A23V/H364R                   |      | +  |                                               |
| 10 | C.1144G>A              | V365I        | P.V382I            | Goseki-<br>Tome et<br>al. 1998           | infantil         | F310L/V365I                  | 0    | 11 | +                                             |
| 10 | C.1166C>T              | T372I        | P.T389I            | Versaille<br>s lab<br>Oct. 2004          | Pré-<br>Infantil | T372I/S361<br>del            |      | -  |                                               |

## (Continuação)

|    | c.-1960>T            |       |         | Taillandier et al. 2000    | peri-natal      | C.-1960>T/C184 Y        |      | na | Refeto local de início da transcrição |
|----|----------------------|-------|---------|----------------------------|-----------------|-------------------------|------|----|---------------------------------------|
| 10 | c.11710>T            | R374C | P.R391C | Zurutuza et al. 1999       | infantil        | E174K/R374C             | 10.3 | 1  | -                                     |
| 9  | c.11720>A            | R374H | P.R391H | Quirino et al. 2002        | infantil        | R374H/?                 | 3.7  | 4  | -                                     |
| 10 | c.1172delC           |       |         | Taillandier et al. 1999    | pré-infantil    | M45L/c.1172delC         |      |    | Mutação frameshift                    |
| 10 | c.11780>C            | G378A | P.G392A | Versaille s lab. Jan. 2008 | peri-natal      | S378A/R119 C            |      |    | -                                     |
| 10 | c.1182T>C            | I378I | P.I398I | Versaille s lab. Jul.      | 2006 peri-natal | I378I/E174K             |      |    |                                       |
| 11 | c.11960>T            | A382S | P.A398S | Taillandier et al. 2001    | adulto          | E218G/A382S             |      |    | -                                     |
| 11 | c.11960>T            | A382V | P.A398V | Spentchian et al. 2006     | adulto          | A382V/A16V              |      |    | -                                     |
|    | 11 c.1199C>T         | F383L | P.F400L | Spentchian et al. 2006     | pré-infantil    | F383L/F383L             |      |    | +                                     |
| 11 | c.1214_1215delICA    |       |         | Versaille s lab. Jul. 2006 | adulto          | c.1214_1215delICA/E174K |      |    | Mutação frameshift                    |
|    | 11 c.1216_1219delICA |       |         | Brun-Heath et al.          | 2005 peri-natal | c.1216_1219delICA/?     |      |    |                                       |
| 11 | c.1217A>G            | D389G | P.D406G | Taillandier et al. 2000    | odonto.         | D389G/R433 H            | 14.9 | 5  | +                                     |
| 11 | c.1228T>C            | F393L | P.F410L | Versaille s lab. Dec. 2004 | pré-infantil    | F393L/E174K             |      |    | -                                     |
| 11 | c.1231A>G            | T394A | P.T411A | Brun-Heath et al. 2005     | peri-natal      | T394A/c.926_927delTC    | 0.3  | 16 | -                                     |

## (Continuação)

|    |            |       |          |                            |              |                  |      |      |                                        |
|----|------------|-------|----------|----------------------------|--------------|------------------|------|------|----------------------------------------|
| 1  | c.195>I    |       |          | Taillandier et al. 2000    | peri-natal   | C.195>I/C194 Y   |      | na   | Azeta O local de início da transcrição |
| 11 | c.1240>A   | L397M | p.L1414M | Mum et al. 2002            | peri-natal   | L397M/D277A      |      | -    |                                        |
| 11 | c.1250>G   | N400S | p.N417S  | Sargi et al. 2001          | peri-natal   | N400S/c.648+1G>A | 3    | unp. |                                        |
| 11 | c.1256delC |       |          | Taillandier et al. 2000    | peri-natal   | c.1256delC/?     |      | na   | Mutação frameshift                     |
| 11 | c.1258>A   | G403S | p.G420S  | Glaser et al. 2004         | peri-natal   | G403/G403S       | 0.4  | unp. |                                        |
| 11 | c.1268T>C  | V406A | p.V423A  | Taillandier et al. 2001    | peri-natal   | A39T/V406A       | 15.7 | 2    |                                        |
| 11 | c.1270>A   | V407M | p.V424M  | Versailles s lab Jan. 2007 | adulto       | V407MN407M       |      | -    |                                        |
| 11 | c.1276>T   | G409C | p.G426C  | Mochizuki et al. 2000      | pré-infantil | R207A/G409C 18.5 |      | 15   |                                        |
| 11 | c.1277>A   | G409D | p.G426D  | Mum et al. 2002            | infantil     | G409D/E174K      |      | -    |                                        |
| 11 | c.1282>I   | R411X | p.R428X  | Taillandier et al. 1999    | peri-natal   | R411X/R411X      |      | na   | Mutação nonsense                       |
| 11 | c.1283>C   | R411P | p.R428P  | Spentchias et al. 2006     | peri-natal   | R411P/c.337+2T>A |      | -    |                                        |
| 11 | c.1285>A   | R412K | p.R429K  | Versailles s lab Jul.      | 2006 Odonto. | R412K/?          |      |      |                                        |
| 11 | c.1306T>C  | Y419H | p.Y436H  | Heathorn et al. 1992       | infantil     | A16V/Y419H       |      | na   |                                        |
| 12 | c.1333T>C  | S428P | p.S445P  | Marnett et al. 1995        | pré-infantil | S428P/?          | 2.1  | 1    |                                        |
| 12 | c.1349>A   | R433H | p.R450H  | Taillandier et al. 2000    | odonto.      | D339G/R433H      |      | -    |                                        |

## (Continuação)

|    | C-195C>I  |       |          | Taillandi<br>er et al.<br>2000  | peri-natal       | C-<br>195C>I/C194 Y |     | na  | Afeta o<br>local da<br>início da<br>transcrição |
|----|-----------|-------|----------|---------------------------------|------------------|---------------------|-----|-----|-------------------------------------------------|
| 1  |           |       |          |                                 |                  |                     |     |     |                                                 |
| 12 | C.1348C>I | R433C | P. R450C | Morinet et<br>al. 1998          | pré-<br>infantil | R433C/R433C         | 4.0 | 1   | -                                               |
| 12 | C.1364G>A | Z435K | P. R462K | Spentchia<br>n et al.<br>2003   | peri-natal       | A94T/R435K          |     |     | +                                               |
| 12 | C.1361A>G | H437R | P. H464R | Versaille<br>s lab<br>Oct. 2003 | infantil         | Z174K/H437R         |     |     | +                                               |
| 12 | C.1363G>A | G438S | P. G455S | Erquet<br>et al.<br>2004        | adulto           | G438S/G474 R        |     |     | -                                               |
| 12 | C.1364G>A | G438D | P. G455D | Versaille<br>s lab<br>Jan. 2007 | peri-natal       | G438D/G438 D        |     |     | -                                               |
| 12 | C.1366G>T | G439W | P. G456W | Versaille<br>s lab<br>Oct. 2003 | infantil         | G439W/?             |     |     | +                                               |
| 12 | C.1366G>A | G439R | P. G456R | Ozono et<br>al. 1996            | pré-<br>infantil | G439R/?             | 1.5 | imp | +                                               |
| 12 | C.1375G>A | V442M | P. V459M | Taillandi<br>er et al.<br>2000  | pré-<br>infantil | A34V/V442M          |     |     | +                                               |
| 12 | C.1375G>T | V442L | P. V459L | Versaille<br>s lab<br>Oct. 2004 | peri-natal       | V442L/V435K         |     |     | -                                               |
| 12 | C.1396C>T | P443L | P. P466L | Versaille<br>s lab<br>Oct. 2003 | peri-natal       | P443L/?             |     |     | +                                               |
| 12 | C.1400T>C | M450T | P. M467T | Versaille<br>s lab<br>Oct. 2004 | pré-<br>infantil | M450T/P290S         |     |     | -                                               |
| 12 | C.1402G>A | A451T | P. A468T | Spentchia<br>n et al.<br>2003   | peri-natal       | A451T/A451T         |     |     | +                                               |
| 12 | C.1417G>A | G456S | P. G473S | Morinet et<br>al. 1998          | peri-natal       | A23W/G456S          |     |     | +                                               |
| 12 | C.1426G>A | Z453K | P. Z476K | Taillandi<br>er et al.<br>1999  | peri-natal       | A94T/Z453K          |     |     | +                                               |

(Continuação)

|                                  |                    |       |                        |                         |                         |                        |      |    |    |                                        |
|----------------------------------|--------------------|-------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------|----|----|----------------------------------------|
| 1                                | c.-195C>T          |       |                        | Taillandier et al. 2000 | peri-natal              | C.-195C>T/C184 Y       |      |    | na | Mutação local de início da transcrição |
| 12                               | c.1427A>G          | E459G | p. E476G               | Mornet et al. 2001      | peri-natal              | E459G/E459 G           |      |    | +  |                                        |
| 12                               | c.1433A>T          | N461I | p. N472I               | Taillandier et al. 2000 | infantil                | N461I/N                | 1.1  | 2  | -  |                                        |
| 12                               | c.1444 144 Sin EC- |       |                        | Brun-Heath et al. 2005  | peri-natal              | c.1444 1445i naC/G317D |      |    |    | Mutação frame-shift                    |
| 12                               | c.1456G>C          | C472S | p. C489 S              | Taillandier et al. 2000 | peri-natal              | C472S/c.397+ Z1>A      | 3.4  | 5  | -  |                                        |
| 12                               | c.1462A>T          | I473F | p. I490F               | Lis-Baldini et al. 2001 | adulto                  | I473F/?                | 37.1 | 3  | -  |                                        |
| 12                               | c.1471 C>A         | G474R | p. G491 R              | Mornet et al. 1998      | peri-natal              | G112R/G474 R           |      |    | -  |                                        |
| 12                               | c.1471del16        |       |                        | Brun-Heath et al. 2005  | odonto                  | c.1471del16/R115H      |      |    |    | Mutação frame-shift                    |
| 12                               | c.1559del1T        |       |                        | Grimp et al. 1994       | pré-infantil            | E281R/c.1559 del1      | 28   | 18 | na | Mutação frame-shift                    |
| Deleções grandes                 |                    |       |                        |                         |                         |                        |      |    |    |                                        |
| Deleção de exões 3-5             |                    |       |                        | Spentchia et al. 2006   | peri-natal              | homozigótico           |      |    |    |                                        |
| deleção de exão 12 (paralelo 3') |                    |       | Spentchian et al. 2006 | pré-infantil            | heterozigótico composto |                        |      |    |    |                                        |

### **Spacer**

Sem estar limitado a esta teoria, acredita-se que o fragmento Fc usado na proteína de fusão dirigida ao osso, apresentada nos Exemplos seguintes, atua como spacer, o que permite que a proteína seja dobrada de forma mais eficiente, uma vez que a expressão de sTNALP-Fc-D10 foi superior à de sTNALP-D10 (ver Exemplo 2 a seguir). Uma explicação possível, é que a introdução do fragmento Fc alivia as forças repulsivas causadas pela presença da sequência D10 carregada negativamente, adicionada à extremidade C-terminal da sequência sALP testada.

Os spacers da presente invenção são polipéptidos compreendendo um Fc. É divulgado que o spacer alivia o impedimento estérico, prevenindo a interação entre dois domínios sALP de dois monómeros sALP, para constituir a entidade mínima ativa cataliticamente.

### **Fragmentos da região de fragmento cristalizável (Fc)**

Fragmentos Fc úteis para a presente invenção incluem fragmentos Fc de IgG, que compreendem a região flexível, e os domínios CH2 e CH3. Podem ser utilizados, por exemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-3 e IgG-4.

### **Péptido carregado negativamente**

O péptido carregado negativamente de acordo com a presente invenção pode ser um poli-aspartato ou poli-glutamato, selecionado do grupo consistindo em D10 a D16 ou E10 a E16.

Em formas de realização específicas, as proteínas de fusão sALP dirigidas ao osso da presente invenção estão associadas de maneira a formar dímeros e tetrâmeros.

Sem estar limitado a esta teoria em particular, usando um polipéptido compreendendo um Fc como spacer, os dímeros são presumivelmente constituídos por dois monómeros de sALP dirigido ao osso ligados de forma covalente, através de duas pontes dissulfito localizadas nas regiões flexíveis dos dois fragmentos Fc. Nesta configuração em dímero, o impedimento estérico imposto pela formação das pontes dissulfito previne presumivelmente a associação dos domínios sALP para formar a entidade mínima dimérica ativa cataliticamente, presente em células normais.

Sem estar limitado a esta teoria em particular, acredita-se que na sua estrutura em tetrâmero, a associação das proteínas de fusão envolveria um domínio sALP de um dímero e outro de outro dímero. O impedimento estérico, presumivelmente prevenindo os dois domínios sALP do mesmo dímero ligado a Fc de interagirem um com o outro para constituir a entidade mínima ativa cataliticamente, podia eventualmente ser aliviado através da inserção de um spacer maior do que o Fc descrito nos Exemplos apresentados aqui, entre o fragmento sALP e o fragmento de poli-aspartato ou poli-glutamato.

O sALP dirigido ao osso pode ainda compreender opcionalmente um ou mais aminoácidos adicionais 1) a seguir ao poli-aspartato ou poli-glutamato; e/ou 2) entre o poli-aspartato e o fragmento Fc; e/ou 3) entre o spacer tal como o fragmento Fc, e o fragmento sALP. Este é o caso por exemplo, quando a estratégia de clonagem usada para produzir o conjugado dirigido ao osso, introduz aminoácidos

exógenos nestes locais. Contudo, os aminoácidos exógenos devem ser selecionados de forma a não fornecer um sinal de ancoragem GPI adicional. A probabilidade de uma sequência desenhada ser clivada pela transamidase da célula hospedeira pode ser prevista como descrito por Ikezawa (Ikezawa 2002).

A presente invenção também inclui a proteína de fusão modificada após translação, por exemplo, através de glicosilação, incluindo aquelas aqui expressamente referidas, acetilação, amidação, bloqueio, formilação, hidroxilação com ácido gama-carboxiglutâmico, metilação, fosforilação, ácido pirrolidona carboxílico e sulfatação.

O termo "proteína recombinante" é aqui usado para referir uma proteína codificada por um ácido nucleico geneticamente manipulado, inserido numa célula hospedeira procariota ou eucariota. O ácido nucleico é geralmente colocado num vetor, como por exemplo, um plasmídeo ou vírus, como apropriado para a célula hospedeira. Apesar das células de ovário de hamster chinês (CHO) terem sido utilizadas como hospedeiras para a expressão de conjugados da presente invenção nos Exemplos aqui apresentados, um perito na especialidade irá compreender que um número de outros sistemas hospedeiros pode ser usado para produzir proteínas recombinantes, de acordo com métodos habituais do estado da técnica. Métodos representativos são divulgados em Maniatis et al. Cold Springs Harbor Laboratory (1989). "Proteína clivada recombinante", tal como aqui utilizado deve referir uma proteína recombinante que pode ser clivada por uma enzima do hospedeiro, de forma a produzir uma proteína secretada / solúvel. Sem estar tão limitado, as células HEK293, PerC6, células de rim de hamster bebé também podem ser utilizadas.

Tal como aqui utilizado, a terminologia "condições adequadas para permitir a expressão do polipéptido" deve significar qualquer meio de cultura que irá permitir a produção da proteína de fusão da presente invenção. Sem estar tão limitado, isto inclui meios preparados com um tampão, bicarbonato e/ou HEPES, íões como cloro, fosfato, cálcio, sódio, potássio, magnésio, ferro, fontes de carbono tais como açúcares simples, aminoácidos, potencialmente lípidos, nucleótidos, vitaminas e fatores de crescimento tais como insulina; meios habituais disponíveis comercialmente, tais como alfa-MEM, DMEM, Ham's-F12 e IMDM suplementados com 2 - 4 mM de L-glutamina e 5% de soro fetal bovino; meios sem proteína animal habituais disponíveis comercialmente, como por exemplo, Hyclone™, SFM4CHO, Sigma CHO DHFR-, Cambrex POWER™ CHO CD suplementado 2 - 4 mM de L-glutamina. Estes meios são desejavelmente preparados sem timidina, hipoxantina e L-glicina, para manter a pressão seletiva, permitindo a expressão estável do produto proteico.

Sem estar tão limitado, as células hospedeiras úteis para a expressão da fusão da presente invenção incluem células L, células C127, células 3T3, células CHO, células BHK, células COS-7 ou células de ovário de hamster chinês (CHO). Células CHO de interesse para a expressão da proteína de fusão da presente invenção incluem CHO-DG44 e CHO/dhfr<sup>-</sup>, também referidas como CHO duk<sup>-</sup>. Esta última linha celular encontra-se disponível através da American Type Culture Collection (número ATCC CRL-9096).

O termo "tecido ósseo" é aqui usado para referir tecido sintetizado por osteoblastos, composto por uma matriz

orgânica contendo principalmente colagénio e mineralizado pela deposição de cristais de hidroxapatite.

As proteínas de fusão compreendidas nas fusões dirigidas ao osso da presente invenção são úteis para tratamento terapêutico de condições caracterizadas por defeitos ósseos, fornecendo uma quantidade eficaz da proteína de fusão ao osso. As proteínas de fusão são fornecidas na forma de composições farmacêuticas, em quaisquer transportadores standard farmacêuticamente aceitáveis, e são administradas por qualquer procedimento standard, por exemplo, por injeção intravenosa.

Tal como aqui utilizado, a terminologia "fenótipo HPP" deve referir qualquer um de raquitismo (defeito no crescimento da placa de cartilagem), osteomalacia, níveis elevados de pirofosfato inorgânico (PPI), fosfoetanolamina (PEA), ou piridoxal 5'-fosfato (PLP) no sangue e/ou urina, convulsões, dores nos ossos, deposição de cristais de pirofosfato de cálcio dihidrato (CPPD) em articulações, levando a condrocalcinose e morte prematura. Sem estar tão limitado, um fenótipo HPP pode ser documentado por crescimento retardado com uma diminuição do comprimento dos ossos longos (tais como o fémur, tíbia, úmero, rádio, ulna), uma diminuição da densidade média de osso total, e uma diminuição da mineralização óssea em ossos tais como o fémur, a tíbia, costelas e metatarso, e falange, uma diminuição da mineralização dos dentes, uma perda prematura dos dentes decíduos (por exemplo, aplasia, hipoplasia ou displasia do cimento dental). Sem estar tão limitado, a correção ou prevenção de defeitos de mineralização óssea pode ser observada por um ou mais dos seguintes: um aumento do tamanho dos ossos longos, um aumento de mineralização óssea e/ou dos dentes, uma correção do arquear das pernas,

uma redução de dor nos ossos e uma redução na deposição de cristais CPPD nas articulações.

Tal como aqui utilizado, a terminologia "correção" na expressão "correção de um fenótipo de hipofosfatasia" deve referir uma redução parcial ou completa de um fenótipo de HPP preexistente. De igual modo, a terminologia "prevenir" na expressão "prevenir um fenótipo de HPP" deve referir qualquer atraso ou retardamento de um fenótipo de HPP, ou qualquer prevenção parcial ou completa do desenvolvimento de um fenótipo de HPP.

Tal como aqui utilizado, o termo "indivíduo" deve significar qualquer mamífero incluindo homem, rato, ratazana, cão, gato, porco, vaca, macaco, cavalo, etc. Numa forma de realização específica, ele refere-se a um humano.

Tal como aqui utilizado, o termo "indivíduo em necessidade de" num método de administração de um composto da presente invenção, deve referir um indivíduo que beneficiaria da administração de um composto da presente invenção. Em formas de realização específicas, ele refere-se a um indivíduo que já apresenta pelo menos um fenótipo de HPP, ou a um indivíduo suscetível de desenvolver pelo menos um fenótipo de HPP, ou pelo menos um outro fenótipo de HPP. Numa outra forma de realização, o termo também se refere a um indivíduo que tem aplasia, hipoplasia ou displasia de cemento dental, ou um indivíduo suscetível de desenvolver aplasia, hipoplasia ou displasia de cemento dental.

Tal como aqui utilizado, "um indivíduo suscetível de desenvolver pelo menos um fenótipo de HPP" é um indivíduo com pelo menos uma mutação de perda de função no gene (ALPL).

Tal como aqui utilizado, "um indivíduo suscetível de desenvolver aplasia, hipoplasia ou displasia do cemento dental", é um indivíduo com HPP, ou uma doença periodontal devida a uma infecção bacteriana. A doença periodontal devida a infecção bacteriana pode induzir alteração do cemento, o que por sua vez pode levar à esfoliação do dente.

### **Via de administração**

sALPs dirigidos ao osso da presente invenção podem ser administrados por vias, tais como a via oral, nasal, intravenosa, intramuscular, subcutânea, sublingual, intratecal ou intradérmica. A via de administração pode depender de uma variedade de fatores, tais como os objetivos ambientais e terapêuticos. Tal como aqui utilizado, indivíduos refere-se a animais tais como humanos, nos quais é desejável a prevenção, ou correção de defeitos de mineralização que caracterizam HPP, ou outros fenótipos associados com HPP, ou prevenção ou correção de cemento danificado.

A título de exemplo, a composição farmacêutica da invenção pode estar na forma de um líquido, solução, suspensão, comprimido, cápsula, pastilha, cápsulas de gelatina, pó, gel, pomada, creme, solução de nebulização, solução de vaporização, vapor atomizado, aerossol, ou fitossoma. Para administração oral, pastilhas ou cápsulas podem ser preparadas por meios convencionais com excipientes farmacêuticamente aceitáveis, tais como aglutinantes, materiais de enchimento, lubrificantes, desintegrantes, ou surfactantes. As pastilhas podem ser revestidas por métodos conhecidos do estado da técnica. As preparações líquidas

para administração oral podem tomar a forma de, por exemplo, soluções, xaropes, ou suspensões, ou podem ser apresentadas na forma de um produto seco para reconstituição com solução salina ou outro veículo líquido adequado antes da utilização. Suplementos dietéticos da invenção também podem conter aditivos farmacologicamente aceitáveis, tais como agentes solubilizantes, emulsionantes, veículos não aquosos, conservantes, sais tampão, aromatizantes, corantes, e agentes adoçantes, como apropriado. As preparações para administração oral também podem ser adequadamente formuladas para originar a libertação controlada dos ingredientes ativos.

Os revestimentos entéricos podem ainda ser utilizados em pastilhas da presente invenção, para resistir ao contacto prolongado com o fluido gástrico fortemente ácido, mas dissolvem-se no ambiente intestinal levemente ácido ou neutro. Sem estar tão limitado, acetato ftalato de celulose, Eudragit™ e ftalato de hidroxipropil metilcelulose (HPMCP), podem ser usados em revestimentos entéricos de composições farmacêuticas da presente invenção. As concentrações de acetato ftalato de celulose geralmente usadas são 0,5-9,0% do peso do núcleo. A adição de plastificantes melhora a resistência à água deste material de revestimento, e formulações que utilizam estes plastificantes são mais eficazes que a utilização de ftalato acetato de celulose apenas. Ftalato acetato de celulose é compatível com muitos plastificantes, incluindo monoglicerídeo acetilado; butil ftalbutil glicolato; dibutil tartarato; dietil ftalato; dimetil ftalato; etil ftaliletil glicolato; glicerina; propileno glicol; triacetina; citrato de triacetina; e tripropionina. Também é usado em combinação com outros agentes de revestimento,

tais como etilcelulose, em preparações de libertação controlada de fármacos.

### **Dosagem**

Qualquer quantidade de uma composição farmacêutica pode ser administrada a um indivíduo. As dosagens irão depender de muitos fatores, incluindo o modo de administração e a idade do indivíduo. Tipicamente, a quantidade de ALP dirigida ao osso da invenção contida numa dose única irá ser uma quantidade que previne, atrasa ou corrige eficazmente o defeito de mineralização óssea em HPP, sem induzir toxicidade significativa. Tal como aqui utilizado, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" deve referir uma quantidade eficaz para alcançar o efeito terapêutico desejado, ao mesmo tempo que evita efeitos secundários adversos. Tipicamente, sALPs dirigidos ao osso de acordo com a presente invenção, podem ser administrados a indivíduos em doses que variam de 0,001 a 500 mg/kg/dia e, num modo de realização mais específico, cerca de 0,1 a cerca de 100 mg/kg/dia e, num modo de realização mais específico, cerca de 0,2 a cerca de 20 mg/kg/dia. O método de escala alométrica de Mahmood et al. (Mahmood et al. 2003) pode ser usado para extrapolar a dose do rato para o homem. A dosagem irá ser adaptada pelo clínico, de acordo com fatores convencionais, tais como o grau da doença e parâmetros diferentes do doente.

A quantidade terapeuticamente eficaz de sALPs dirigidos ao osso também pode ser medida diretamente. A quantidade eficaz pode ser dada diariamente ou semanalmente, ou em frações. Tipicamente, uma composição farmacêutica da invenção pode ser administrada numa quantidade de cerca de 0,001 mg até cerca de 500 mg por kg de peso corporal por

dia (por exemplo, 0,05, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 0,8, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 30 mg, 50 mg, 100 mg, ou 250 mg). As dosagens podem ser fornecidas em regimes de dose única ou dose múltipla. Por exemplo, em algumas formas de realização, a quantidade eficaz é uma dose que varia entre cerca de 0,1 a cerca de 100 mg/kg/dia, de cerca de 0,2 mg a cerca de 20 mg de sALP dirigida ao osso por dia, de cerca de 1 mg a cerca de 10 mg de sALP dirigida ao osso por dia, de cerca de 0,07 mg a cerca de 120 mg de sALP dirigida ao osso por semana, de 1,4 mg a cerca de 140 mg de sALP dirigida ao osso por semana, de cerca de 0,3 mg a cerca de 300 mg de sALP dirigida ao osso a cada três dias, de cerca de 0,4 mg a cerca de 40 mg de sALP dirigida ao osso a cada dois dias, e de cerca de 2 mg a cerca de 20 mg de sALP dirigida ao osso a cada dois dias.

Estas são simplesmente linhas de orientação, uma vez que a dose correta deve ser cuidadosamente selecionada e titulada pelo médico que acompanha o doente, com base em fatores clínicos únicos a cada paciente, ou por um nutricionista. A dose diária ótima será determinada pelos métodos conhecidos do estado da técnica, e será influenciada por fatores tais como a idade do doente, tal como indicado anteriormente e outros fatores clínicos relevantes. Adicionalmente, os doentes podem estar a tomar medicação para outras doenças ou condições. As outras medicações podem ser continuadas durante o tempo que um sALP dirigido ao osso é administrado ao doente, mas nestes casos é particularmente aconselhável começar com doses baixas, para determinar se ocorrem efeitos secundários indesejáveis.

### **Transportadores/Veículos**

As preparações contendo uma sALP dirigida ao osso podem ser fornecidas a doentes em combinação com solventes, suspensões ou emulsões aquosas ou não aquosas estéreis, farmacêuticamente aceitáveis. Exemplos de solventes não aquosos são propilenoglicol, polietilenoglicol, óleo vegetal, óleo de peixe, e ésteres orgânicos injetáveis. Transportadores aquosos incluem água, soluções água-álcool, emulsões ou suspensões, incluindo solução salina e veículos parenterais médicos tamponados, incluindo solução de cloreto de sódio, solução de dextrose de Ringer, solução de dextrose mais cloreto de sódio, solução de Ringer contendo lactose ou óleos fixos. Veículos intravenosos podem incluir reforçadores de fluidos e nutrientes, reforçadores de eletrólitos, tais como aqueles com base na dextrose de Ringer, e afins.

Ainda noutra forma de realização, as composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas num sistema de libertação controlada. Numa forma de realização, podem ser usados materiais poliméricos incluindo ácido poliláctico, poliortoésteres, copolímeros em bloco e hidrogéis anfipáticos reticulados, ácido polihidroxibutírico e polihidropiranos (ver também Smolen e Ball, *Controlled Drug Bioavailability, Drug product design and performance*, 1984, John Wiley & Sons; Ranade e Hollinger, *Drug Delivery Systems, pharmacology and toxicology series*, 2003, 2<sup>a</sup>. Edição, CRRC Press), em outra forma de realização, pode ser usada uma bomba (Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321: 574).

As proteínas de fusão da presente invenção podem estar na forma de um pó liofilizado, usando soluções excipientes apropriadas (por exemplo, sacarose), como diluentes.

Adicionalmente, os segmentos de nucleótidos ou proteínas de acordo com a presente invenção podem ser introduzidos em indivíduos de variadas maneiras. Por exemplo, os osteoblastos podem ser isolados do indivíduo afetado, transformados com uma molécula de nucleótidos de acordo com a invenção e reintroduzidos no doente afetado de variadas maneiras, incluindo injeção intravenosa. Como alternativa, a molécula de nucleótidos pode ser administrada diretamente ao doente afetado, por exemplo, por injeção. A molécula de nucleótidos também pode ser administrada através de um veículo, como por exemplo, um lipossoma, o qual pode ser desenhado para ser dirigido a um tipo específico de célula, e manipulado para ser administrado através de diferentes vias.

As proteínas de fusão da presente invenção também podem ser administradas de forma vantajosa, através de terapia genética. Métodos de terapia genética úteis incluem os descritos em WO6060641A2, US7179903 e WO0136620A2 atribuídas à Genzyme usando, por exemplo, um vetor de adenovírus para a proteína terapêutica e sendo dirigidos a hepatócitos como células produtoras de proteína.

Um "veículo de entrega de genes" é definido como uma qualquer molécula que possa transportar polinucleótidos inseridos para uma célula hospedeira. Exemplos de veículos de entrega de genes são lipossomas, polímeros biocompatíveis, incluindo polímeros naturais e polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipéptidos; polissacarídeos; lipopolissacarídeos; envelopes virais artificiais; partículas metálicas; e bactérias, ou vírus, tais como baculovírus, adenovírus e retrovírus, bacteriófagos, cosmídeos, plasmídeos, vetores fúngicos ou outros veículos de recombinação, tipicamente usados no estado da técnica,

os quais foram descritos para a expressão de uma variedade de hospedeiros procariotas e eucariotas, e podem ser usados para terapia genética, assim como simplesmente para a expressão de proteínas. "Entrega de genes", "transferência de genes", afins, como aqui utilizados são termos que se referem à introdução de um polinucleótido exógeno (às vezes referido como "transgene") numa célula hospedeira, independentemente do método usado para a introdução. Estes métodos incluem uma variedade de técnicas bem conhecidas, tais como transferência de genes mediada por vetores (por exemplo, infecção/transfecção viral ou vários outros complexos de entrega de genes à base de proteínas ou lípidos), assim como técnicas que facilitam a entrega de polinucleótidos "nus", tais como electroporação, entrega por "biolística" e várias outras técnicas usadas para a introdução de polinucleótidos. O polinucleótido introduzido pode ser mantido na célula hospedeira de forma estável ou transitória. A manutenção estável requer normalmente que o polinucleótido introduzido contenha uma origem de replicação compatível com a célula hospedeira ou se integre numa replicação da célula hospedeira, tal como numa replicação extracromossómica (por exemplo, um plasmídeo), ou um cromossoma nuclear ou mitocondrial. Conhece-se uma variedade de vetores capaz de mediar a transferência de genes para células de mamíferos, tal como é conhecido do estado da arte e aqui descrito.

Um "vetor viral" é definido como um vírus ou partícula viral que compreende um polinucleótido produzido de forma recombinante a ser introduzido numa célula hospedeira *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. Exemplos de vetores virais incluem vetores de retrovírus, vetores de adenovírus, vetores de vírus associados a adenovírus, tais como os descritos em WO06002203A2, vetores alfavírus e afins.

Vetores de alfavírus, tais como vetores com base no vírus da floresta de Semliki e vetores com base no vírus Sindbis, também foram desenvolvidos para aplicação em terapia genética e imunoterapia.

Em aspetos onde a transferência genética é mediada por um vetor viral de ADN, tal como um adenovírus (Ad) ou vírus associado a adenovírus (MVs), um vetor refere-se a um polinucleótido compreendendo o genoma viral ou parte deste, e um transgene. Os adenovírus (Ads) são um grupo de vírus relativamente bem caracterizado e homogéneo, incluindo mais de 50 serotipos. Ver, por exemplo, Pedido Internacional PCT N° WO 95/27071. Os Ads são fáceis de cultivar e não requerem integração no genoma da célula hospedeira. Vetores derivados de Ad recombinantes, em particular aqueles que reduzem o potencial para recombinação e geração de vírus tipo-selvagem, também foram construídos. Ver Pedido Internacional PCT N° WO 95/00655 e N° WO 95/11984. Vetores que contêm um promotor e um local de clonagem, no qual pode ser operativamente ligado um polinucleótido, são bem conhecidos do estado da técnica. Estes vetores são capazes de transcrever ARN in vitro ou in vivo, e encontram-se comercialmente disponíveis de fontes tais como Stratagene (La Jolla, CA) e Promega Biotech (Madison, WI). De forma a otimizar a expressão e/ou transcrição in vitro, pode ser necessário remover, adicionar ou alterar as partes 5' e/ou 3' que não sofrem translação, dos clones para eliminar codões de iniciação de translação extra, potencialmente inapropriados, ou outras sequências que possam interferir com, ou reduzir a expressão, quer ao nível da transcrição, quer ao nível da translação.

As sALP dirigidas ao osso da presente invenção também podem ser utilizadas em combinação com pelo menos um outro

ingrediente ativo, para corrigir um defeito de mineralização óssea ou outro sintoma prejudicial de HPP. Também podem ser utilizadas em combinação com pelo menos um outro ingrediente ativo, para corrigir um defeito do cimento.

O termo "condições de elevado rigor" deve referir-se a condições que permitem a ligação de sequências com uma elevada homologia. Sem estar tão limitado, exemplos destas condições são enumerados no manual "Molecular cloning, a laboratory manual, 2<sup>a</sup>. Edição de 1989, de Sambrook et al.: 6XSSC ou 6XSPE, reagente de Denhardt ou não, 0,5% SDS e temperatura usada para a obtenção de condições de elevado rigor é frequentemente à volta de 68°C (ver páginas 9.47 a 9.55 de Sambrook), para ácidos nucleicos de 300 a 1500 nucleótidos. Apesar da temperatura ótima a ser usada para uma amostra de ácido nucleico específica poder ser calculada empiricamente, e embora haja espaço para alternativas nas condições de tampão selecionadas, dentro destes intervalos bem conhecidos de condições, o ácido nucleico capturado não irá variar significativamente. Na realidade, Sambrook indica claramente que a "escolha depende em larga medida da preferência pessoal" (ver página 9.47). Sambrook especifica que a fórmula para calcular a temperatura ótima que varia de acordo com a proporção de guanina e citosina na amostra de ácido nucleico, e o comprimento da amostra (10 a 20°C abaixo da  $T_f$ , em que  $T_f = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 (\text{fração G+C}) - 0,63 (\% \text{ formamida} - (600/\text{L}))$  (ver páginas 9.50 e 9.51 de Sambrook).

### **Kits**

A presente invenção também se refere a um kit para corrigir ou prevenir um fenótipo de HPP, ou um defeito no cimento,

compreendendo um ácido nucleico, uma proteína ou um ligando de acordo com a presente invenção. Por exemplo, ele pode compreender uma composição dirigida ao osso da presente invenção, ou um vetor que codifica o mesmo, e instruções para administrar a referida composição ou vetor a um indivíduo, para corrigir ou prevenir um fenótipo de HPP. Estes kits podem ainda compreender pelo menos um outro agente ativo, capaz de prevenir ou corrigir um fenótipo de HPP. Quando o kit é usado para prevenir ou corrigir um fenótipo de HPP num indivíduo com HPP, o kit pode ainda compreender pelo menos um outro agente ativo, capaz de prevenir ou corrigir qualquer outro sintoma prejudicial de HPP. Adicionalmente, um kit compartimentado, de acordo a presente invenção, inclui um qualquer kit, no qual os reagentes estão contidos em recipientes separados. Estes recipientes incluem pequenos recipientes de vidro, recipientes de plástico ou tiras de plástico ou papel. Estes recipientes permitem a transferência eficiente de reagentes de um compartimento para outro compartimento, de tal modo que as amostras e os reagentes não são contaminados, e os agentes ou soluções de cada recipiente podem ser adicionados de uma forma quantitativa, de um compartimento para o outro.

Mais especificamente, de acordo com um primeiro aspeto da presente invenção, é fornecida uma fosfatase alcalina dirigida ao osso, compreendendo um polipéptido com a estrutura: Z-sALP-Y-spacer-X-Wn-V, em que sALP consiste nos resíduos de aminoácidos 18-502 da Seq ID No. 8; em que V está ausente ou é uma sequência de aminoácidos de pelo menos um aminoácido; X está ausente ou é uma sequência de aminoácidos de pelo menos um aminoácido; Y está ausente ou é uma sequência de aminoácidos de pelo menos um aminoácido; Z está ausente ou é uma sequência de aminoácidos de pelo

menos um aminoácido; e Wn é um poliaspartato ou poliglutamato, em que  $n = 10$  a  $16$ , e o spacer compreende uma região de fragmento cristalizável (Fc).

É divulgado que a sALP compreende os resíduos de aminoácidos 23-508 da SEQ ID NO: 15. Também é divulgado que a sALP consiste nos resíduos de aminoácidos 23-512 da SEQ ID NO: 15. Também é divulgado que a sALP consiste nos resíduos de aminoácidos 23-508 da SEQ ID NO: 18. Também é divulgado que a sALP consiste nos resíduos de aminoácidos 23-512 da SEQ ID NO: 18. Também é divulgado que a sALP consiste nos resíduos de aminoácidos 18-498 da SEQ ID NO: 16. Também é divulgado que a sALP consiste nos resíduos de aminoácidos 18-502 da SEQ ID NO: 16. Também é divulgado que a sALP consiste nos resíduos de aminoácidos 18-498 da SEQ ID NO: 19. Também é divulgado que a sALP consiste nos resíduos de aminoácidos 18-502 da SEQ ID NO: 19. Também é divulgado que a sALP consiste nos resíduos de aminoácidos 18-498 da SEQ ID NO: 19. Também é divulgado que a sALP consiste nos resíduos de aminoácidos 18-502 da SEQ ID NO: 19. Também é divulgado que a sALP consiste nos resíduos de aminoácidos 18-498 da SEQ ID NO: 8. De acordo com a presente invenção, a sALP consiste nos resíduos de aminoácidos 18-502 da SEQ ID NO: 8.

De acordo com a presente invenção, o spacer compreende uma região de fragmento cristalizável (Fc). Numa forma de realização específica, Fc compreende um domínio CH2, um domínio CH3 e uma região flexível. Noutra forma de realização específica, Fc é um domínio constante de uma imunoglobulina, selecionado do grupo consistindo em IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-3 e IgG-4. Noutra forma de realização específica, Fc é um domínio constante de uma imunoglobulina IgG-1. Noutra forma de realização específica, Fc é tal como

apresentado na SEQ ID NO: 3. Noutra forma de realização específica, Wn é um poliaspartato. Noutra forma de realização específica, n = 10. Noutra forma de realização específica, Z está ausente. Noutra forma de realização específica, Y representa um resíduo de dois aminoácidos. Noutra forma de realização específica, Y é leucina-lisina. Noutra forma de realização específica, X representa um resíduo de dois aminoácidos. Noutra forma de realização específica, X é aspartato-isoleucina. Noutra forma de realização específica, V está ausente. Noutra forma de realização específica, o polipéptido é tal como apresentado na SEQ ID NO: 4.

Noutra forma de realização específica, a fosfatase alcalina dirigida ao osso compreende o polipéptido numa forma compreendendo um dímero. Noutra forma de realização específica, a fosfatase alcalina dirigida ao osso compreende o polipéptido numa forma de tetrâmero.

Noutra forma de realização específica, a fosfatase alcalina dirigida ao osso encontra-se num transportador farmacologicamente aceitável. Noutra forma de realização específica, o transportador farmacologicamente aceitável é uma solução salina. Noutra forma de realização específica, a fosfatase alcalina dirigida ao osso encontra-se numa forma liofilizada. Noutra forma de realização específica, a fosfatase alcalina dirigida ao osso encontra-se na forma de uma dosagem diária de cerca de 0,2 a 20 mg/kg. Noutra forma de realização específica, a fosfatase alcalina dirigida ao osso encontra-se na forma de uma dosagem de cerca de 0,6 a cerca de 60 mg/kg, para administração a cada três dias. Noutra forma de realização específica, a fosfatase alcalina dirigida ao osso encontra-se na forma de uma dosagem semanal de cerca de 1,4 a cerca de 140 mg/kg. Noutra forma

de realização específica, a fosfatase alcalina dirigida ao osso encontra-se na forma de uma dosagem semanal de cerca de 0,5 mg/kg.

Mais especificamente, de acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência que codifica o polipéptido da presente invenção.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um ácido nucleico isolado consistindo numa sequência que codifica o polipéptido da presente invenção. Mais especificamente, de acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência tal como apresentado na SEQ ID NO: 17.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um vetor de expressão recombinante, compreendendo o ácido nucleico da presente invenção. Mais especificamente, de acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um vetor recombinante de vírus associado a adenovírus compreendendo o ácido nucleico da presente invenção. Mais especificamente, de acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma célula hospedeira recombinante isolada transformada ou transfectada com o vetor da presente invenção.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método para produzir uma fosfatase alcalina dirigida ao osso da presente invenção, compreendendo o cultivo da célula hospedeira da presente invenção, sob condições que permitem a expressão da fosfatase alcalina

dirigida ao osso, e a recuperação da fosfatase alcalina dirigida ao osso do meio de cultura.

Numa forma de realização específica, a célula hospedeira é uma célula L, célula C127, célula 3T3, célula CHO, célula BHK, célula COS-7 ou uma célula de ovário de hamster chinês (CHO). Noutra forma específica de realização, a célula hospedeira é uma célula de ovário de hamster chinês (CHO). Numa forma de realização específica, a célula hospedeira é uma célula CHO-DG44.

De acordo com outro aspeto da presente invenção, é fornecido um kit compreendendo a fosfatase alcalina dirigida ao osso da presente invenção, e instruções para administrar o polipéptido a um indivíduo, para corrigir ou prevenir um fenótipo de hipofosfatasia (HPP).

De acordo com outro aspeto da presente invenção, é fornecido um kit compreendendo a fosfatase alcalina dirigida ao osso da presente invenção, e instruções para administrar o polipéptido a um indivíduo, para corrigir ou prevenir aplasia, hipoplasia ou displasia do cemento dental.

De acordo com outro aspeto da presente invenção, é fornecido um método para a utilização da fosfatase alcalina dirigida ao osso da presente invenção, para a correção ou prevenção de pelo menos um fenótipo de hipofosfatasia (HPP), compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma fosfatase alcalina dirigida ao osso, a um indivíduo em necessidade da mesma, em que pelo menos um fenótipo de HPP é corrigido ou prevenido neste indivíduo.

Numa forma de realização específica, o indivíduo tem pelo menos um fenótipo de HPP. Noutra forma de realização específica, o indivíduo é suscetível de desenvolver pelo menos um fenótipo de HPP. Noutra forma de realização específica, este fenótipo de HPP compreende convulsão relacionada com HPP. Noutra forma de realização específica, este fenótipo de HPP compreende perda prematura dos dentes decíduos. Noutra forma de realização específica, este fenótipo compreende mineralização óssea incompleta. Noutra forma de realização específica, a mineralização óssea incompleta é mineralização incompleta do osso femoral. Noutra forma de realização específica, a mineralização óssea incompleta é mineralização incompleta do osso tibial. Noutra forma de realização específica, a mineralização óssea incompleta é mineralização incompleta do osso metatarso. Noutra forma de realização específica, a mineralização óssea incompleta é mineralização incompleta das costelas. Noutra forma de realização específica, este fenótipo de HPP compreende níveis elevados de pirofosfato inorgânico (PPi) no sangue e/ou urina. Noutra forma de realização específica, este fenótipo de HPP compreende níveis elevados de fosfoetanolamina (PEA) no sangue e/ou urina. Noutra forma de realização específica, este fenótipo de HPP compreende níveis elevados de piridoxal 5'-fosfato (PLP) no sangue e/ou urina. Noutra forma de realização específica, este fenótipo de HPP compreende ganho inadequado de peso. Noutra forma de realização específica, este fenótipo de HPP compreende raquitismo. Noutra forma de realização específica, este fenótipo de HPP compreende dor nos ossos. Noutra forma de realização específica, este fenótipo de HPP compreende deposição de cristais de pirofosfato de cálcio dihidratado. Noutra forma de realização específica, este fenótipo de HPP compreende aplasia, hipoplasia ou displasia do cimento dental. Noutra

forma de realização específica, o indivíduo em necessidade tem HPP pré-infantil. Noutra forma de realização específica, o indivíduo em necessidade tem HPP infantil. Noutra forma de realização específica, o indivíduo em necessidade tem HPP perinatal. Noutra forma de realização específica, o indivíduo em necessidade tem HPP adulta. Noutra forma de realização específica, o indivíduo em necessidade tem HPP odontohipofosfatasia.

É divulgado um método para a utilização da fosfatase alcalina dirigida ao osso da presente invenção para a correção ou prevenção de aplasia, hipoplasia ou displasia do cimento dental, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de fosfatase alcalina dirigida ao osso a um indivíduo em necessidade da mesma, em que a aplasia, hipoplasia ou displasia do cimento dental é corrigida ou prevenida no indivíduo.

Numa forma de realização específica, a administração compreende a transfecção de uma célula no indivíduo com um ácido nucleico que codifica a fosfatase alcalina. Noutra forma de realização, a transfecção da célula é realizada *in vitro*, de tal maneira que a fosfatase alcalina dirigida ao osso é expressa e secretada numa forma ativa, e administrada ao indivíduo com a referida célula. Noutra forma de realização específica, a administração compreende a administração subcutânea da fosfatase alcalina dirigida ao osso ao indivíduo. Noutra forma de realização específica, a administração compreende a administração intravenosa da fosfatase alcalina dirigida ao osso ao indivíduo.

De acordo com outro aspeto da presente invenção, é fornecida uma fosfatase alcalina dirigida ao osso da

presente invenção, para uso na correção ou prevenção de pelo menos um fenótipo de HPP.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma fosfatase alcalina dirigida ao osso da presente invenção, para uso na correção ou prevenção de aplasia, hipoplasia ou displasia do cimento dental.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma fosfatase alcalina dirigida ao osso da presente invenção, para a preparação de um medicamento.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma fosfatase alcalina dirigida ao osso da presente invenção, para a correção ou prevenção de pelo menos um fenótipo de HPP.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma fosfatase alcalina dirigida ao osso da presente invenção, para a correção ou prevenção de aplasia, hipoplasia ou displasia do cimento dental.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

Nas figuras em anexo:

A Figura 1 apresenta o desenho e estrutura esquemática da ALP dirigida ao osso da presente invenção, exemplificado por hs TNALP-FcD10. O painel A apresenta uma representação esquemática do produto de translação primário completo do gene da fosfatase alcalina tecidual não específica humana (TNALP), incluindo o péptido de sinalização N-terminal e o sinal transitório ancorado na membrana para a adição de GPI. O painel B apresenta o produto de translação primário

da proteína de fusão. O painel C apresenta o produto de translação primário sem o péptido de sinalização de TNALP passível de sofrer clivagem;

A Figura 2 apresenta a sequência proteica para hTNALP-FcD10 ((SEQ ID NO: 1), incluindo o péptido de sinalização N-terminal - primeiros 17 aa), em que a porção hTNALP (SEQ ID NO: 2) está em *itálico*, incluindo a parte do péptido de sinalização apresentado em *itálico* e sublinhado, e o fragmento Fc é sublinhado (SEQ ID NO: 3);

A Figura 3 apresenta a sequência proteica para a hstTNALP-FcD10 usada nos Exemplos aqui apresentados (SEQ ID NO: 4) (sem o péptido de sinalização N-terminal), em que a porção hstTNALP (SEQ ID NO: 5) está em *itálico*, e o fragmento Fc está sublinhado (SEQ ID NO: 3). Resíduos de asparagina (N) duplamente sublinhados correspondem a locais possíveis de N-glicosilação, e resíduos de aminoácidos a **negrito** (LK e DI) correspondem a sequências de ligação entre os domínios hstTNALP e Fc, e Fc e D10, respetivamente. Estas sequências de ligação são derivadas de locais de restrição de endonucleases durante manipulação de ADNc;

A Figura 4 apresenta graficamente a expressão comparativa de sTNALP-D10 e sTNALP-FcD10 em células CHO-DG44;

A Figura 5 apresenta a purificação de sTNALP-FcD10 por cromatografia de exclusão molecular em proteína A-Sepharose, com Sephacryl™ 3-300, assim como análise por SDS-PAGE de sTNALP-FcD10 purificada, em condições redutoras (DTT+) e não redutoras (DTT-). Também apresenta uma versão esquematizada de sTNALP-FcD10. A proteína purificada por cromatografia de afinidade em proteína A-Sepharose™ foi analisada por SDS-PAGE e as bandas foram coradas com Sypro™

Ruby. As principais espécies de sTNALP-FcD10 migraram com um peso molecular aparente de 90.000 Da em condições redutoras, e 200.000 Da em condições não redutoras;

A Figura 6 apresenta a posição do local de clivagem da papaína em sTNALP-FcD10;

A Figura 7 apresenta uma análise SEC-HPLC não desnaturante de sTNALP-FcD10 numa coluna TSK-Gel G3000WXL. Curva simples: amostra digerida por papaína. Curva -X-: amostra idêntica incubada nas mesmas condições, sem papaína (controle);

A Figura 8 apresenta uma análise SDS-PAGE de sTNALP-FcD10 incubada com ou sem papaína, mostrando qual o fragmento que é responsável por cada banda no gel. A análise foi realizada em condições redutoras (DTT+) ou não redutoras (DTT-);

A Figura 9 apresenta um ensaio de ligação *in vitro*. sTNALP-FcD10 e fosfatase alcalina tecidual não específica de rim bovino foram comparadas no ensaio de ligação mineral reconstituído, tal como descrito no Exemplo 2. A atividade total é a soma da atividade enzimática recuperada na fração livre e na fração ligada. Observou-se que a atividade total foi de 84% e 96% da quantidade inicial da atividade enzimática introduzida em cada conjunto de ensaios para as formas bovina e sTNALP-FcD10 da enzima, respetivamente. Os resultados são uma média de duas ligações;

A Figura 10 apresenta os perfis farmacocinéticos e de distribuição de sTNALP-FcD10 no soro, tibia e músculo de ratos tipo selvagem adultos. As concentrações de sTNALP-FcD10 no soro, tibia e músculo, são expressas em µg/g de

tecido (peso húmido), após uma única injeção bólus intravenosa de 5 mg/kg em ratos tipo selvagem adultos;

A Figura 11 apresenta o perfil farmacocinético da concentração no soro de sTNALP-FcD10 em ratos tipo selvagem recém-nascidos. As concentrações no soro de sTNALP-FcD10 como função do tempo após uma única injeção i.p. (painel A) ou s.c. (painel B) de 3,7 mg/kg em ratos tipo selvagem recém-nascidos (1 dia de idade);

A Figura 12 apresenta o perfil farmacocinético previsto de sTNALP-FcD10 no soro. Os níveis estacionários em circulação previstos máximos (C<sub>max</sub>) e mínimos (C<sub>min</sub>) de sTNALP-FcD10 após injeções subcutâneas repetidas (a cada 24h) de 10 mg/kg em ratos recém-nascidos;

A Figura 13 apresenta o perfil farmacocinético testado experimentalmente de sTNALP-FcD10 no soro de ratos recém-nascidos. Os níveis estacionários em circulação mínimos (C<sub>min</sub>) testados de sTNALP-FcD10 24 h após as últimas injeções subcutâneas de 10 mg/kg em ratos recém-nascidos. Homo: homozigótico; hetero: heterozigótico;

A Figura 14 apresenta resultados de eficácia a curto prazo (15 dias), dose baixa (1 mg/kg), em termos das concentrações de sTNALP-FcD10 no soro em ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados. As concentrações de sTNALP-FcD10 no soro no dia 16 de ratos tratados com injeções s.c. diárias de 1 mg/kg de sTNALP-FcD10;

A Figura 15 apresenta resultados de eficácia a curto prazo (15 dias), dose baixa (1 mg/kg), em termos das concentrações de PPI no soro de ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados. Medição de concentrações de PPI no soro. Uma dose baixa de

1 mg/kg foi suficiente para normalizar os níveis de PPI em ratos tratados por ERT;

A Figura 16 apresenta resultados de eficácia a curto prazo (15 dias), dose baixa (1 mg/kg), em termos de morfologia da fise em ratos  $Akp2^{-/-}$  tratados. A coloração tricrômica de Goldner das placas de crescimento de ratos  $Akp2^{-/-}$  tipo selvagem, não tratados e tratados. As placas de crescimento tibial proximal (fises) apresentaram alargamento excessivo da zona hipertrófica em ambos os ratos  $Akp2^{-/-}$  injetados com sTNALP-FcD10 e veículo, o que é consistente com raquitismo precoce. Contudo, a morfologia da fise pareceu menos perturbada nos animais tratados com sTNALP-FcD10;

A Figura 17 apresenta resultados de eficácia a curto prazo (15 dias), dose baixa (1 mg/kg), em termos do tamanho da área hipertrófica da fise de ratos  $Akp2^{-/-}$  tratados. O tamanho da área hipertrófica da placa de crescimento é expresso como uma percentagem da área total da placa de crescimento. De notar a normalização da área hipertrófica nos ratos tratados;

A Figura 18 apresenta resultados de eficácia a curto prazo (15 dias), dose elevada (8,2 mg/kg), em termos do peso corporal nos ratos  $Akp2^{-/-}$  tratados. O efeito de sTNALP-FcD10 no peso corporal;

A Figura 19 apresenta resultados de eficácia a curto prazo (15 dias), dose elevada (8,2 mg/kg), em termos do comprimento dos ossos longos nos ratos  $Akp2^{-/-}$  tratados. Efeito de sTNALP-FcD10 no comprimento do fémur e da tíbia (medições efetuadas ao dia 16);

A Figura 20 apresenta resultados de eficácia a curto prazo (15 dias), dose elevada (8,2 mg/kg), em termos das

concentrações de sTNALP-FcD10 no soro de ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados. As concentrações de sTNALP-FcD10 no soro ao dia 16 de ratos tratados durante 15 dias com injeções s.c. diárias de 8,2 mg/kg de sTNALP-FcD10;

A Figura 21 apresenta resultados de eficácia a curto prazo (15 dias), dose elevada (8,2 mg/kg), em termos da mineralização óssea em ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados. Análise de raios-X dos pés, caixas torácicas e membros posteriores de ratos Akp2<sup>-/-</sup> (16 dias) e uma tabela de distribuição de imagem Faxitron™. Os pés e caixas torácicas foram classificados como graves, moderados ou saudáveis, para ter em conta a extensão dos defeitos de mineralização óssea. As pernas foram simplesmente classificadas como aberrantes (pelo menos um defeito) ou saudáveis (sem defeitos visíveis);

A Figura 22 apresenta resultados de eficácia a curto prazo (15 dias), dose elevada (8,2 mg/kg), em termos dos defeitos nos dentes de ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados. A análise histológica dos dentes de ratos Akp2<sup>-/-</sup> injetados com veículo ou sTNALP-FcD10 e ratos tipo selvagem. Secções finas foram preparadas e coradas como descrito em Millan et al. PDL = ligamento peridontal;

A Figura 23 apresenta resultados de eficácia a longo prazo (52 dias), dose elevada (8,2 mg/kg), em termos da sobrevivência de ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados. A sobrevivência de ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados com sTNALP-FcD10 a longo prazo comparada com a morte precoce de Akp2<sup>-/-</sup> tratados apenas com o controlo veículo;

A Figura 24 apresenta resultados de eficácia a longo prazo (52 dias), dose elevada (8,2 mg/kg), em termos de tamanho,

mobilidade e aparência de ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados. O tratamento normaliza o tamanho, a mobilidade e a aparência de ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados. Ratos não tratados da mesma ninhada são apresentados para comparação;

A Figura 25 apresenta resultados de eficácia a longo prazo (52 dias), dose elevada (8,2 mg/kg), em termos de mineralização e comprimento dos ossos em ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados. Imagens de raios-X dos ossos metatarsianos de ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados com 46 e 53 dias de idade em comparação com ratos tipo selvagem;

A Figura 26 apresenta resultados de eficácia a longo prazo (52 dias), dose elevada (8,2 mg/kg), em termos das concentrações de sTNALP-FcD10 no soro em ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados. As concentrações de sTNALP-FcD10 no soro ao dia 53 de ratos tratados durante 52 dias com injeções s.c. diárias de 8,2 mg/kg de sTNALP-FcD10;

A Figura 27 apresenta A) curvas de sobrevivência para ratos Akp2<sup>-/-</sup> que receberam doses de sTNALP-FcD10 de 4,3 mg/kg diariamente (Tx-1) ou 15,2 mg/kg a cada 3 dias (Tx-3) ou 15,2 mg/kg a cada semana (Tx-7) e B) sobrevivência mediana para cada um destes regimes. A sobrevivência dos ratos tratados foi comparada com a sobrevivência dos ratos injetados com veículo;

A Figura 28 apresenta A) curvas de sobrevivência para ratos Akp2<sup>-/-</sup> que receberam doses de sTNALP-FcD10 de 8,2 mg/kg diariamente (RTx), com início ao dia 15 após o nascimento e B) sobrevivências medianas para os ratos tratados e ratos injetados com veículo. A sobrevivência dos ratos tratados é comparada com a sobrevivência dos ratos injetados com veículo (RVeículo);

A Figura 29 apresenta os efeitos no peso corporal de doses diárias de 8,2 mg/kg de sTNALP-FcD10 injetados em ratos Akp2<sup>-/-</sup> (RTx), com início ao dia 15 após o nascimento. Os pesos corporais diários são comparados com os pesos dos ratos Akp2<sup>-/-</sup> injetados com veículo (RVeículo) ou ratos tipo selvagem da mesma ninhada;

A Figura 30 apresenta um alinhamento de vários ALPs estabelecido em alinhamento de sequências múltiplas CLUSTAL™ W (1.82), nomeadamente uma sequência de TNALP bovina (SEQ ID NO: 6); uma sequência de TNALP de gato (SEQ ID NO: 7), uma sequência de TNALP humana (SEQ ID NO: 8), uma sequência de TNALP de rato (SEQ ID NO: 9), uma sequência de TNALP de ratazana (SEQ ID NO: 10) e uma sequência de TNALP de cão parcial (SEQ ID NO: 11), em que a natureza dos primeiros 22 resíduos de aminoácidos é desconhecida; uma IALP humana (SEQ ID NO: 12) (Nº Acesso: NP\_001622), uma GCALP humana (SEQ ID NO: 13) (Nº Acesso: P10696), e uma PLALP humana (SEQ ID NO: 14) (Nº Acesso: NP\_112603). "\*" significa que os resíduos naquela coluna são idênticos em todas as sequências do alinhamento, ":" significa que foram observadas substituições conservadas, e "." Significa que foram observadas substituições semiconservadas. Uma sequência consenso derivada deste alinhamento (SEQ ID NO: 15) também é apresentada, em que x é um aminoácido qualquer;

A Figura 31 apresenta um alinhamento de TNALPs de várias espécies estabelecidas em alinhamento de sequências múltiplas CLUSTAL™ W (1.82), nomeadamente a sequência bovina (SEQ ID NO: 6); a sequência de gato (SEQ ID NO: 7), a sequência humana (SEQ ID NO: 8), a sequência de rato (SEQ ID NO: 9), a sequência de ratazana (SEQ ID NO: 10) e a

sequência de TNALP de cão parcial (SEQ ID NO: 11), em que a natureza dos primeiros 22 resíduos de aminoácidos é desconhecida; "\*" significa que os resíduos naquela coluna são idênticos em todas as sequências do alinhamento, ":" significa que foram observadas substituições conservadas, e "." Significa que foram observadas substituições semiconservadas. Uma sequência consenso derivada deste alinhamento (SEQ ID NO: 16) também é apresentada, em que x é um aminoácido qualquer; e

A Figura 32 apresenta as sequências de ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 17) que codificam a sequência polipeptídica descrita na Figura 1.

#### **DESCRIÇÃO DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO ILUSTRATIVAS**

Os exemplos fornecidos a seguir mostram o primeiro tratamento de ratos deficientes para TNALP (Akp2<sup>-/-</sup>) com sucesso, usando injeções subcutâneas de uma forma recombinante de ALP. Os ratos Akp2<sup>-/-</sup> recapitulam a forma pré-infantil grave e frequentemente letal de hipofosfatasia.

Foi utilizado o bem conhecido modelo de rato homozigoticamente deficiente para TNSALP, que recapitula muitas das anomalias esqueléticas e bioquímicas associadas com HPP pré-infantil. Os ratos foram tratados com uma nova forma recombinante solúvel de TNSALP humana, modificada na sua extremidade carboxi, para conter um spacer na forma da região de fragmento cristalizável (Fc) de IgG-1 humana, ligado a uma sequência de localização no osso, composta por dez resíduos sequenciais de ácido aspártico (D10). Foi demonstrado que, em relação à TNSALP nativa purificada do rim, a forma recombinante modificada desta enzima liga-se a

hidroxiapatite com muito mais afinidade, enquanto retém a sua atividade enzimática. O tratamento com a TNSALP recombinante da presente invenção normaliza, de forma surpreendente, os níveis de PPI no plasma, e melhora a mineralização dos pés, membros posteriores e dentição de ratos homozigoticamente deficientes, em comparação com ratos que receberam apenas veículo. Observou-se que o tratamento também prolongou a sobrevivência, atingindo praticamente normalização radiográfica do fenótipo esquelético.

Para além do seu efeito terapêutico benéfico *in vivo*, também se verificou, de forma surpreendente, que a forma ativa recombinante da enzima recombinante que contém um spacer, é expressa em níveis mais elevados do que a sua forma correspondente recombinante que não contém o spacer. Adicionalmente, demonstrou-se que a enzima funciona como um tetrâmero.

A presente invenção é ilustrada em mais detalhe pelos seguintes exemplos não limitativos.

### **EXEMPLO 1**

#### **Expressão e purificação de sTNALP-FcD10 recombinante**

De modo a facilitar a expressão e purificação de TNALP recombinante, a sequência C-terminal hidrofóbica que especifica a ligação da âncora GPI em TNALP foi eliminada, para torná-la numa enzima secretada solúvel (Di Mauro et al. 2002). A sequência codificante do ectodomínio de TNALP também foi estendida com a região Fc da IgG humana ( $\gamma^1$  de (IgG1)), Swiss-Prot P01857). Isto permitiu a purificação rápida da enzima recombinante em cromatografia com proteína

A e, surpreendentemente, aumentou a sua expressão. Adicionalmente, para dirigir a TNALP recombinante para o tecido ósseo, uma sequência de dez aspartatos (D10) foi ligada ao C-terminal da região Fc. Esta forma quimérica de TNALP, designada por TNALP-FcD10, retém atividade enzimática completa quando testada a pH 9,8 usando o substrato artificial p-nitrofenilfosfato, e quando testada a pH 7,4, usando pirofosfato inorgânico (PPi), como o substrato fisiológico. Tal como na forma de TNALP que existe naturalmente, o péptido de sinalização N-terminal é clivada durante a translocação co-translacional da proteína no retículo endoplasmático rugoso. O seu desenho e estrutura são ilustrados esquematicamente na Figura 1. A sequência de aminoácidos da proteína de fusão (incluindo o péptido de sinalização) é apresentada na Figura 2. A sequência de aminoácidos da proteína de fusão tal como secretada (isto é, sem o péptido de sinalização) é apresentada na Figura 3.

O método que foi utilizado para construir esta proteína de fusão é o seguinte. O ADNc que codifica a proteína de fusão (ver Figura 32) foi inserido no vetor PIRE5 (Clontech™) no primeiro local de clonagem múltipla, localizado a montante de IRES, usando os locais de restrição por endonuclease NheI e BamHI. O gene da redutase dihidrofolato (DHFR) foi inserido no segundo local de clonagem múltipla, localizado a jusante de IRES, usando os locais de restrição por endonucleases SmaI e XbaI. O vetor resultante foi transfectado em células de ovário de hamster chinês (CHO-DG44), que não possuem ambos os alelos do gene DHFR (Urlaub et al. 1983, obtido de Dr Lawrence A. Chasin, Universidade de Columbia), usando o kit de transfecção Lipofectamine™ (Invitrogen). Dois dias após a transfecção, o meio foi mudado e as células foram mantidas num meio sem nucleótidos

(IMDM suplementado com 5% FBS dializado) durante 15 dias, para isolar transfectantes estáveis para clonagem por placa.

As células dos três melhores clones dos cinco originalmente selecionados a crescer no meio sem nucleótidos foram misturadas e adicionalmente cultivadas em meio (IMDM + 5% FBS dializado), contendo concentração aumentada de metotrexato (MTX). As culturas resistentes a 50 nM de MTX foram adicionalmente expandidas em Cellstacks™ (Corning) contendo meio IMDM suplementado com 5% FBS. Depois de atingir confluência, a camada de células foi lavada com solução salina tamponada com fosfato (PBS), e as células foram incubadas durante três dias adicionais com IMDM contendo 3,5 mM de butirato de sódio, para aumentar a expressão de proteína. No fim da cultura, a concentração de sTNALP-FcD10 no meio foi de 3,5 mg/L, o que foi determinado pela medição da atividade enzimática de TNALP.

Os níveis de sALP-FcD10 no meio foram quantificados usando um ensaio colorimétrico para a atividade de ALP, onde a absorvância de p-nitrofenol libertado é proporcional aos produtos de reação. A reação ocorreu em 100 µL de tampão ALP (20 mM de Bis Tris Propano (HCl) pH 9, 50 mM de NaCl, 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, e 50 µM de ZnCl<sub>2</sub>), contendo 10 µL de meio diluído e 1 mM de pNPP. O último composto foi adicionado no fim para iniciar a reação. A absorvância foi registrada a 405 nm a cada 45 segundos, ao longo de 20 minutos, usando um leitor de placa espectralfotométrico. A atividade catalítica de sTNALP-FcD10, expressa como uma taxa inicial, foi determinada ajustando o declive mais acentuado para 8 valores sequenciais. Os padrões foram preparados com várias concentrações de sALP-FcD10, e a atividade de ALP foi determinada tal como descrito anteriormente. A curva padrão

foi gerada pela representação gráfica de Log da taxa inicial como função de Log das concentrações dos padrões. A concentração de sTNALP-FcD10 nas diferentes amostras foi lida a partir da curva padrão, usando as suas absorvâncias de ALP respectivas. As medidas de atividade foram transformadas em concentrações de sALP-FcD10, usando uma curva de calibração obtida pela representação gráfica da atividade de concentrações conhecidas de enzima recombinante purificada.

O sobrenadante da cultura foi depois concentrado e submetido a diálise contra PBS, usando filtração de fluxo tangencial e colocado numa coluna MabSelect SuRe™ (GE Health Care), equilibrada com 150 mM de NaCl, 10 mM de PO<sub>4</sub>. As proteínas ligadas à coluna foram eluídas com 50 mM de Tris pH 11, tampão pH 11,0. O pH das frações recolhidas foi ajustado para 8-9 com 200 mM de Tris-HCl pH 5,5. As frações contendo a maior parte do material eluído foram dializadas contra 150 mM de NaCl, tampão com 25 mM de PO<sub>4</sub> de sódio pH 7,4 contendo 0,1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 µM de ZnCl<sub>2</sub> e filtradas com uma membrana de 0,22 µm (Millipore, Millex-GP™), em condições estéreis. O rendimento total do procedimento de purificação foi 50% com um grau de pureza acima dos 95%, como determinado por SDS-PAGE corado com Sypro™ ruby. A preparação de sTNALP-FcD10 purificada foi armazenada a 4°C e permaneceu estável durante vários meses.

A seguinte técnica de purificação também foi testada com sucesso. O sobrenadante da cultura foi concentrado e submetido a diálise contra PBS usando filtração de fluxo tangencial, e colocado numa coluna Proteína A-Sepharose™ (Hi-Trap™ 5 mL, GE Health Care), equilibrada com PBS. As proteínas ligadas à coluna foram eluídas com 100 mM de tampão citrato pH 4,0. As frações recolhidas foram

imediatamente ajustadas para pH 7,5 com 1 M de Tris pH 9,0. As frações contendo a maior parte do material eluído foram submetidas a diálise contra 150 mM de NaCl, tampão 25 mM de PO<sub>4</sub> de sódio pH 7,4 contendo 0,1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 µM de ZnCl<sub>2</sub> e filtradas com uma membrana de 0,22 µm (Millipore, Millex-GP™), em condições estéreis. O rendimento total do procedimento de purificação foi 50% com um grau de pureza acima dos 95%, como determinado por SDS-PAGE corado com Sypro™ ruby. A preparação de sTNALP-FcD10 purificada foi armazenada a 4°C e permaneceu estável durante vários meses.

O número de cópias do gene sTNALP-FcD10 foi aumentado pela cultura das células CHO-DG44194 transfectadas na presença de quantidades aumentadas de metotrexato. Os clones de células resistentes a 100 nM de metotrexato foram isolados e avaliados para a sua capacidade para produzir sTNALP-FcD10 com um rendimento elevado. Os melhores produtores foram adaptados para cultura em suspensão em meio Hyclone™ SFM4CHO™ (nº. catálogo SH30549) na ausência de soro fetal bovino. As culturas que mantiveram um rendimento de produção elevado nestas condições foram transferidas para sacos de biorreator Wave™. O meio (volume total de 25 mL) foi inoculado a uma densidade de  $0,4 \times 10^6$  células por mL. A temperatura do meio de cultura foi mantida a 37°C até a densidade celular atingir  $2 \times 10^6$  células/mL. A temperatura foi então reduzida para 30°C e a cultura foi suplementada com 125 mL de meio genérico para CHO (Sigma C1615). Observou-se que estas condições abrandam a divisão celular e aumentam a secreção de produto no meio de cultura. Estas condições foram mantidas durante 6 dias antes de recolher o sobrenadante da cultura de células contendo a sTNALP-FcD10 secretada.

## **EXEMPLO 2**

**Expressão comparativa de sTNALP-D10 e sTNALP-FcD10**

Os vetores plasmídicos que codificam sTNALP-D10 e sTNALP-FcD10 foram transfectados em células CHO-DG44, usando Lipofectamine™; as células foram cultivadas em meio seletivo (sem nucleótidos), formulado para promover a sobrevivência das células com expressão do gene DHFR, como descrito no Exemplo 1 acima. Os transfectantes estáveis foram isolados por clonagem em placa e classificados de acordo com o seu nível de expressão de proteína, usando o ensaio enzimático de fosfatase alcalina também descrito no Exemplo 1 anterior. O teste permitiu a identificação de um clone para sTNALP-D10 (0,120 pg/célula/dia) e cinco clones para sTNALP-FcD10 (0,377, 0,258, 0,203, 0,099 e 0,088 pg/célula/dia). A amplificação do gene metotrexato (MTX) foi realizada tal como no Exemplo 1 anterior (MTX a variar de 0 a 100 mM), e permitiu um aumento de expressão de 8 vezes para sTNALP-FcD10, ao passo que não foi observada amplificação com as culturas de sTNALP-D10 (ver Figura 4). Usando um processo semelhante para o desenvolvimento de linhas celulares, observou-se, de forma inesperada, que a proteína sTNALP-FcD10 foi mais fácil de expressar em comparação com sTNALP-D10 (ver Figura 4).

**EXEMPLO 3****Caracterização de sTNALP-FcD10**

sTNALP-FcD10 foi primeiro purificada em Proteína A-Sepharose™ e foi analisada em SDS-PAGE em condições redutoras e não redutoras.

Sob condições redutoras, a proteína migrou na forma de uma banda larga com uma massa molecular aparente de ~90.000 Da (DTT+ na Figura 5). A digestão com péptido N-glicosilase F (PNGase F) reduziu a massa molecular aparente da proteína para cerca de 80.000, o que se aproxima bastante da massa calculada de 80.500 Da para o monómero não glicosilado de sTNALP-FcD10 apresentado na Figura 1. A TNALP solúvel no soro, tal como a TNALP presente na forma de proteína ancorada a GPI na superfície exterior de osteoblastos, é uma proteína altamente glicosilada com hidratos de carbono compreendendo  $\leq 20\%$  da massa total da enzima (Farley e Magnusson 2005). Apesar das estruturas de hidratos de carbono específicas em TNALP não terem sido identificadas, estudos de sequências indicam que a enzima possui cinco locais possíveis para glicosilação ligada a N, e estudos bioquímicos mostraram evidências de hidratos de carbono, ligados a N e a O (Nosjean et al. 1997). De acordo com estas primeiras observações, a migração electroforética de sTNALP-FcD10 e a sua sensibilidade a PNGase F sugerem que se trata também de uma proteína altamente glicosilada. TNALP solúvel no soro, assim como TNALP presente como proteína ancorada a GPI na superfície exterior de osteoblastos, é uma proteína altamente glicosilada com hidratos de carbono compreendendo  $\leq 20\%$  da massa total da enzima (Farley e Magnusson 2005).

Quando o SDS-PAGE foi repetido em condições não redutoras, observou-se que a massa molecular aparente de sTNALP-FcD10 era de 200.000 (DTT- na Figura 5), consistente com a de um homodímero, como em TNALP nativa não alterada (Millán 2006). Este homodímero resulta provavelmente da formação de duas pontes bissulfito entre duas regiões Fc monoméricas (painel superior direito, Figura 5).

A massa molecular de sTNALP-FcD10 purificada em condições nativas foi seguidamente avaliada usando cromatografia FPLC de exclusão molecular numa coluna Sephacryl™ S-300 (GE Health Care), equilibrada com 150 mM de NaCl, 20 mM de tampão Tris pH 7,5. A coluna foi previamente calibrada com um kit de proteína padrão (kit de calibração HMW, GE Health Care) (painel inferior esquerdo, Figura 5).

As frações recolhidas da cromatografia foram testadas para a atividade enzimática de fosfatase alcalina e o material em cada pico. De forma surpreendente, 78% do material eluiu numa posição correspondendo a proteínas de 370 kDa (painel inferior esquerdo, Figura 5), sugerindo uma forma em tetrâmero para a enzima recombinante sTNALP-FcD10 nativa produzida em células CHO. Quando as frações da coluna Sephacryl™ S-300 foram testadas para atividade, toda a atividade enzimática foi associada com a fração de 370 kDa. O material restante apresentou um peso molecular muito superior, indicando a formação de alguns agregados de sTNALP-FcD10. Ambas a forma tetramérica, a qual não pode ser observada em SDS-PAGE porque este destrói a ligação não covalente que mantém o tetrâmero ligado, e a forma em agregados foram resolvidas como monómeros de sTNALP-FcD10 com um peso molecular aparente de 90.000 por SDS-PAGE em condições redutoras (DTT+, painel inferior da direita na Figura 5), e como dímeros com um peso molecular aparente de 200.000 em condições não redutoras (DTT-, painel inferior direito na Figura 5). A sTNALP-FcD10 recombinante parece consistir principalmente em homotetrâmeros enzimaticamente funcionais formados por uma associação não covalente de dois dímeros de sTNALP-FcD10 ligados por dissulfito.

A estrutura em tetrâmero de sTNALP-FcD10 foi ainda testada por digestão limitada por papaína (Figuras 6-8). Sabe-se

que esta protease cliva cadeias pesadas de IgG perto da região flexível e na extremidade N-terminal das ligações dissulfito, gerando assim fragmentos Fab monoméricos inteiros e dímeros Fc diméricos ligados por dissulfito. A digestão de sTNALP-FcD10 deve assim libertar dímeros de sTNALP-FcD10 enzimaticamente ativos dos domínios Fc intactos (ver Figura 6).

As alíquotas contendo 400 µg de sTNALP-FcD10 foram digeridas com 208 mM de agarose de papaína (Sigma) num tampão fosfato 20 mM (pH 7,0), contendo 250 µM de ditiotreitól. Deixou-se a digestão prosseguir a 37°C durante 1 hora em agitação suave. A reação foi parada removendo as contas de agarose de papaína por centrifugação. Nestas condições, não se verificou perda significativa da atividade enzimática de sTNALP-FcD10 durante as primeiras 4 horas de incubação. A sTNALP-FcD10 incubada durante 1 hora na presença ou ausência de agarose de papaína foi seguidamente analisada por SEC-HPLC em TSK-Gel G3000WXL (Tosoh Bioscience), em condições não desnaturantes.

A Figura 7 mostra que o principal produto eluído com um Mr aparente de 370 kDa já não foi observado após uma digestão de 1 hora com papaína. Nestas condições, a digestão com papaína leva à formação de dois fragmentos de 135 kDa e 62 kDa, respetivamente. Um pico menor com Mr de 35 kDa também foi observado.

Em condições SDS-PAGE redutoras (DTT+, Figura 8), o produto da amostra não tratada com papaína foi resolvido numa banda principal (102 kDa) (DTT+, papaína-), a qual se mostrou previamente que corresponde a sTNALP-FcD10 monomérica. Em Western blots, esta banda pode de facto, ser corada com

anticorpos para TNALP e para o domínio Fc da molécula de IgG<sub>1</sub> (não mostrado). Depois da digestão com papaína, esta banda é clivada em dois fragmentos principais: 1) a banda com 32 kDa, a qual se liga ao anticorpo anti-Fc mas não ao anticorpo anti-TNALP, e se propõe que corresponde ao fragmento FcD10; e 2) a banda de proteína larga e difusa (66 - 90 kDa), a qual pode ser corada com o anticorpo anti-TNALP mas não com o anticorpo anti-Fc, e por isso se pensa que corresponde a monómeros do ectodomínio de TNALP. A heterogeneidade deste material é presumivelmente devida à sua glicosilação e pode ser reduzida por digestão com péptido N-glicosidase F, a qual também diminui a sua massa molecular aparente para 52 kDa (resultados não mostrados);

Em condições não redutoras (DTT-, Figura 8), observou-se que a sTNALP-FcD10 incubada sem papaína migra em SDS-PAGE como uma proteína de 216 kDa (DTT-, papaína-, Figura 8). A análise por Western blot também demonstra que esta proteína contém epítomos para os grupos TNALP e Fc (resultados não mostrados). Foi previamente proposto que esta espécie molecular consiste em dímeros sTNALP-FcD10 ligados por dissulfito. Tal como em condições redutoras, a clivagem por papaína em condições não redutoras (DTT-, papaína+) leva à formação de dois fragmentos. Em Western blots, o fragmento de 55 kDa pode ser corado com o anticorpo anti-Fc mas não com o anticorpo anti-TNALP. Este fragmento é muito provavelmente idêntico à forma de 62 kDa observada em SEC-HPLC em condições nativas, e é proposto que corresponde a dímeros de Fc ligados por dissulfito. A outra forma principal migra da mesma forma que a principal banda de proteína (66-90 kDa) observada em condições redutoras. Isto é consistente com o facto de ser constituída por monómeros de ectodomínio de TNALP. Quando analisados por HPLC em condições não desnaturantes, estes monómeros estão

associados de forma não covalente nos dímeros de TNALP enzimaticamente ativos, eluindo da coluna SEC como a forma de 135 kDa.

#### **EXEMPLO 4**

##### **Afinidade comparada para hidroxiapatite da proteína sTNALP-FcD10 e sALP de rim bovino**

A afinidade da proteína sTNALP-FcD10 purificada para hidroxiapatite também foi comparada com a fosfatase alcalina solúvel de rim bovino (tecidual não específica) (Calzyme), usando o seguinte procedimento. A TNALP de rim bovino foi usada em vez de TNALP óssea humana porque se encontrava disponível comercialmente. Contas de hidroxiapatite cerâmicas (Biorad) foram primeiro solubilizadas em 1 M de HCl e o mineral foi precipitado alterando o pH da solução para 7,4 com 10 N de NaOH. A ligação a este mineral reconstituído foi realizada pela incubação de alíquotas da suspensão mineral contendo 750 µg de mineral com 5 µg de proteína em 100 µL de NaCl 150 mM, tampão fosfato 80 mM pH 7,4. As amostras foram mantidas a  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 30 minutos numa roda de rotação. O mineral foi centrifugado por centrifugação a baixa velocidade e a atividade enzimática total recuperada no pellet mineral e no sobrenadante foi medida. A Figura 9 mostra claramente que a sTNALP-FcD10 se liga de forma mais eficiente ao mineral hidroxiapatite reconstituído, que a TNALP de rim bovino. Adicionalmente, a maior parte da proteína sTNALP-FcD10 recombinante introduzida no ensaio foi recuperada pela soma da atividade enzimática recuperada na fração ligada e na fração não ligada. Isto indica que a ligação da proteína recombinante à fase de mineral reconstituído não altera significativamente a sua atividade enzimática.

## **EXEMPLO 5**

### **Modelo de rato**

Os ratos  $Akp2^{-/-}$  foram criados pela inserção de uma cassete Neo no exão VI do gene TNALP do rato ( $Akp2$ ), via recombinação homóloga (Narisawa et al. 1997; Fedde et al. 1999). Esta mutação levou à inativação do gene  $Akp2$  e o ARNm e a proteína de TNALP não são detectados nestes ratos knockout (Narisawa et al. 1997). Fenotipicamente, os ratos  $Akp2^{-/-}$  recapitulam HPP pré-infantil grave. Estes ratos não apresentam um fenótipo de hipofosfatasia óbvio à nascença, aparecendo os defeitos esqueléticos normalmente por volta do dia 6, e pioram posteriormente. Eles apresentam crescimento atrofiado com raquitismo, desenvolvem convulsões epiléticas e apneia, e observou-se que morrem entre os dias 12 e 16 após o nascimento. Tal como os doentes com HPP, os ratos  $Akp2^{-/-}$  exibem hipofosfataseemia devido a uma deficiência global na atividade de TNALP, acumulação endógena dos substratos de ALP, PPi, PLP e PEA, e sofrem de mineralização comprometida da matriz esquelética, levando a raquitismo e osteomalacia (Fedde et al. 1999).

Para compreender como os defeitos na fosfatase alcalina podem levar a manifestações neurológicas em humanos e ratos, é preciso rever o papel e metabolismo da vitamina B6 no SNC. A vitamina B6 é um nutriente importante que serve como cofator para pelo menos 110 enzimas, incluindo as enzimas envolvidas na biossíntese dos neurotransmissores ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), dopamina e serotonina. A vitamina B6 pode ser encontrada em três formas livres (provitamina), isto é, piridoxal (PL), piridoxamina (PM) e piridoxina (PN), sendo que todas podem ser fosforiladas

para os derivados 5'-fosforilados correspondentes, PLP, PMP e PNP (Jansonius 1998). A remoção do grupo fosfato é uma função de ALP, e principalmente da isoenzima TNALP (Whyte 2001). Uma vez que apenas provitaminas desfosforiladas podem ser transportadas para as células, a atividade diminuída de TNALP em hipofosfatasia resulta num aumento significativo em PLP plasmático (Whyte et al. 1985; Whyte 2001) e deficiência intracelular de PLP nos tecidos periféricos e sistema nervoso central, onde leva a níveis cerebrais reduzidos de GABA. Também foi considerado que as convulsões epiléticas observadas nestes animais resultam da disfunção da ácido glutâmico descarboxilase, devido à falta de PLP (Waymire et al. 1995).

O suplemento de piridoxina inibe as convulsões epiléticas em ratos  $Akp2^{-/-}$ , mas prolonga a sua sobrevivência apenas alguns dias, até aos dias 18-22 após o nascimento (Narisawa et al. 2001). Assim, deu-se livre acesso a todos os animais neste estudo (reprodutores, mãe de aleitamento, filhotes e desmamados) a uma dieta de roedor de laboratório modificada 5001 com níveis aumentados (325 ppm) de piridoxina.

Os ratos  $Akp2^{-/-}$  (base híbrida 12,5% C57BL/6 - 87,5% 129J) foram mantidos por criação heterozigótica. Animais, pares reprodutores ou mãe de aleitamento com os seus filhotes, foram acomodados numa caixa de plástico com fundo sólido, equipada com um sistema automático de fornecimento de água. Todos os animais tinham acesso livre a uma dieta de roedor de laboratório modificada 5001 com 325 ppm de piridoxina (#48057, TestDiet™). As concentrações máximas permitidas de contaminantes na dieta (por exemplo, metais pesados, aflatoxina, organofosfato, hidrocarbonetos clorados, PCBs) foram asseguradas pelos fabricantes. Não estavam presentes

contaminantes conhecidos no material alimentar para influenciar a toxicidade do artigo de teste.

#### **EXEMPLO 6**

### **Farmacocinética e distribuição tecidual de sTNALP-FcD10 injetada em ratos tipo selvagem**

#### **Recolha de amostras de sangue**

As amostras de sangue foram recolhidas em tubos de heparina de lítio (VWR, #CBD365958), colocadas em gelo durante um período máximo de 20 minutos antes de centrifugação a 2500 g durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Pelo menos 15 µL de plasma foram transferidos para um tubo de 0,5 mL (Sarstedt, #72.699), congelados em azoto líquido e armazenados a -80°C até à realização do ensaio. Se disponível, outros  $\leq 50$  µL de plasma foram transferidos para um tubo de 0,5 mL, inativados a 65°C durante 10 minutos, congelados em azoto líquido e armazenados a -80°C até à realização do ensaio. Qualquer plasma restante foi misturado com a alíquota de 15 µL, congelado em azoto líquido e armazenado a -80°C até à realização do ensaio.

#### **Determinação de sTNALP-FcD10 no plasma**

A presença de sTNALP-FcD10 nas amostras de plasma foi estudada depois do fim do tratamento, usando um ensaio enzimático colorimétrico. A atividade enzimática foi determinada usando um substrato cromogénico, onde o aumento de absorvância é proporcional à conversão do substrato em produtos. A reação foi realizada em 100 µL de tampão 50 mM NaCl, tampão 20 mM Bis Tris Propano (HCl) pH 9 contendo 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 50 mM ZnCl<sub>2</sub>, ao qual foram adicionados 10 µL de amostra de plasma diluída. O substrato de APL, p-

nitrofenil foi adicionado no fim, a uma concentração final de 1 mM para iniciar a reação. A absorvância foi registrada a 405 nm, a cada 45 segundos ao longo de um período de 20 minutos, usando um leitor de placas Spectramax™ 190 (Molecular devices). A atividade enzimática de sTNALP-FcD10 expressa como uma taxa inicial de reação, foi determinada ajustando o declive mais acentuado ao longo de 8 valores de leitura adjacentes. Os padrões foram preparados com diferentes concentrações do artigo de teste, e a atividade enzimática foi determinada tal como descrito anteriormente no Exemplo 1. A curva padrão foi gerada pela representação gráfica de Log da taxa inicial como função de Log das quantidades dos padrões. A concentração de sTNALP-FcD10 das diferentes amostras de plasma foi lida diretamente a partir da curva padrão, usando a sua atividade enzimática respectiva.

#### **Determinação de PPi no plasma**

Os níveis de PPi em circulação foram medidos no soro obtido a partir da punção cardíaca, usando adsorção diferencial em carvão ativado de UDP-D-[6-<sup>3</sup>H]glicose (Amersham Pharmacia), a partir do produto de reação de 6-fosfo[6-<sup>3</sup>H]gluconato, tal como previamente descrito (Johnson et al. 1999).

#### **Meia vida e distribuição tecidual de sTNALP-FcD10**

**Em ratos tipo selvagem adultos**, foi determinada a meia vida e distribuição tecidual de sTNALP-FcD10 injetada em ratos. A Figura 10 sumariza a sua farmacocinética e distribuição tecidual após uma única injeção bolus intravenosa de 5 mg/kg em ratos tipo selvagem adultos.

A meia vida foi de 34 h no sangue com uma acumulação da sTNALP-FcD10 marcada com [ $^{125}$ I] no osso de, no máximo, 1  $\mu$ g/g de osso (peso húmido). Esta meia-vida é comparável à observada previamente em ensaios clínicos descritos, que não tiveram sucesso. Os níveis de material dirigido ao osso pareceram bastante estáveis, uma vez que não se observou diminuição significativa em sTNALP-FcD10 marcada radioativamente durante a experiência. Não foi observada acumulação de sTNALP-FcD10 no músculo, uma vez que a quantidade de enzima marcada radioativamente diminuiu neste tecido em paralelo com a atividade enzimática de sTNALP-FcD10 no sangue.

**Em ratos recém-nascidos.** Uma vez que os ratos Akp2<sup>-/-</sup> morrem entre 12-16 dias e injeção i.v. não é possível em ratos tão novos, a análise farmacocinética de sTNALP-FcD10 no soro foi repetida usando as vias i.p. e s.c. em ratos tipo selvagem recém-nascidos, usando uma dose de 3,7 mg/kg. Observou-se que a via i.p. era inadequada devido à pressão elevada na cavidade abdominal, levando a perdas imprevisíveis através do local de injeção (Figura 11A). A via s.c. foi mais reprodutível em ratos recém-nascidos, tal como observado na experiência de PK da Figura 11B. Os parâmetros farmacocinéticos de sTNALP-FcD10 em ratos recém-nascidos e adultos são apresentados na Tabela 2 a seguir.

**Tabela 2: Parâmetros farmacocinéticos de sTNALP-FcD10 em ratos tipo selvagem recém-nascidos**

| Parâmetro                   | Recém-nascido |      |
|-----------------------------|---------------|------|
|                             | s.c.          | i.p. |
| T <sub>1/2</sub> (h)        | 31            | 19   |
| T <sub>max</sub> (h)        | 6             | 6    |
| C <sub>max</sub> (mg/L)     | 5             | 3    |
| AUC <sub>inf</sub> (mg/L/h) | 257           | 92   |

Estes resultados de PK, analisados pelo software WinNonlin<sup>TM</sup> (Pharsight Corporation, Mountain View, CA), foram usados

para prever os níveis em circulação no sangue de sTNALP-FcD10, obtidos após injeções s.c. diárias repetidas. sTNALP-FcD10 em circulação atingiu concentrações no soro no estado de equilíbrio oscilando entre valores de Cmin e Cmax de 26,4 e 36,6 µg/mL, respectivamente (Figura 12). O estado de equilíbrio foi atingido após 5 a 6 doses diárias de 10 mg/kg.

A validade das previsões foi testada experimentalmente após 5 injeções diárias de 10 mg/kg de sTNALP-FcD10. No dia da injeção, o genótipo dos ratos não pode ser distinguido. Foi mais tarde determinado quais dos ratos testados eram heterozigóticos ou homozigóticos. Não houve diferença no comportamento de todos os diferentes genótipos. Quando a atividade de ALP em circulação foi medida 24h após a última injeção, nomeadamente no dia 6, (Cmin), observou-se uma boa relação entre as concentrações experimentais e previstas (Figura 13). Nestes animais com 5 dias de idade não tratados, os níveis de TNALP no soro foram de 0,58 µg/mL. Estes níveis irão diminuir com a idade. Assim, foi calculado que o regime de injeção permitiu a acumulação de concentrações de sTNALP-FcD10 no soro para o estado de equilíbrio, aproximadamente 50 vezes maiores do que as concentrações de TNALP normal.

#### **EXEMPLO 7**

##### **Concentração de sTNALP-FcD10 nos ossos de ratos tipo selvagem adultos após administração intravenosa em bolus**

Uma dose de 5 mg/kg de sTNALP-FcD10 foi administrada i.v. a ratos tipo selvagem adulto 129J. A concentração de sTNALP-FcD10 no osso a T=25 horas foi como se segue: 0,64 µg/g na calvaria; 1,33 µg/g nas tíbias; e 1,37 µg/g nos fêmures,

para uma concentração média de 1,1 µg/g. Em ratazanas, o tecido ósseo representa 16,3% da massa total. É esperado que esta percentagem também seja encontrada no rato. O peso corporal dos ratos usados nesta experiência foi de 18,4 g. O peso calculado do tecido ósseo destes ratos foi assim de cerca de  $18,4 \text{ g} \times 0,163 = 3,00 \text{ g}$ . A quantidade calculada de sTNALP-FcD10 nos tecidos ósseos foi de 3,33 µg. A percentagem da dose injetada nos tecidos ósseos foi assim de  $(3,33 \text{ µg} / (5 \text{ µg/g} \times 18,4 \text{ g}) \times 100 = 4\%$ .

A concentração de sTNALP-FcD10 no osso a T=96 horas foi como se segue: 0,83 µg/g na calvaria; 1,33 µg/g nas tíbias; e 1,63 µg/g nos fêmures, para uma concentração média de 11,26 µg/g. O peso corporal dos ratos usados nesta experiência foi de 17,8 g. O peso calculado do tecido ósseo destes ratos foi assim de cerca de  $17,8 \text{ g} \times 0,163 = 2,90 \text{ g}$ . A quantidade calculada de sTNALP-FcD10 nos tecidos ósseos foi de 3,66 µg. A percentagem da dose injetada nos tecidos ósseos foi assim de  $(3,66 \text{ µg} / (5 \text{ µg/g} \times 17,8 \text{ g}) \times 100 = 4\%$ .

### **EXEMPLO 8**

#### **Concentração de sTNALP-FcD10 nos ossos de ratos tipo selvagem recém-nascidos 15 dias após injeção subcutânea em bolus**

Uma dose de 4,3 mg/kg de sTNALP-FcD10 foi administrada s.c. a ratos tipo selvagem 129J recém-nascidos todos os dias durante 15 dias, para uma quantidade administrada total de 65 mg/kg. A concentração de sTNALP-FcD10 no osso a T=24 horas foi como se segue: 6,45 µg/g na calvaria; 3,05 µg/g nas tíbias; e 3,71 µg/g nos fêmures, para uma concentração média de 4,40 µg/g. O peso corporal dos ratos usados nesta experiência foi de 9,83 g. O peso calculado do tecido ósseo

destes ratos foi assim de cerca de  $9,83 \text{ g} \times 0,163 = 1,60 \text{ g}$ . A quantidade calculada de sTNALP-FcD10 nos tecidos ósseos foi de  $7,04 \mu\text{g}$ . A percentagem da dose injetada nos tecidos ósseos foi assim de  $(7,04 \mu\text{g} / (65 \mu\text{g/g} \times 9,83 \text{ g}) \times 100 = 1\%$ .

A concentração de sTNALP-FcD10 no osso a T=168 horas foi como se segue:  $5,33 \mu\text{g/g}$  na calvaria;  $1,37 \mu\text{g/g}$  nas tíbias; e  $1,88 \mu\text{g/g}$  nos fêmures, para uma concentração média de  $2,86 \mu\text{g/g}$ . O peso corporal dos ratos usados nesta experiência foi de  $14,0 \text{ g}$ . O peso calculado do tecido ósseo destes ratos foi assim de cerca de  $14,0 \text{ g} \times 0,163 = 2,28 \text{ g}$ . A quantidade calculada de sTNALP-FcD10 nos tecidos ósseos foi de  $6,52 \mu\text{g}$ . A percentagem da dose injetada nos tecidos ósseos foi assim de  $(6,52 \mu\text{g} / (65 \mu\text{g/g} \times 14 \text{ g}) \times 100 = 0,7\%$ . A Tabela 3 sumariza os resultados dos Exemplos 7 e 8.

**Tabela 3: Concentração média de sTNALP-FcD10 e percentagem de dose injetada nos ossos**

| Experiência                                           | Regime de injeção       | Concentração média nos ossos (µg/g tecido húmida) |                          | % de dose injetada nos ossos |                          |
|-------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| bolus IV                                              | 1 x 5 mg/kg (bolus)     | T = 25 h <sup>(1)</sup>                           | T = 96 h <sup>(1)</sup>  | T = 25 h <sup>(1)</sup>      | T = 96 h <sup>(1)</sup>  |
|                                                       |                         | 1,11                                              | 1,26                     | 4%                           | 4%                       |
| bolus SC ao longo de 15 dias                          | 15 x 4,3 mg/kg (diário) | T = 24 h <sup>(1)</sup>                           | T = 168 h <sup>(1)</sup> | T = 24 h <sup>(1)</sup>      | T = 168 h <sup>(1)</sup> |
|                                                       |                         | 4,40                                              | 2,86                     | 1%                           | 0,7%                     |
| <sup>(1)</sup> tempos indicados são da última injeção |                         |                                                   |                          |                              |                          |

## **EXEMPLO 9**

### **Eficácia a curto prazo (15 dias) de doses baixas (1 mg/kg) de sTNALP-FcD10 para HPP em ratos Akp2<sup>-/-</sup>**

Injeções s.c. diárias de sTNALP-FcD10 foram realizadas durante 15 dias em ratos Akp2<sup>-/-</sup>, usando 1 mg/kg. Os grupos de tratamento foram constituídos a partir de 19 ninhadas.

Os ratos Akp2<sup>-/-</sup> receberam veículo (N=13) ou sTNALP-FcD10 (N=12). Os controlos consistiram em 15 ratos tipo selvagem (um por ninhada). Os controlos não foram submetidos a injeções. Foi recolhido sangue 24h após a última injeção como descrito no Exemplo 6.

A Figura 14 mostra que as atividades enzimáticas no soro ao dia 16 foram pouco acima do limite de deteção. Apesar de valores de soro baixos para sTNALP-FcD10, os níveis de PPI no soro foram corrigidos (Figura 15). Ratos Akp2<sup>-/-</sup> não tratados tinham concentrações de PPI no soro de  $1,90 \pm 0,64$   $\mu\text{mol/mL}$ , ao passo que ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados tinham níveis de  $1,41 \pm 0,30$   $\mu\text{mol/mL}$ , comparável com os níveis de ratos tipo selvagem ( $1,52 \pm 0,35$   $\mu\text{mol/mL}$ ).

As placas de crescimento da tíbia proximal apresentaram algum alargamento da zona hipertrófica em animais Akp2<sup>-/-</sup> em comparação com animais tipo selvagem (comparar veículo com tipo selvagem na Figura 16). A mesma observação feita anteriormente nesta estirpe de ratos Akp2<sup>-/-</sup> (Hessle et al. 2002) é consistente com raquitismo. Uma tendência no sentido da normalização da morfologia da fise foi observada nos animais tratados com sTNALP-FcD10 durante 15 dias (Figura 17), em comparação com veículo (não tratado).

#### **EXEMPLO 10**

**Eficácia a curto prazo (15 dias) de doses elevadas (8,2 mg/kg) de sTNALP-FcD10 para HPP em ratos Akp2<sup>-/-</sup>**

Para avaliar 15 dias de injeções s.c. diárias, usando uma dose significativamente mais elevada de sTNALP-FcD10 (8,2 mg/kg) no crescimento e mineralização óssea, foram usados ratos de 20 ninhadas (141 ratos no total). Eles foram

distribuídos em dois grupos: 1) ratos  $Akp2^{-/-}$  aos quais foi administrado veículo (N=19); 2) ratos  $Akp2^{-/-}$  tratados com sTNALP-FcD10 (N=20); adicionalmente, houve um rato tipo selvagem por ninhada, não tratado (N=18).

### **Peso corporal**

Os ratos  $Akp2^{-/-}$  cresceram mais devagar do que os ratos tipo selvagem. No dia 1, não foi observada qualquer diferença estatística nos pesos corporais nos animais tipo selvagem, tratados com veículo ou com sTNALP-FcD10. Contudo, os pesos corporais médios diários divergiram no dia 6 (Figura 18). A diferença entre tipo selvagem ( $4,2 \pm 0,6$  g) e veículo ( $3,7 \pm 0,7$  g) foi estatisticamente significativa ( $p=0,0217$ ) no dia 6; mas a diferença entre os valores de ratos tratados com veículo ( $5,9 \pm 1,0$  g) e sTNALP-FcD10 ( $6,7 \pm 1,0$  g) foi estatisticamente significativa no dia 11 ( $p=0,04$ ), com o grupo tratado paradoxalmente mais pesado do que o grupo tipo selvagem. Ao dia 16, o peso corporal médio dos animais tratados ( $8,2 \pm 1,1$  g) e tipo selvagem ( $8,4 \pm 0,8$  g) não foram estatisticamente diferentes. Os animais tratados com sTNALP-FcD10 apresentaram pesos corporais estatisticamente maiores ( $p=0,026$ ) do que os animais tratados com veículo ( $6,6 \pm 1,4$  g). Não foi observada qualquer diferença significativa entre os grupos ERT e tipo selvagem para o peso corporal em qualquer ponto no tempo.

### **Comprimento dos ossos**

No fim desta experiência (dia 16), o comprimento da tíbia forneceu uma medida adicional do benefício esquelético para ratos  $Akp2^{-/-}$ . O comprimento da tíbia com ERT foi  $12,6 \pm 0,7$  mm e mais longo ( $p=0,0135$ ), em comparação com os animais aos quais foi administrado veículo ( $11,7 \pm 1,1$  mm) (Figura

19). Uma diferença estatística ( $p=0,0267$ ) também foi obtida quando o comprimento do fêmur foi comparado entre os grupos sTNALPS-FcD10 ( $9,2 \pm 0,4$  mm) e veículo ( $8,6 \pm 0,8$  mm). Não se observou diferença estatística para o comprimento do comprimento da tíbia ou fêmur dos ratos ERT em comparação com os ratos tipo selvagem. Uma preservação parcial (ou seja, prevenção parcial de redução no crescimento ósseo, que se torna visível cerca das 2 semanas de idade) do crescimento da tíbia e fêmur foi observada pelas medições do comprimento na altura da necropsia (Figura 19).

Em todos os animais, exceto em 5, foram encontrados níveis de sALP-FcD10 no plasma de ratos Akp2<sup>-/-</sup>, detetáveis, mas altamente variáveis, ao dia 16 (Figura 20). As concentrações de TNALP em circulação em animais normais são dadas para fins de comparação.

### **Mineralização óssea**

Avaliações cegas de imagens de Faxitron™ dos pés e da caixa torácica, identificaram dois graus de gravidade dos defeitos de mineralização nos ratos Akp2<sup>-/-</sup> (Figura 21). Os ratos muito afetados (Grave) apresentaram ausência de ossos digitais (falanges) e centros de ossificação secundária. Ratos afetados moderadamente (Moderado) apresentaram centros de ossificação secundária anormais, mas todos os ossos digitais estavam presentes. Os ratos tipo selvagem (Saudável) tinham todas as estruturas ósseas presentes, com arquitetura normal. Imagens radiográficas dos membros posteriores foram igualmente classificadas como anormais, no caso de haver evidência de fraturas crônicas ou agudas, ou saudáveis na ausência de qualquer observação anormal (Figura 21). Os defeitos de mineralização minimizados por ERT nos pés, documentados pelo número de ratos Akp2<sup>-/-</sup> com

defeitos severos, consistindo em 5 no grupo não tratado, e 0 no grupo tratado com ERT (Tabela na Figura 21). O teste de Chi-Square foi significativo ( $p \leq 0,05$ ), indicando que ERT diminuiu a gravidade dos defeitos ósseos adquiridos. Uma vez que os doentes gravemente afetados com HPP pré-infantil morrem frequentemente devido a costelas sub-mineralizadas e fraturadas, incapazes de sustentar a respiração, os caixas torácicas também foram cuidadosamente examinadas. ERT também diminuiu a incidência de caixas torácicas dismórficas (Tabela na Figura 21). A análise de Chi-Square foi significativa  $p \leq 0,025$ . De forma semelhante, os membros posteriores tinham uma aparência saudável em todos os animais tratados (Tabela na Figura 21). A análise de Chi-Square foi significativa  $p \leq 0,025$ .

### **Defeitos nos dentes**

As mandíbulas de ratos com 16 dias de idade foram fixadas por imersão durante a noite em solução de aldeído cacodilato de sódio e cortadas em segmentos contendo o primeiro molar, o incisivo subjacente e o osso alveolar circundante. As amostras foram desidratadas através de uma série de álcoois de diferentes graus, e infiltradas com resina acrílica (LR White) ou epoxi (Epon 812), seguido de polimerização dos blocos de resina contendo o tecido, a 55°C durante 2 dias. Secções finas (1  $\mu$ m) foram cortadas com um ultra-micrómetro, usando uma lâmina de diamante, e as secções montadas em lâminas de vidro foram coradas para mineral usando 1% de nitrato de prata (coloração von Kossa, preto) e um corante de contraste com 1% de azul de toluidina. As secções frontais através das mandíbulas (ao mesmo nível da raiz mesial do primeiro molar) forneceram molares seccionados longitudinalmente e incisivos

seccionados transversalmente para análises histológicas de comparação.

A observação histológica dos dentes dos ratos  $Akp2^{-/-}$  mostra tecido de dentina fracamente mineralizado, e muito pouco cimento entre o ligamento periodontal e a dentina, em comparação com os animais tipo selvagem (Figura 22, comparar  $Akp2^{-/-}$  veículo e tipo selvagem - normal). A mineralização da dentina restaurada e a formação do cimento também é mostrado na Figura 22 ( $Akp2^{-/-}$  tratado versus tipo selvagem - normal).

### **EXEMPLO 11**

**Eficácia a longo prazo (52 dias) de doses elevadas (8,2 mg/kg) de sTNALP-FcD10 para HPP em ratos  $Akp2^{-/-}$**

Finalmente, para avaliar a sobrevivência a longo prazo e mineralização óssea em ratos  $Akp2^{-/-}$ , foi administrado sTNALP-FcD10 (8,2 mg/kg) ou veículo, diariamente durante 52 dias (injeções s.c.).

### **Sobrevivência, atividade e aparência dos ratos**

Ratos não tratados apresentaram uma sobrevivência mediana de 18,5 dias (Figura 23), ao passo que a sobrevivência aumentou dramaticamente com ERT e este tratamento também preveniu a atividade normal e a aparência saudável (Figura 24) dos ratos tratados.

### **Mineralização óssea**

Radiografias dos pés de ratos  $Akp2^{-/-}$  com 16 dias de idade apresentaram defeitos de ossificação secundária que são uma

característica da doença (ver Figura 25). Estes defeitos foram prevenidos em todos os ratos tratados através de doses diárias de sTNALP-FcD10 durante 46 ou 53 dias (Figura 25).

### **Atividade de ALP**

Os níveis de atividade de ALP no plasma foram medidos em ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados após 53 dias. A Figura 26 mostra que os valores foram entre 1 e 4 µg/mL de atividade de ALP. Três animais, contudo, apresentaram níveis indetetáveis de ALP.

Curiosamente, ao contrário dos ratos tipo selvagem, em que uma concentração de equilíbrio no soro de sTNALP-FcD10 foi atingida, foi medida uma grande variedade de níveis de ALP no soro nos ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados.

### **EXEMPLO 12**

#### **Eficácia a longo prazo de diferentes intervalos de dosagem de sTNALP-FcD10 em ratos Akp2<sup>-/-</sup>**

Ratos Akp2<sup>-/-</sup> recém-nascidos foram injetados com 4,3 mg/kg diários (Tx-1), 15,2 mg/kg a cada 3 dias (Tx-3) ou 15,2 mg/kg a cada 7 dias (Tx-7) de sTNALP-FcD10. Prosseguiu-se com o tratamento durante 43 dias e os ratos foram sacrificados no dia 44, nomeadamente 24 horas depois da última injeção. Eles foram monitorizados para avaliar alguma melhoria na sua sobrevivência e mineralização esquelética.

### **Sobrevivência dos ratos**

A sobrevivência dos ratos tratados foi aumentada em comparação com os ratos que foram injetados com veículo (Figura 27). Este aumento foi estatisticamente significativo ( $p < 0,0001$ ). Não se encontrou diferença estatisticamente significativa quando as curvas de sobrevivência dos grupos tratados foram comparadas entre elas.

### **Mineralização óssea**

Para cada tratamento, as radiografias dos pés foram analisadas e distribuídas entre normal e anormal. Números e percentagens (em parênteses) aparecem na Tabela 4 a seguir. Os defeitos de mineralização óssea foram avaliados ao dia 23 e no fim do estudo (dia 23-45).

**Tabela 4: Distribuição das radiografias dos pés**

|                            |             |            |
|----------------------------|-------------|------------|
| Estudo intermédio (dia 23) |             |            |
| Grupo                      | Anormal (%) | Normal (%) |
| Tx-1 (N=18)                | 6 (33)      | 12 (67)    |
| Tx-3 (N=19)                | 4 (21)      | 15 (79)    |
| Tx-7 (N=20)                | 10 (50)     | 10 (50)    |
| Tipo selvagem (N=32)       | 0 (0)       | 32 (100)   |
| B)                         |             |            |
| D23-45                     |             |            |
| Grupo                      | Anormal (%) | Normal (%) |
| Tx-1 (N=18)                | 3 (17)      | 15 (83)    |
| Tx-3 (N=19)                | 0 (0)       | 19 (100)   |
| Tx-7 (N=20)                | 3 (15)      | 17 (85)    |
| Tipo selvagem (N=31)       | 0 (0)       | 31 (100)   |

No estudo intermédio, sTNALP-FcD10 administrada a 15,2 mg/kg a cada 3 dias, normalizou os defeitos de mineralização óssea em 79% dos ratos. Esta taxa de normalização aproximou-se da significância estatística quando comparada com os 50% de taxa de normalização avaliada nos ratos tratados com 15,2 mg/kg a cada 7 dias (Chi Square;  $p = 0,0596$ ). Nenhuma outra comparação entre tratamentos foi estatisticamente significativa ou se aproximou da significância.

No fim do estudo, a percentagem de normalização aumentou em todos os grupos tratados, em comparação com a percentagem de normalização avaliada ao dia 23. O teste Chi Square comparando a distribuição entre todos os tratamentos com sTNALP-FcD10 não foi significativa ( $p=0,1844$ ). A taxa de normalização de 100% observada nos ratos tratados a cada 3 dias aproximou-se da significância estatística, quando comparada com a taxa em ratos tratados diariamente (83%,  $p=0,0634$ ) ou a cada 7 dias (85%,  $p=0,0789$ ).

Contudo, em todos os grupos de tratamento, uma proporção significativa dos animais classificada como anormal ao dia 23, melhorou e tornou-se normal no fim do estudo. No grupo de tratamento diário, 3 de 6 animais normalizaram; nos ratos tratados a cada 3 dias, 4 de 4 melhoraram, e finalmente no grupo de tratamento semanal, 7 de 10 tornaram-se normais. Apesar dos intervalos de dosagem fornecerem resultados satisfatórios, os melhores resultados foram obtidos quando a quantidade diária administrada resultante foi mais elevada.

### **EXEMPLO 13**

#### **Eficácia a longo prazo de doses elevadas (8,2 mg/kg) de sTNALP-FcD10 em ratos Akp2<sup>-/-</sup> com 15 dias de idade**

Estudos de eficácia tal como descrito no Exemplo 11 foram conduzidos em ratos com 15 dias de idade, os quais começaram a manifestar defeitos esqueléticos, tal como observado em imagens de raios-X dos pés (ver Exemplo 11, Figura 25). sTNALP-FcD10 foi administrada até ao fim do estudo. Os animais foram monitorizados para avaliar melhorias na sua sobrevivência, peso corporal e mineralização esquelética.

### **Sobrevivência dos ratos**

As injeções diárias, começadas ao dia 15, de 8,2 mg/kg de sTNALP-FcD10, a ratos Akp2<sup>-/-</sup> aumentaram a sua sobrevivência, em comparação com os ratos que foram injetados com veículo (Figura 28). Este aumento foi estatisticamente significativo.

### **Peso corporal**

No princípio do estudo, não se verificou diferença significativa no peso corporal entre os grupos (Figura 29). No princípio do tratamento (dia 15), o peso corporal dos ratos Akp2<sup>-/-</sup> foi menor do que o dos animais tipo selvagem. Enquanto o peso corporal dos animais injetados com veículo continuou a diminuir, os ratos Akp2<sup>-/-</sup> tratados com sTNALP-FcD10 começaram a ganhar peso 4 a 5 dias após o início do tratamento, e continuaram a ganhar peso até ao fim do estudo, sem contudo atingir os valores dos animais tipo selvagem. Este ganho de peso sugere melhoria no bem-estar dos animais tratados com sTNALP-FcD10.

### **Mineralização óssea**

Para cada tratamento, as radiografias dos pés foram analisadas e distribuídas entre normal e anormal. Números e percentagens (em parênteses) aparecem na Tabela 5. As radiografias foram tiradas na necropsia.

O tratamento dos ratos Akp2<sup>-/-</sup> com 8,2 mg/kg de sTNALP-FcD10 diariamente, com início ao dia 15 após o nascimento melhorou a mineralização, como observado pela radiografia dos pés, tirada na necropsia. O grupo tratado com sTNALP-

Fcd10 apresentou 41% de animais normais, em comparação com 12% no grupo de ratos  $Akp2^{-/-}$  injetado com veículo. Esta diferença quase que atingiu significância estatística ( $p=0,0645$  no teste Chi Square).

**Tabela 5: Distribuição de radiografias dos pés**

| Grupo                | Anormal | Normal   |
|----------------------|---------|----------|
| RVeículo (N=16)      | 14 (88) | 2 (12)   |
| RTx-1 (N=17)         | 10 (59) | 7 (41)   |
| Tipo selvagem (N=30) | 0 (0)   | 30 (100) |

#### **EXEMPLO 14**

##### **Eficácia a longo prazo de diferentes intervalos de dosagem de sTNALP-Fcd10 na recuperação de ratos $Akp2^{-/-}$**

Os ratos foram iniciados no tratamento ao dia 12 e injetados s.c. com veículo (RV), 8,2 mg/kg diariamente aos dias 46/47 (RTx-1) ou injetados com 8,2 mg/kg diariamente durante 7 dias, seguido de 24,6 mg/kg a cada 3 dias (RTx-3), ou seguido de 57,4 mg/kg a cada 7 dias (RTx-7). A sobrevivência mediana foi de 19,5 dias para os ratos RV, 21,0 dias para os ratos RTx-7, 30,5 dias para os ratos RTx-3 e 37,5 dias para os ratos RTx-1. Em todos os casos, a sobrevivência foi estatisticamente aumentada quando comparada com a do grupo tratado com veículo. Existe um benefício claro de ERT em ratos  $Akp2^{-/-}$ , com hipofosfatasia bem estabelecida. Administrações menos frequentes do que diariamente parecem aumentar estatisticamente a sobrevivência.

#### **EXEMPLO 15**

##### **Um estudo de toxicidade de injeção intravenosa da dose máxima tolerada em ratas Sprague-Dawley jovens**

O objetivo do estudo foi determinar a dose máxima tolerada (MTD) e toxicidade do artigo de teste, sTNALP-FcD10, seguido de administração repetida a ratasanas Sprague-Dawley jovens por injeção intravenosa. Nos Exemplos 15 a 18, a sALP-FcD10 usada é a descrita especificamente na Figura 3.

A sTNALP-FcD10 foi administrada a ratasanas Sprague-Dawley jovens (com idades iniciais entre 22 e 24 dias), uma vez por semana durante quatro semanas, através de injeção intravenosa, tal como descrito na Tabela 6 a seguir:

**Tabela 6: Desenho do estudo**

| Número do Grupo | Tratamento | Nível da Dose (mg/kg/ocasião) | Concentração da Dose (mg/mL) | Número de Animais |       |
|-----------------|------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------|-------|
|                 |            |                               |                              | Macho             | Fêmea |
| 1               | Dose 1     | 10                            | 2,0                          | 3                 | 3     |
| 2               | Dose 2     | 30                            | 6,0                          | 3                 | 3     |
| 3               | Dose 3     | 90                            | 18,0                         | 3                 | 3     |
| 4               | Dose 4     | 180                           | 36,0                         | 3                 | 3     |

Ao longo de todo o estudo, os animais foram monitorizados relativamente à mortalidade, peso corporal, e condição clínica. Foram realizadas avaliações hematológicas, de coagulação e química clínica em todos os animais. No fim, as ratasanas foram sacrificadas e sujeitas a necropsia. Para cada animal, amostras de tecidos selecionados foram retidas e foram sujeitas a processamento histológico e observação microscópica.

Não ocorreu mortalidade neste estudo, e não houve alterações relacionadas com o artigo de teste nos parâmetros de coagulação ou peso dos órgãos. Os pesos corporais dos machos no grupo de Dose Elevada, em particular, foram cerca de 10% abaixo dos de Dose Baixa, sugerindo um efeito relacionado com o tratamento.

Não foram observados sinais clínicos nos animais dos Grupos 1 e 2, na primeira ocasião de dosagem. Nos animais dos Grupos 3 e 4, contudo, os animais pareceram fracos imediatamente a seguir à dosagem e alguns animais do Grupo 4 apresentaram diminuição fraca ou moderada da atividade. Leve inchaço dos membros, orelha e focinho com descoloração da pele (com aparência vermelha ou azul) nas extremidades também foram observados nos dois grupos. Outros sinais ocasionais observados nos animais do Grupo 4 incluíram coçar excessivo, piloereção e hiperpnéia.

Os sinais clínicos registrados para os animais dos Grupos 1 e 2 na segunda ocasião de dosagem (Dia 8) foram inchaço dos membros, orelha e focinho com descoloração da pele (com aparência vermelha ou azul) nas extremidades. Sinais clínicos semelhantes de inchaço da pele também foram registrados na terceira e quarta ocasião de dosagem (Dias 15 e 22), para os mesmos grupos de animais. Na quarta ocasião de dosagem (Dia 22) foi observada uma ligeira hiperatividade nas fêmeas do Grupo 1, enquanto hipoatividade foi observada nos machos do Grupo 2. Para os animais do Grupo 3 e 4, os sinais clínicos de atividade motora reduzida, piloereção, hiperpnéia e inchaço dos membros, orelha e focinho com coloração da pele mais evidente à medida que a dosagem progrediu desde a primeira ocasião de dosagem até à quarta. É considerado que estes sinais clínicos se relacionaram com o tratamento. Nos Dias 16 a 19, e no Dia 23, o inchaço ligeiro e coloração da pele da orelha (com aparência vermelha) foram observados em um animal (Grupo 1). Sinais clínicos semelhantes foram observados num outro animal (Grupo 2) no dia 23.

Os sinais clínicos foram agudos e a gravidade aumentou à medida que a dosagem progrediu, mas foram temporários. Todos os sinais clínicos apareceram num espaço de 50 minutos após a administração do artigo de teste, sTNALP-FcD10, com alguns animais a recuperarem dentro de, aproximadamente, trinta minutos a 2 horas. Para outros animais, a recuperação era completa na manhã seguinte (o ponto de observação seguinte planeado).

Observou-se uma diminuição nas contagens de plaquetas (PLT) relacionada com o tratamento, para machos e fêmeas de todos os grupos de tratamento, medida após a última dose, em comparação com os valores de referência. Observou-se um aumento na predominância, a percentagem mas também o número absoluto de reticulócitos que foi observado geralmente em animais tratados com as três doses mais elevadas.

Os níveis de fosfatase alcalina no soro foram mais elevados do que pode ser quantificado pelo instrumento analítico, mesmo após diluição. Os resultados disponíveis para as fêmeas do grupo de Dose Baixa foram dramaticamente mais elevados do que o intervalo de referência. Isto era esperado, uma vez que o artigo de teste é uma ALP modificada.

Macroscopicamente, foco/área escuros e/ou área deprimida do estômago glandular foram observados em 3 de 6 animais do Grupo 3 (2 machos/1 fêmea) e 4 de 6 animais do Grupo 4 (2 machos/2 fêmeas).

Microscopicamente, erosão/úlceras mínimas a leves do estômago glandular, ocasionalmente associada com edema da submucosa, foi verificada em 3 de 6 animais do Grupo 3 (2 machos/1

fêmea) e 4 de 6 animais do Grupo 4 (2 machos/2 fêmeas), em correlação com as observações macroscópicas.

Em conclusão, a injeção intravenosa de sTNALP-FcD10 a ratas Sprague-Dawley jovens uma vez por semana durante 4 semanas, não causou morte a nenhum dos níveis de dose testados, mas causou sinais clínicos adversos, alterações hematológicas mínimas e erosão/ulceração do estômago glandular, ocasionalmente associado com edema da submucosa, a níveis de dosagem de 90 e 180 mg/kg.

As alterações relacionadas com a administração do artigo de teste nas duas doses mais baixas testadas (10 e 30 mg/kg) foram limitadas a sinais clínicos transitórios, aparentes apenas no dia de dosagem. Os sinais clínicos foram mais graves a uma dose de 90 mg/kg, mas também foram transitórios. Os sinais clínicos verificados nos animais tratados com 180 mg/kg foram tão graves, que este nível de dosagem não deve ser utilizado em estudos futuros. Consequentemente, o nível de dose mais elevada recomendada para estudos subsequentes mais longos é de 90 mg/kg.

#### **EXEMPLO 16**

##### **Um estudo de toxicidade de injeção intravenosa e infusão da dose máxima tolerada em macacos *Cynomolgus* jovens**

O objetivo deste estudo foi determinar a dose máxima tolerada (MTD) para sTNALP-FcD10, quando administrada uma vez por injeção intravenosa ou infusão, a macacos *Cynomolgus* jovens. As formulações de dosagem do artigo de teste foram administradas uma vez, em incrementos, tal como indicado na Tabela 7 a seguir.

**Tabela 7: Desenho do estudo**

| * Apenas os animais do Estudo Principal receberam dose no Dia 46 |            |                         |                          |                          |                         |                   |        |                 |        |
|------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------|--------|-----------------|--------|
| Dia do Estudo                                                    | Tratamento | Nível de Dosag. (mg/kg) | Volume de Dosag. (mL/kg) | Taxa de Dosag. (mL/kg/h) | Conc. de Dosag. (mg/mL) | Número de Animais |        |                 |        |
|                                                                  |            |                         |                          |                          |                         | Estudo principal  |        | Toxico-cinética |        |
|                                                                  |            |                         |                          |                          |                         | Machos            | Fêmeas | Machos          | Fêmeas |
| 1                                                                | Injeção IV | 5                       | 4                        | N/A                      | 1,25                    | 2                 | 2      | 1               | 1      |
| 8                                                                | Injeção IV | 15                      | 4                        | N/A                      | 3,75                    |                   |        |                 |        |
| 15                                                               | Infusão IV | 45                      | 4                        | 80                       | 11,25                   |                   |        |                 |        |
| 22                                                               | Infusão IV | 90                      | 4                        | 40                       | 22,5                    |                   |        |                 |        |
| 29                                                               | Infusão IV | 180                     | 4                        | 20                       | 45                      |                   |        |                 |        |
| 46                                                               | Injeção IV | 45                      | 4                        | N/A                      | 11,25                   |                   |        |                 |        |

Depois do último tratamento, os animais foram libertados do estudo. Os parâmetros monitorizados durante o estudo foram mortalidade, observações clínicas, pesos corporais, apetência, toxicocinética, hematologia e química clínica.

Não se observou mortalidade, sinais clínicos adversos ou efeitos nos pesos corporais durante o estudo.

Um marcado aumento proporcional de dose na fosfatase alcalina foi observado em todos os animais ao longo do estudo. Uma vez que o artigo de teste era uma fosfatase alcalina sintética, este aumento foi principalmente devido à presença da droga na corrente sanguínea dos animais após cada dosagem.

Os aumentos na alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase foram observados em três animais durante o estudo, mas na ausência de necropsia, o significado toxicológico desta observação não é claro.

A farmacocinética de stNALP-FcD10 foi bem caracterizada seguindo uma administração IV única de 5, 15, 45, 90 e 180

mg/kg a macacos. Para as injeções IV, os valores  $AUC_{\infty}$  médios variaram de 797 a 2950 mg.h/L e os valores médios de  $C_{max}$  variaram de 65 a 396 mg/L na gama de doses estudadas. Para as infusões, os valores médios de  $AUC_{\infty}$  variaram de 9410 a 48400 mg.h/L e a  $C_{max}$  variou de 1230 a 7720 mg/L na gama de doses estudadas.

Os valores  $t_{1/2}$  médios de sTNALP-FcD10 pareceram diminuir com níveis de dose mais elevados de sTNALP-FcD10. Apesar da eliminação sistêmica de sTNALP-FcD10 ter sido relativamente consistente entre os diferentes níveis de dosagem, o grupo com a dose de 90 mg/kg pareceu ser diferente sob o ponto de vista farmacocinético, com uma eliminação substancialmente menor quando comparada com outros níveis de dosagem (aproximadamente 5 vezes). Não se observaram tendências relacionadas com o sexo.

Resumindo, apesar de terem sido observadas algumas alterações reversíveis na química sanguínea durante o estudo, a injeção/infusão intravenosa de sTNALP-FcD10 de, no máximo, 180 mg/kg foi bem tolerada pelos macacos *Cynomolgus* jovens. Assim, nas condições deste estudo, a Dose Máxima Tolerada foi considerada como sendo 180 mg/kg.

#### **EXEMPLO 17**

**Um estudo de toxicidade de injeção intravenosa durante 4 semanas (uma vez por semana) de sTNALP-FcD10 em ratazanas albinas jovens, seguido de um período de recuperação de 28 dias**

O objetivo deste estudo foi estudar a toxicidade potencial de sTNALP-FcD10 administrada uma vez por semana, por injeção intravenosa a ratazanas jovens, durante um período

mínimo de 4 semanas consecutivas (total de 4 doses), seguido de 28 dias de recuperação. Os animais receberam uma dose nos dias de estudo 1, 8, 15 e 22, e o período de recuperação começou no dia de estudo 29. O desenho do estudo encontra-se detalhado na Tabela 8 a seguir.

**Tabela 8: Desenho do estudo**

| Grupos                | Nível de Dosag. Alvo (mg/kg/dose) | Nível de Dosag. Real (mg/kg/dose) | Concentração alvo (mg/mL) | Principal<br>Concentração real (mg/mL) | Estudo Principal |         | Estudo de Recuperação |         |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------------------|------------------|---------|-----------------------|---------|
|                       |                                   |                                   |                           |                                        | Ma-chos          | Fê-meas | Ma-chos               | Fê-meas |
| 1- Veículo e Controlo | 0                                 | 0                                 | 0                         | 0                                      | 10               | 10      | 5                     | 5       |
| 2- Dose Baixa         | 3                                 | 2,5                               | 0,6                       | 0,5                                    | 10               | 10      | 5                     | 5       |
| 3- Dose Inter-média   | 30                                | 26                                | 6                         | 5,1                                    | 10               | 10      | 5                     | 5       |
| 4- Dose Elevada       | 90                                | 77                                | 18                        | 15,3                                   | 10               | 10      | 5                     | 5       |

Avaliou-se o seguinte: sinais clínicos (duas vezes por dia), peso corporal (uma vez durante o processo de adaptação e semanalmente a começar ao dia 21 após o parto), consumo de alimento (semanalmente), oftalmologia (no fim do tratamento e fim do período de recuperação), hematologia (na necropsia), química do soro (na necropsia), análise da urina (dia 29 e no fim do período de recuperação), marcadores bioquímicos de renovação óssea: osteocalcina (marcador de formação óssea) e C-telopéptido (marcador de reabsorção óssea) (na manhã antes do dia planeado para a necropsia), avaliação de anticorpos (Dia 1 e na necropsia), avaliação da concentração sanguínea do artigo de teste (Dia 16 e Dia 23), densitometria óssea (por DXA *in vivo* no Dia 1, 28 – animais do estudo principal e de recuperação e Dia 14 e 54 – animais do estudo de recuperação e pQCT *ex vivo*), radiografia e observações macroscópicas durante a necropsia, peso dos órgãos e histopatologia.

Um macho ao qual foi administrado 90 mg/kg/dose foi encontrado morto no Dia 25 do estudo. Como não foram realizadas observações histológicas consecutivas para esta ratazana (hemorragias pulmonares e tímica, classificadas como leves e mínimas, respetivamente), a sua causa de morte foi determinada com base em investigações patológicas. No Dia 23, recolheu-se sangue deste animal para a avaliação da concentração sanguínea do artigo de teste, e este procedimento pode ter contribuído para a sua morte, uma vez que não se observaram indícios de toxicidade no Dia 22. Não se verificou mortalidade ou efeitos relacionados com sTNALP-FcD10 em oftalmologia, análise de urina, marcador de formação óssea (osteocalcina), pesos corporais, patologia macroscópica, radiologia ou avaliação microscópica.

Os sinais clínicos relacionados com sTNALP-FcD10 observados nos grupos de 3, 30 e/ou 90 mg/kg/dose, são considerados como sendo reação aguda à infusão. Estes incluíram olhos parcialmente fechados, tonificação muscular diminuída, animais deitados sobre o lado, postura arqueada, sem reação ao toque, movimentos descoordenados, atividade diminuída, marcha anormal e/ou patas traseiras e/ou patas dianteiras inchadas e/ou azuis, vermelhas, durante observações laterais das gaiolas a 5, 15, 30 e/ou 60 minutos após a dosagem. Estas observações foram transitórias e não ocorreram em dias em que não houve dosagem, ou durante o período de recuperação.

Em geral, foi observada uma tendência para a ligeira diminuição do peso corporal e aumento do peso corporal para machos nos grupos de 3, 30 e/ou 90 mg/kg/dose durante o período de recuperação. O efeito no tamanho nos dois ossos do esqueleto apendicular (fémur e tibia) correlacionou-se

com pesos corporais diminuídos. A diminuição do consumo de alimentos foi geralmente consistente com a diminuição do peso corporal.

**Os pesos corporais foram comparáveis com os controles para as fêmeas tratadas com sTNALP-FcD10**

sTNALP-FcD10 administrada a 90 mg/kg/dose foi geralmente associada com ligeira diminuição do número absoluto de neutrófilos, monócitos e/ou eosinófilos, em comparação com o grupo controle. Adicionalmente, ligeiros aumentos nos linfócitos, plaquetas e reticulócitos absolutos foram observados, em comparação com o grupo controle. No fim do período de recuperação, estas ligeiras alterações eram ainda aparentes nos animais tratados com 90 mg/kg.

sTNALP-FcD10 foi geralmente associada com aumentos estatisticamente significantes relacionados com a dose de fosfatase alcalina em todos os grupo tratados, em comparação com os controles. Considerando a natureza do artigo de teste (fosfatase alcalina), a ausência de quaisquer alterações em outras enzimas hepáticas e ausência de observações histológicas relacionadas, estes aumentos são provavelmente atribuídos a níveis de sTNALP-FcD10 em circulação. Aumentos ligeiramente significantes em termos estatísticos em fósforo foram observados em machos tratados com sTNALP-FcD10 a 90 mg/kg/dose durante a Semana 4, associados com aumentos não significativos na quantidade total de cálcio no sangue. No fim da recuperação, estas alterações, incluindo as estatisticamente significantes, voltaram aos valores controle.

Não se observaram alterações relacionadas com sTNALP-FcD10 no peso dos órgãos, radiológicas, macroscópicas ou

microscópicas em ratazanas jovens tratadas intravenosamente uma vez por semana, com no máximo 90 mg/kg/dose, durante 4 semanas consecutivas. Não se identificaram efeitos retardados num grupo destes animais que tiveram uma recuperação de 28 dias, após o fim do tratamento.

Valores de CTx médios ligeiramente mais baixos foram observados para as fêmeas tratadas, em comparação com os controlos (atingindo significância estatística a 90 mg/kg/dose). Estes valores mais baixos não foram consistentes com a análise de densidade óssea e também com os resultados obtidos para os machos; por isso, não pode ser excluída uma natureza incidental para estas diminuições.

A elevada variabilidade na densitometria óssea e parâmetros de geometria óssea verificada entre grupos foi atribuída à rápida fase de crescimento. No fim da recuperação, área e BMC (avaliado por DXA e pQCT) foram geralmente mais baixos para machos tratados, sugerindo a presença de ossos mais pequenos nestes animais. O efeito no tamanho dos ossos foi verificado em dois ossos do esqueleto apendicular (fémur e tibia), através de duas técnicas diferentes, contudo não se verificou qualquer efeito consistente para o esqueleto axial (sugerindo ausência de efeito céfalo-caudal). Apesar de área e BMC serem menores, os valores de BMD médios foram geralmente comparáveis com os controlos, sugerindo que o efeito em BMC e área foi secundário ao efeito no crescimento. Pesos corporais mais baixos e menor consumo de alimentos para machos tratados em relação a controlos são consistentes com estes resultados. Apesar do pequeno tamanho do grupo da recuperação, a falta de consistência relativamente ao género, assim como a variabilidade, confundiu estes resultados, e por isso não pode ser

completamente excluída uma natureza incidental para estas diminuições.

Em conclusão, injeção intravenosa uma vez por semana a ratas jovens, durante um período mínimo de 4 semanas consecutivas, seguido de recuperação durante 28 dias, a doses de 3, 30 e 90 mg/kg/dose, resultou em sinais clínicos associados com efeitos relacionados com injeção transitória, incluindo atividade descoordenada e reduzida e inchaço de patas, observado no período de no máximo 60 minutos após a dosagem. Os machos tratados com 90 mg/kg/dose apresentaram ligeiras diminuições no peso corporal e consumo de alimentos, o que se correlacionou com tíbias e fêmures ligeiramente mais pequenos, o que foi determinado por técnicas de densitometria. Para as fêmeas, valores médios ligeiramente mais baixos foram obtidos para os níveis de C-telopéptidos, em comparação com os controlos. Os níveis de fósforo no soro eram ligeiramente aumentados, embora significativamente, no grupo de 90 mg/kg/dose. Níveis elevados de fosfatase alcalina no soro foram provavelmente devidos a níveis de sTNALP-FcD10 em circulação. sTNALP-FcD10 não teve efeitos significativos ou consistentes na densitometria óssea e geometria óssea para as fêmeas durante o tratamento e período de recuperação. Para os machos, não foram verificados efeitos biologicamente significativos na densitometria óssea ou geometria óssea durante o período de tratamento. Em geral, foram verificadas diminuições ligeiras na densitometria óssea (conteúdo mineral ósseo e/ou área determinada por DXA e pQCT) e parâmetros de geometria óssea com um peso corporal mais baixo correspondente, para os machos em relação aos controlos no fim do período de recuperação. Todas as observações se resolveram após um período de 28 dias sem tratamento, com a exceção dos efeitos no peso corporal e tamanho dos ossos, para machos que receberam

doses elevadas, os quais persistiram. Não houve evidência de calcificação ectópica no fim do tratamento ou no fim do período de recuperação. Não houve observações radiológicas, macroscópicas ou microscópicas, assim como qualquer alteração no peso corporal associadas com o tratamento com sTNALP-FcD10, em nenhum nível de dosagem. Uma vez que a reação à injeção foi transitória e não resultou em qualquer efeito em nenhum parâmetro usado para determinar a toxicidade nos grupos 3 e 30 mg/kg/dose, não foi considerado como sendo adversa. No grupo que recebeu 90 mg/kg/dose, esta reação foi mais grave e acompanhada por diminuições no ganho de peso corporal, consumo de alimentos reduzido e potencialmente diminuição no crescimento ósseo, e por isso os efeitos neste grupo foram considerados como sendo adversos. Consequentemente, o nível de ausência de efeitos adversos observáveis (NOAEL) foi considerado como sendo 30 mg/kg/dose neste estudo.

#### **EXEMPLO 18**

**Um estudo de toxicidade de injeção intravenosa durante 4 semanas em macacos *Cynomolgus* jovens, seguido de um período de recuperação de 28 dias**

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade e a toxicocinética de sTNALP-FcD10 em macacos *Cynomolgus* jovens, quando administrada uma vez por semana, por injeção intravenosa lenta em bólus, durante 4 semanas, e estudar a reversibilidade de quaisquer alterações após um período de recuperação de 28 dias.

As formulações de dosagem de controlo e artigo de teste foram administradas a macacos *Cynomolgus* jovens por injeção intravenosa lenta em bólus, uma vez por semana durante 4

semanas, seguido de um período de recuperação de 28 dias, como indicado na Tabela 9 a seguir:

**Tabela 9: Desenho do estudo**

| Grupo                                                                                                   | Nível de Dosagem (mg/kg) | Volume de Dosagem (mL/kg) | Concentração de Dosegem (mg/mL) | Número de Animais |         |                       |         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------|---------|-----------------------|---------|
|                                                                                                         |                          |                           |                                 | Estudo Principal  |         | Estudo de Recuperação |         |
|                                                                                                         |                          |                           |                                 | Ma-chos           | Fê-meas | Ma-chos               | Fê-meas |
| 1- Controlo*                                                                                            | 0                        | 4                         | 0                               | 3                 | 3       | 2                     | 2       |
| 2- Dose Baixa                                                                                           | 5                        | 4                         | 1,25                            | 3                 | 3       | 2                     | 2       |
| 3- Dose Intermediária                                                                                   | 15                       | 4                         | 3,75                            | 3                 | 3       | 2                     | 2       |
| 4- Dose Elevada                                                                                         | 45                       | 4                         | 11,25                           | 3                 | 3       | 2                     | 2       |
| * Os animais do Grupo 1 receberam veículo/artigo controlo 25 mM de fosfato de sódio pH 7,4, 150 mM NaCl |                          |                           |                                 |                   |         |                       |         |

Depois do último tratamento (Dia 22), os animais do Estudo Principal foram sacrificados no Dia 29, enquanto os restantes animais do grupo Recuperação foram observados por um período adicional de 28 dias, após o que foram sacrificados no Dia 57. Todos os animais do Principal e Recuperação foram submetidos a avaliação por necropsia.

As avaliações conduzidas durante o estudo ou na conclusão do mesmo incluíram mortalidade, condição clínica, peso corporal, apetência, medidas corporais, determinações radiográficas ou desenvolvimento ósseo, oftalmologia, eletrocardiografia, toxicocinética, imunogenicidade, hematologia, coagulação, química clínica, análise de urina, biomarcadores para renovação óssea, pesos de órgãos, análises de densidade óssea, e histopatologia e patologia macroscópica.

Não se verificou mortalidade ou observações adversas relacionadas com o tratamento durante o estudo.

Com base nas medidas corporais registadas no fim do tratamento e período de recuperação, não há diferenças dignas de nota entre os grupos para a circunferência craniana, ou comprimentos do úmero, antebraço, tibia ou membros pélvicos.

Não houve alterações no peso corporal ou consumo de alimentos relacionadas com o tratamento com o artigo de teste, em nenhum dos níveis de dosagem. Não se detetaram observações oftalmológicas ou eletrocardiográficas relacionadas com o artigo de teste em nenhum dos níveis de dosagem. Não houve alterações hematológicas, morfologia de eritrócitos, coagulação ou análise de urina relacionadas com o tratamento com o artigo de teste em nenhum dos níveis de dosagem. Não houve alterações significativas sob o ponto de visto toxicológico entre os parâmetros bioquímicos durante o tratamento ou período de recuperação. Foi observado um aumento ligeiro a pronunciado relacionado com a dosagem, em fosfatase alcalina em todos os animais tratados com o artigo de teste, na maioria das ocasiões de teste, ao longo do período de tratamento. Os níveis de fosfatase alcalina foram geralmente mais comparáveis com os valores controlo no final do período de recuperação. Uma vez que o artigo de teste é uma fosfatase alcalina sintética, este aumento foi principalmente devido à presença da droga na circulação dos animais após cada dosagem, e por isso os aumentos foram considerados como sendo não adversos.

No fim dos períodos de tratamento e recuperação, não se observaram diferenças dignas de nota entre os grupos relativamente ao peso absoluto ou relativo dos órgãos, nem houve quaisquer observações macroscópicas ou microscópicas relacionadas com o artigo de teste. As alterações

histológicas observadas foram consideradas como sendo incidentais, observações de fundo comuns nesta espécie, ou observações relacionadas com algum aspeto da manipulação experimental. Os órgãos reprodutores eram geralmente imaturos, mas considerados normais para macacos desta idade.

Em conclusão, injeção intravenosa semanal de sTNALP-FcD10 em machos e fêmeas de macacos *Cynomolgus*, durante 4 semanas, a níveis de dosagem de 0, 5, 15, e 45 mg/kg, e seguida de um período de recuperação de 4 semanas, não teve qualquer evidência de toxicidade em nenhum dos níveis de dosagem. Por isso, o nível de dosagem elevado, 45 mg/kg foi considerado como sendo o nível de ausência de efeitos adversos observáveis (NOAEL) neste estudo.

### **EXEMPLO 19**

#### **Determinação da dose de partida máxima recomendada para humanos**

A dose de partida máxima recomendada (MRSD) para humanos é calculada pelo estabelecimento do nível de ausência de efeitos adversos observáveis (NOAEL, ver Guidance for Industry and Reviewers. Dezembro 2002). Várias concentrações da formulação anteriormente descrita foram testadas em ratos, ratazanas e macacos, incluindo 1 mg/kg, 5 mg/kg, e 8,2 mg/kg diários subcutaneamente; 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg, 45 mg/kg, 90 mg/kg e 180 mg/kg. O NOAEL para as espécies mais sensíveis, nomeadamente para ratazana, foi de 30 mg/kg.

Esta dose foi aumentada para uma dose equivalente em humanos (HED), usando tabelas de conversão publicadas, as

quais fornecem um fator de conversão de ratazana para humano de 6. Um NOAEL de 30 mg/kg para esta espécie é equivalente a 5 mg/kg em humanos.

Este valor (5 mg/kg) foi dividido por um fator de segurança de 10. A MRSD calculada é assim de 0,5 mg/kg. Para um humano normal com um peso de 60 kg, uma dose semanal de 30 mg ou uma dose diária de 4,28 mg poderia assim ser injetada para iniciar ensaios clínicos.

### **REFERÊNCIAS**

1. Ali, S.Y., Sajdera, S.W. & Anderson, H.C. Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. Proc Natl Acad Sci U S A 67, 1513-20 (1970).
2. Anderson, HC, Hsu, H.H., Morris, D.C., Fedde, K.N. & Whyte, M.P. 1997 Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals. Am J Pathol 151 1555-61.
3. Anderson HC, Garimella R & Tague SE 2005a The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. Frontiers in Bioscience 10 822-837.
4. Anderson HC, Harmey D, Camacho NP, Garimella R, Sipe JB, Tague S, Bi XH, Johnson K, Terkeltaub R & Millan JL 2005b Sustained osteomalacia of long bones despite major improvement in other hypophosphatasia-related mineral deficits in tissue nonspecific alkaline phosphatase/nucleoticle pyrophosphatase phosphodiesterase 1 double-deficient mice. American Journal of Pathology 166 1711-1720.
5. Anderson HC & Reynolds JJ 1973 Pyrophosphate stimulation of calcium uptake into cultured embryonic bones. Fine

structure of matrix vesicles and their role in calcification. *Developmental Biology* 34 211-227.

6. Anderson HC, Sipe JB, Hessle L, Dharmayamraju R, Atti E, Camacho NP & Millan JL 2004 Impaired Calcification Around Matrix Vesicles of Growth Plate and Bone in Alkaline Phosphatase-Deficient Mice. *American Journal of Pathology* 164 841-847.

7. Bernard, G.W. 1978 Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in initial intramembranous osteogenesis. *Clin Orthop*, 218-25.

8. Di Mauro S, Manes T, Hessle L, Kozlenkov A, Pizauro JM, Hoylaerts MF & Millan JL 2002 Kinetic characterization of hypophosphatasia mutations with physiological substrates. *Journal of Bone and Mineral Research* 17 1383-1391.

9. Farley JR & Magnusson P 2005 Effects of Tunicamycin, Mannosamine, and Other Inhibitors of Glycoprotein Processing on Skeletal Alkaline Phosphatase in Human Osteoblast-Like Cells. *Calcified Tissue International* 76 63-74.

10. Fedde KN, Blair L, Silverstein J, Coburn SP, Ryan LM, Weinstein RS, Waymire K, Narisawa S, Millan JL, MacGregor GR & Whyte MP 1999 Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. *Journal of Bone and Mineral Research* 14 2015-2026.

11. Greenberg, C.R. et al. 1993 A homoallelic Gly317-->Asp mutation in ALPL causes the perinatal (lethal) form of hypophosphatasia in Canadian mennonites. *Genomics* 17, 215-7.

12. Harmey D, Johnson KA, Zelken J, Camacho NP, Hoylaerts MF, Noda M, Terkeltaub R & Millan JL 2006 Elevated skeletal

osteopontin levels contribute to the hypophosphatasia phenotype in Akp2(-/-) mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 21 1377-1386.

13. Harmey D, Hessle L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R & Millan JL 2004 Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank: An Integrated Model of the Pathogenesis of Mineralization Disorders. *American Journal of Pathology* 164 1199-1209.

14. Hawrylak K & Stinson RA 1988 The solubilization of tetrameric alkaline phosphatase from human liver and its conversion into various forms by phosphatidylinositol phospholipase C or proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 263 14368-14373.

15. Henthorn, P.S., Raducha, M., Fedde, K.N., Lafferty, M.A. & Whyte, M.P. 1992a Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9924-8.

16. Henthorn, P.S. & Whyte, M.P. 1992b Missense mutations of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in hypophosphatasia. *Clin Chem* 38, 2501-5.

17. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, Terkeltaub R & Millan JL 2002 Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 9445-9449.

18. Ikezawa H 2002 Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored Proteins. *Biol Pharm. Bull.* 25(4) 409-417.

19. Jansonius JN 1998 Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Current Opinion in Structural Biology* 8 759-769.
20. Johnson K, Moffa A, Chen Y, Pritzker K, Goding J & Terkeltaub R 1999 Matrix vesicle plasma cell membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 14 883-892.
21. Mahmood I, Green MD, & Fisher JE 2003 Selection of the First-Time Dose in Humans: Comparison of Different Approaches Based on Interspecies Scaling of Clearance. *J. Clin. Pharmacol.*, 43 (7), 692-7.
22. Meyer, J.L. 1984 Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch Biochem Biophys* 231 1-8.
23. Millán, J.L. 2006 Mammalian Alkaline Phosphatases. *From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany 1-322.
24. Morris, D.C., Masuhara, K., Takaoka, K., Ono, K. & Anderson, H.C. 1992 Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone. *Bone Miner* 19 287-98.
25. Murshed M, Harmey D, Millan JL, McKee MD & Karsenty G 2005 Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes and Development* 19 1093-1104.
26. Nasu M, Ito M, Ishida Y, Numa N, Komaru K, Nomura S and Oda K 2006 Aberrant interchain disulfide bridge of tissue-nonspecific alkalinephosphatase with an Arg433 . Cys substitution associated with severe hypophosphatasia *FEBS Journal* 273 5612-5624.

27. Narisawa S, Frohlander N & Millan JL 1997 Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Developmental Dynamics* 208 432-446.
28. Narisawa S, Wennberg C & Millan JL 2001 Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *Journal of Pathology* 193 125-133.
29. Nishioka T, Tomatsu S, Gutierrez MA, Miyamoto K, Trandafirescu GG, Lopez PLC, Grubb JH, Kanai R, Kobayashi H, Yamaguchi S, Gottesman GS, Cahill R, Noguchi A & Sly WS 2006 Enhancement of drug delivery to bone: Characterization of human tissue-nonspecific alkaline phosphatase tagged with an acidic oligopeptide. *Molecular Genetics and Metabolism* 88 244-255.
30. Nosjean O, Koyama I, Goseki M, Roux B & Komoda T 1997 Human tissue non-specific alkaline phosphatases: Sugar-moiety-induced enzymic and antigenic modulations and genetic aspects. *Biochemical Journal* 321 297-303.
31. Oda et al. 1999 *J. Biochem* 126: 694-699.
32. Rezende LA, Ciancaglini P, Pizauro JM & Leone FA 1998 Inorganic pyrophosphate-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. *Cellular and Molecular Biology* 44 293-302.
33. Urlaub G, Kas E, Carothers AM & Chasin LA 1983 Deletion of the Diploid Dihydrofolate-Reductase Locus from Cultured Mammalian-Cells. *Cell* 33 405-412.
34. Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP & MacGregor GR 1995 Mice Lacking Tissue Nonspecific Alkaline-Phosphatase Die from Seizures Due to Defective Metabolism of Vitamin-B-6. *Nature Genetics* 11 45-51.

35. Weiss, M.J. et al. 1988 A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7666-9.
36. Weninger M, Stinson RA, Plenk H, Bock P & Pollak A 1989 Biochemical and Morphological Effects of Human Hepatic Alkaline-Phosphatase in A Neonate with Hypophosphatasia. *Acta Paediatrica Scandinavica* 154-160.
37. Whyte MP 1994 Hypophosphatasia and the Role of Alkaline-Phosphatase in Skeletal Mineralization. *Endocrine Reviews* 15 439-461.
38. Whyte M.P. 1995 Alkaline Phosphatase: Placental and Tissue-nonspecific Isoenzymes hydrolyze Phosphoethanolamine, Inorganic Pyrophosphate, and Pyridoxal 5'-phosphate *J. Clin. Invest.* 95:1440-1445.
39. Whyte MP 2001 Hypophosphatasia. In *The Metabolic and Molecular Bases of Disease*, edn 8th, pp 5313-5329. Eds CL Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle & B Vogelstein. New York: McGraw-Hill Book Company.
40. Whyte MP 2002 Hypophosphatasia. Nature's window on alkaline phosphatase function in man. In *Principle of Bone Biology*, edn Second, pp 1229-1248. Eds JP Bilezikian, LG Raisz & GA Rodan. London: Academic Press.
41. Whyte MP, Kurtzberg J, McAlister WH, Mumm S, Podgornik MN, Coburn SP, Ryan LM, Miller CR, Gottesman GS, Smith AK, Douville J, Waters P, Armstrong RD & Martin PL 2003 Marrow cell transplantation for infantile hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* 18 624-636.
42. Whyte MP, Mahuren JD, Vrabel LA & Coburn SP 1985 Markedly Increased Circulating Pyridoxal-5'-Phosphate Levels in Hypophosphatasia - Alkaline- Phosphatase Acts in

Vitamin-B6 Metabolism. Journal of Clinical Investigation 76 752-756.

43. Whyte MP, McAlister WH, Patton LS, Magill HL, Fallon MD, Lorentz WB & Herrod HG 1984 Enzyme replacement therapy for infantile hypophosphatasia attempted by intravenous infusions of alkaline phosphatase-rich Paget plasma: results in three additional patients. J Pediatr 105 926-933.

44. Whyte MP, Valdes R, Ryan LM & McAlister WH 1982 Infantile hypophosphatasia: enzyme replacement therapy by intravenous infusion of alkaline phosphatase-rich plasma from patients with Paget bone disease. J Pediatr 101 379-386.

45. Zurutuza L, Muller F, Gibrat JF, Taillandier A, Simon-Bouy B, Serre JL & Mornet E 1999 Correlations of genotype and phenotype in hypophosphatasia. Human Molecular Genetics 8 1039-1046.

46. Beertsen W., Van den Bos T, Everts V, 1999, Root development in mice lacking functional tissue non-specific alkaline phosphatase gene: Inhibition of acellular cementum formation. J. Dent. Res. 78:1221-1229.

#### **LISTA DE SEQUÊNCIAS**

<110> ENOBIA PHARMA INC.

Crine, Philippe

Boileau, Guy

Loisel Thomas P.

Lemire, Isabelle

Leonard, Pierre

Heft, Robert

Landy, Hal



<120> FOSFATASE ALCALINA DIRIGIDA AO OSSO, KITS E MÉTODOS  
DE UTILIZAÇÃO DA MESMA

<130> 765/12987.80

<150> US 60/917,589

<151> 2007-05-11

<160> 19

<170> Patent In version 3.3

<210> 1

<211> 743

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> hTNALP-Fc-d10 com péptido de sinalização

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu  
 195 200 205

Met His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys  
 210 215 220

Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu  
 225 230 235 240

Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp  
 245 250 255

Lys Ser Phe Lys Pro Arg Tyr Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg  
 260 265 270

Thr Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val Asp Tyr Leu Leu Gly  
 275 280 285

Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val  
 290 295 300

Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val Ala Ile Gln Ile Leu  
 305 310 315 320

Arg Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile



Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
565 570 575

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
580 585 590

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
595 600 605

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
610 615 620

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu  
625 630 635 640

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
645 650 655

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
660 665 670

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
675 680 685

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
690 695 700

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
705 710 715 720

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asp Ile Asp Asp Asp  
725 730 735

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp  
740

<210> 2

<211> 502

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> hTNALP 1-502

&lt;400&gt; 2

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu
      195             200             205

Met His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
210             215             220

```

Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu  
225 230 235 240

Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp  
245 250 255

Lys Ser Phe Lys Pro Arg Tyr Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg  
260 265 270

Thr Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val Asp Tyr Leu Leu Gly  
275 280 285

Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val  
290 295 300

Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val Ala Ile Gln Ile Leu  
305 310 315 320

Arg Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile  
325 330 335

Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala  
340 345 350

Val Glu Met Asp Arg Ala Ile Gly Gln Ala Gly Ser Leu Thr Ser Ser  
355 360 365

Glu Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr  
370 375 380

Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro  
385 390 395 400

Met Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly  
405 410 415

Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser  
420 425 430

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

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

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

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

Cys Ala Pro Ala Ser Ser  
 500

<210> 3

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento Fc de IgG-1

<400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
210 215 220

Pro Gly Lys  
225

<210> 4

<211> 726

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> hstNALP-Fc-d10 sem péptido de sinalização

<400>4

Leu Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Lys Tyr Trp Arg Asp Gln Ala  
1 5 10 15

Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Glu Leu Gln Lys Leu Asn Thr Asn  
20 25 30

Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser  
35 40 45

Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn Pro  
50 55 60

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

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

Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp  
 305 310 315 320

His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala Val  
 325 330 335

Glu Met Asp Arg Ala Ile Gly Gln Ala Gly Ser Leu Thr Ser Ser Glu  
 340 345 350

Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr Phe  
 355 360 365

Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Met  
 370 375 380

Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly Asn  
 385 390 395 400

Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser Met  
 405 410 415

Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro Leu  
 420 425 430

Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ser Lys Gly  
 435 440 445

Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Val Pro  
 450 455 460

His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Leu Gly His Cys  
 465 470 475 480

Ala Pro Ala Ser Ser Leu Lys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 485 490 495

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 500 505 510

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 515 520 525

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
530 535 540

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
545 550 555 560

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
565 570 575

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
580 585 590

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
595 600 605

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
610 615 620

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
625 630 635 640

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
645 650 655

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
660 665 670

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
675 680 685

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
690 695 700

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asp Ile Asp Asp Asp Asp  
705 710 715 720

Asp Asp Asp Asp Asp Asp  
725

<210> 5

<211> 485

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> hsTNALP (18-502)

&lt;400&gt; 5

Leu Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Lys Tyr Trp Arg Asp Gln Ala  
 1 5 10 15

Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Glu Leu Gln Lys Leu Asn Thr Asn  
 20 25 30

Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser  
 35 40 45

Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn Pro  
 50 55 60

Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Phe Val Ala Leu  
 65 70 75 80

Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly Thr  
 85 90 95

Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val Gly  
 100 105 110

Val Ser Ala Ala Thr Glu Arg Ser Arg Cys Asn Thr Thr Gln Gly Asn  
 115 120 125

Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser Val  
 130 135 140

Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala Ala  
 145 150 155 160

Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met Pro  
 165 170 175

Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu Met  
 180 185 190

His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys Tyr  
 195 200 205

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

Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ser Lys Gly  
 435 440 445

Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Val Pro  
 450 455 460

His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Leu Gly His Cys  
 465 470 475 480

Ala Pro Ala Ser Ser  
 485

<210> 6

<211> 524

<212> PRT

<213> bos taurus

<400> 6

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

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

Ala Gln Gln Thr Leu Lys Asn Ala Leu Arg Leu Gln Thr Leu Asn Thr  
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr  
 370 375 380

Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro  
 385 390 395 400

Met Val Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly  
 405 410 415

Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser  
 420 425 430

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

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

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

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

Cys Ala Ser Ala Ser Ser Ser Gly Ser Pro Ser Pro Gly Pro Leu Leu  
 500 505 510

Leu Leu Leu Ala Leu Leu Pro Leu Gly Ser Leu Phe  
 515 520

<210> 7

<211> 524

<212> PRT

<213> felis catus

<400> 7

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

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

Ala Gln Gln Thr Leu Lys Asn Ala Leu Arg Leu Gln Lys Leu Asn Thr

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 35  | 40  | 45  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asn | Val | Val | Lys | Asn | Val | Ile | Met | Phe | Leu | Gly | Asp | Gly | Met | Gly | Val |
| 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Ser | Thr | Val | Thr | Ala | Ala | Arg | Ile | Leu | Lys | Gly | Gln | Leu | His | His | Asn |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Pro | Gly | Glu | Glu | Thr | Arg | Leu | Glu | Met | Asp | Lys | Phe | Pro | Tyr | Val | Ala |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Leu | Ser | Lys | Thr | Tyr | Asn | Thr | Asn | Ala | Gln | Val | Pro | Asp | Ser | Ala | Gly |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Thr | Ala | Thr | Ala | Tyr | Leu | Cys | Gly | Val | Lys | Ala | Asn | Glu | Gly | Thr | Val |
|     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gly | Val | Ser | Ala | Ala | Thr | Gln | Arg | Thr | Gln | Cys | Asn | Thr | Thr | Gln | Gly |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Asn | Glu | Val | Thr | Ser | Ile | Leu | Arg | Trp | Ala | Lys | Asp | Ser | Gly | Lys | Ser |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Val | Gly | Ile | Val | Thr | Thr | Thr | Arg | Val | Asn | His | Ala | Thr | Pro | Ser | Ala |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Ala | Tyr | Ala | His | Ser | Ala | Asp | Arg | Asp | Trp | Tyr | Ser | Asp | Asn | Glu | Met |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Pro | Pro | Glu | Ala | Leu | Ser | Gln | Gly | Cys | Lys | Asp | Ile | Ala | Tyr | Gln | Leu |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Met | His | Asn | Val | Arg | Asp | Ile | Glu | Val | Ile | Met | Gly | Gly | Gly | Arg | Lys |
| 210 |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Tyr | Met | Phe | Pro | Lys | Asn | Arg | Thr | Asp | Val | Glu | Tyr | Glu | Met | Asp | Glu |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Lys | Ala | Arg | Gly | Thr | Arg | Leu | Asp | Gly | Leu | Asn | Leu | Val | Asp | Ile | Trp |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Lys | Ser | Phe | Lys | Pro | Arg | His | Lys | His | Ser | His | Tyr | Val | Trp | Asn | Arg |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |

Thr Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro Tyr Gly Val Asp Tyr Leu Leu Gly  
 275 280 285

Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Ser Thr  
 290 295 300

Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Glu Ile Ala Ile Lys Ile Leu  
 305 310 315 320

Ser Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile  
 325 330 335

Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala  
 340 345 350

Val Glu Met Asp Gln Ala Ile Gly Arg Ala Gly Ala Met Thr Ser Val  
 355 360 365

Glu Asp Thr Leu Thr Ile Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr  
 370 375 380

Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro  
 385 390 395 400

Met Val Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ser Ile Leu Tyr Gly  
 405 410 415

Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser  
 420 425 430

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

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

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

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

Cys Ala Ser Ala Ser Ser Ala Gly Gly Pro Ser Pro Gly Pro Leu Phe  
                           500                          505                          510

Leu Leu Leu Ala Leu Pro Ser Leu Gly Ile Leu Phe  
                   515                          520

<210> 8

<211> 524

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala



Met Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly  
                                   405                                  410                                  415

Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser  
                                   420                                  425                                  430

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

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

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

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

Cys Ala Pro Ala Ser Ser Ala Gly Ser Leu Ala Ala Gly Pro Leu Leu  
                                   500                                  505                                  510

Leu Ala Leu Ala Leu Tyr Pro Leu Ser Val Leu Phe  
                                   515                                  520

<210> 9

<211> 524

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 9

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ile | Ser | Pro | Phe | Leu | Val | Leu | Ala | Ile | Gly | Thr | Cys | Leu | Thr | Asn |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| Ser | Phe | Val | Pro | Glu | Lys | Glu | Arg | Asp | Pro | Ser | Tyr | Trp | Arg | Gln | Gln |
|     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ala | Gln | Glu | Thr | Leu | Lys | Asn | Ala | Leu | Lys | Leu | Gln | Lys | Leu | Asn | Thr |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Asn | Val | Ala | Lys | Asn | Val | Ile | Met | Phe | Leu | Gly | Asp | Gly | Met | Gly | Val |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu  
195 200 205

Met His Asn Ile Lys Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys  
210 215 220

Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Arg Thr Asp Val Glu Tyr Glu Leu Asp Glu  
225 230 235 240

Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Ile Ser Ile Trp  
245 250 255

Lys Ser Phe Lys Pro Arg His Lys His Ser His Tyr Val Trp Asn Arg  
260 265 270

Thr Glu Leu Leu Ala Leu Asp Pro Ser Arg Val Asp Tyr Leu Leu Gly  
275 280 285

Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Leu

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

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 524

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; rattus norvegicus

&lt;400&gt; 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | 420 |     | 425 |     | 430 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Met | Val | Asp | Tyr | Ala | His | Asn | Asn | Tyr | Gln | Ala | Gln | Ser | Ala | Val | Pro |
|     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Leu | Arg | His | Glu | Thr | His | Gly | Gly | Glu | Asp | Val | Ala | Val | Phe | Ala | Lys |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     |     | 460 |     |     |     |
| Gly | Pro | Met | Ala | His | Leu | Leu | His | Gly | Val | His | Glu | Gln | Asn | Tyr | Ile |
|     | 465 |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Pro | His | Val | Met | Ala | Tyr | Ala | Ser | Cys | Ile | Gly | Ala | Asn | Leu | Asp | His |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Cys | Ala | Trp | Ala | Ser | Ser | Ala | Ser | Ser | Pro | Ser | Pro | Gly | Ala | Leu | Leu |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Leu | Pro | Leu | Ala | Leu | Phe | Pro | Leu | Arg | Thr | Leu | Phe |     |     |     |     |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 502

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Canis familiaris

&lt;400&gt; 11

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

Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val Gly Val Ser Ala Ala Thr  
 100 105 110

Gln Arg Thr His Cys Asn Thr Thr Gln Gly Asn Glu Val Thr Ser Ile  
 115 120 125

Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser Val Gly Ile Val Thr Thr  
 130 135 140

Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala Ala Tyr Ala His Ser Ala  
 145 150 155 160

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

Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu Met His Asn Val Lys Asp  
 180 185 190

Ile Glu Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met Phe Pro Lys Asn  
 195 200 205

Arg Thr Asp Val Glu Tyr Glu Met Asp Glu Lys Ser Thr Gly Ala Arg  
 210 215 220

Leu Asp Gly Leu Asn Leu Ile Asp Ile Trp Lys Asn Phe Lys Pro Arg  
 225 230 235 240

His Lys His Ser His Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Leu Ala Leu  
 245 250 255

Asp Pro Tyr Thr Val Asp Tyr Leu Leu Gly Leu Phe Asp Pro Gly Asp  
 260 265 270

Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val Thr Asp Pro Ser Leu Ser  
 275 280 285

Glu Met Val Glu Ile Ala Ile Lys Ile Leu Ser Lys Lys Pro Arg Gly  
 290 295 300

Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His Glu  
 305 310 315 320

Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala Val Glu Met Asp Arg Ala  
325 330 335

Ile Gly Lys Ala Gly Val Met Thr Ser Leu Glu Asp Thr Leu Thr Val  
340 345 350

Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr Phe Gly Gly Tyr Thr Pro  
355 360 365

Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Met Val Ser Asp Thr Asp  
370 375 380

Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Lys  
385 390 395 400

Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser Met Val Asp Tyr Ala His  
405 410 415

Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro Leu Arg His Glu Thr His  
420 425 430

Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Lys Gly Pro Met Ala His Leu  
435 440 445

Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Ile Pro His Val Met Ala Tyr  
450 455 460

Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Gln Asp His Cys Ala Ser Ala Ser Ser  
465 470 475 480

Ala Gly Gly Pro Ser Pro Gly Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu  
485 490 495

Pro Val Gly Ile Leu Phe  
500

<211> 528

&lt;212&gt; PRT

<213> homo sapiens

<400> 12

Met Gln Gly Pro Trp Val Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu  
1 5 10 15

Ser Leu Gly Val Ile Pro Ala Glu Glu Glu Asn Pro Ala Phe Trp Asn  
                   20                  25                  30

Arg Gln Ala Ala Glu Ala Leu Asp Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ile  
                   35                  40                  45

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

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

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

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

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

Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg  
   130                  135                  140

Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Gln Ala Gly Lys  
  145                  150                  155                  160

Ser Val Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala  
                   165                  170                  175

Gly Thr Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp  
           180                  185                  190

Met Pro Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln  
           195                  200                  205

Leu Ile Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys  
   210                  215                  220

Tyr Met Phe Pro Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Ala Asp Ala  
  225                  230                  235                  240

Ser Gln Asn Gly Ile Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp  
 245 250 255

Leu Ala Lys His Gln Gly Ala Trp Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu  
 260 265 270

Met Gln Ala Ser Leu Asp Gln Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe  
 275 280 285

Glu Pro Gly Asp Thr Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Pro Thr Leu Asp  
 290 295 300

Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg  
 305 310 315 320

Asn Pro Arg Gly Phe Tyr Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His  
 325 330 335

Gly His His Glu Gly Val Ala Tyr Gln Ala Leu Thr Glu Ala Val Met  
 340 345 350

Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp  
 355 360 365

Thr Leu Thr Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly  
 370 375 380

Gly Tyr Thr Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Ser Lys  
 385 390 395 400

Ala Gln Asp Ser Lys Ala Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro  
 405 410 415

Gly Tyr Val Phe Asn Ser Gly Val Arg Pro Asp Val Asn Glu Ser Glu  
 420 425 430

Ser Gly Ser Pro Asp Tyr Gln Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ser Ser  
 435 440 445

Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln  
 450 455 460

Ala His Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Ser Phe Val Ala His Val  
465 470 475 480

Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala  
485 490 495

Pro Pro Ala Cys Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Val Ala Ala Ser Leu  
500 505 510

Pro Leu Leu Ala Gly Thr Leu Leu Leu Leu Gly Ala Ser Ala Ala Pro  
515 520 525

<210> 13

<211> 532

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 13

Met Gln Gly Pro Trp Val Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu  
1 5 10 15

Ser Leu Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn  
20 25 30

Arg Gln Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala  
35 40 45

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

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

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

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

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

Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg  
130 135 140

Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys  
145 150 155 160

Ser Val Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala  
165 170 175

Gly Ala Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp  
180 185 190

Val Pro Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln  
195 200 205

Leu Ile Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys  
210 215 220

Tyr Met Phe Pro Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr  
225 230 235 240

Ser Gln Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp  
245 250 255

Leu Ala Lys His Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu  
260 265 270

Leu Gln Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe  
275 280 285

Glu Pro Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp  
290 295 300

Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ser Arg  
305 310 315 320

Asn Pro Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His  
325 330 335

Gly His His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met  
340 345 350

Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp  
355 360 365

Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly  
370 375 380

Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys  
385 390 395 400

Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro  
405 410 415

Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu  
420 425 430

Ser Gly Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Gly  
435 440 445

Glu Thr His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln  
450 455 460

Ala His Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val  
465 470 475 480

Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala  
485 490 495

Pro Arg Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Pro Ser Val Val  
500 505 510

Pro Ala Leu Leu Pro Leu Leu Ala Gly Thr Leu Leu Leu Leu Gly Thr  
515 520 525

Ala Thr Ala Pro  
530

<210> 14

<211> 535

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 14

Met Leu Gly Pro Cys Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg  
1 5 10 15

Leu Gln Leu Ser Leu Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp



Gln Glu Trp Leu Ala Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg  
 260 265 270

Thr Glu Leu Met Gln Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met  
 275 280 285

Gly Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser  
 290 295 300

Thr Leu Asp Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu  
 305 310 315 320

Leu Ser Arg Asn Pro Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg  
 325 330 335

Ile Asp His Gly His His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu  
 340 345 350

Thr Ile Met Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser  
 355 360 365

Glu Glu Asp Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe  
 370 375 380

Ser Phe Gly Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala  
 385 390 395 400

Pro Gly Lys Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly  
 405 410 415

Asn Gly Pro Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr  
 420 425 430

Glu Ser Glu Ser Gly Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro  
 435 440 445

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

Gly Pro Gln Ala His Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile  
 465 470 475 480

Ala His Val Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys  
 485 490 495

Asp Leu Ala Pro Pro Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Arg  
 500 505 510

Ser Val Val Pro Ala Leu Leu Pro Leu Leu Ala Gly Thr Leu Leu Leu  
 515 520 525

Leu Glu Thr Ala Thr Ala Pro  
 530 535

<210> 15

<211> 541

<212> PRT

<213> Artificial

<220> <223> ALP consenso: TNALP de várias espécies de mamíferos e isoenzimas ALP humanas PLAP, GCALP, IALP (com péptido de sinalização e domínio de ancoragem GPI)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(4)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(9)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (10)..(21)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto fenilalanina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (23)..(27)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (29)..(30) <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (32)..(32)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (33)..(33)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto cisteína

<220>

<221> misc\_feature

<222> (35)..(37)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (39)..(41)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (43)..(44)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (46)..(47)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (50)..(53)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (54)..(54)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (55)..(55)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (56)..(56)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto serina ou valina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (59)..(59)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (61)..(61)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (67)..(67)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto leucina, isoleucina ou valina

<220>

<221> misc feature

<222> (70)..(70)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (75)..(75)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (B2)..(86)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (88)..(88)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (90)..(91)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (93)..(93)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (96) ..(96)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (99)..(100)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (107)..(111)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (116)..(116)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto treonina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (117)..(117)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto serina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (128)..(128)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto aspartato

<220>

<221> misc\_feature

<222> (130)..(131)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (133)..(133)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto metionina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (135)..(135)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (139)..(139)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto histidina ou uma asparagina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (140)..(140)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (141)..(141)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto histidina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (142)..(143)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (148)..(148)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220> <221> VARIANTE

<222> (153)..(153)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto alanina ou isoleucina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (155)..(158)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (161)..(162)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (168)..(168)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (175)..(175)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto aspartato

<220>

<221> misc\_feature

<222> (178)..(178)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (180)..(180)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (181)..(181)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto treonina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (182)..(182)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto treonina

<220> <221> VARIANTE

<222> (186)..(186)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto leucina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (187)..(188)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature <222> (190)..(190)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (195)..(195)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (196)..(196)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto lisina ou glicina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (197)..(197)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto treonina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (199)..(200)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (202)..(204)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (207)..(207)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (211)..(211)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (214)..(215)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto fenilalanina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (218)..(218)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (221)..(221)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (224)..(224)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (232)..(237)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (239)..(239)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (240)..(240)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto glicina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (242)..(243)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (245)..(248)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (250)..(250)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (255)..(256)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (258)..(260)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (262)..(262)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (263)..(265)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (266)..(268)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (269)..(269)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto arginina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (270)..(274)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (279)..(279)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (281)..(286)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (287)..(287)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (288)..(288)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (290)..(291)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (293)..(293)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (297)..(297)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto lisina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (301)..(301)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto valina, treonina ou isoleucina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (302)..(302)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (305)..(305)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto prolina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (306)..(306)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (308)..(311)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (316)..(316)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (319)..(321)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (323)..(325)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (327)..(331)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (334)..(334)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto leucina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (336)..(336)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (349)..(350)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (352)..(353)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (356)..(356)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (358)..(359)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (360)..(360)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto aspartato

<220>

<221> VARIANTE

<222> (361)..(361)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto treonina ou isoleucina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (363)..(363)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (366)..(367)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (370)..(371)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (374)..(375)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (379)..(379)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (380)..(380)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto metionina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (390)..(390) <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (395)..(395)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto leucina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (396)..(396)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (399)..(399)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (407)..(410)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (411)..(411)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (413)..(413)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (415)..(415)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (416)..(416)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto leucina

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (418)..(419)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (428)..(428)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (429)..(429)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto alanina

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (430)..(430)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto metionina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (431)..(431)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (433)..(433)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (435)..(435)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto lisina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (436)..(436)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (438)..(441)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (442)..(442)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto histidina

<220>

<221> misc feature

<222> (443)..(446)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (448)..(449)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (451)..(451)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto prolina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (456).. (456)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto histidina ou cisteína

<220> <221> misc\_feature

<222> (457)..(457)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (461)..(461)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto serina ou um aspartato

<220>

<221> misc\_feature

<222> (469)..(470)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (473)..(473)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto treonina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (477)..(477)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (481)..(481)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (484)..(484)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto leucina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (485)..(487)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (492)..(492)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (494)..(494)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (496)..(496)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto fenilalanina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (497)..(497)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto arginina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (498)..(501)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (502)..(507)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (509)..(516)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (517)..(520)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (521)..(524)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (526)..(532)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (534)..(534)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (535)..(541)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<400> 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Pro Xaa  
 20 25 30  
 Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Leu  
 35 40 45  
 Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Asn Xaa Ile Xaa Phe Leu Gly  
 50 55 60  
 Asp Gly Xaa Gly Val Xaa Thr Val Thr Ala Xaa Arg Ile Leu Lys Gly  
 65 70 75 80  
 Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Glu Xaa Xaa Leu Xaa Met Asp Xaa  
 85 90 95  
 Phe Pro Xaa Xaa Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Val  
 100 105 110  
 Pro Asp Ser Xaa Xaa Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Xaa  
 115 120 125  
 Asn Xaa Xaa Thr Xaa Gly Xaa Ser Ala Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Cys  
 130 135 140  
 Asn Thr Thr Xaa Gly Asn Glu Val Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Lys  
 145 150 155 160  
 Xaa Xaa Gly Lys Ser Val Gly Xaa Val Thr Thr Thr Arg Val Xaa His  
 165 170 175  
 Ala Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Tyr Ala His Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Trp Tyr  
 180 185 190  
 Ser Asp Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Gly Cys Xaa Asp  
 195 200 205  
 Ile Ala Xaa Gln Leu Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Asp Ile Xaa Val Ile Xaa  
 210 215 220  
 Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Glu  
 225 230 235 240  
 Tyr Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Arg Leu Asp Gly Xaa Xaa  
 245 250 255  
 Leu Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 260 265 270

Xaa Xaa Trp Asn Arg Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 275 280 285

Val Xaa Xaa Leu Xaa Gly Leu Phe Xaa Pro Gly Asp Xaa Xaa Tyr Glu  
 290 295 300

Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Pro Ser Leu Xaa Glu Met Xaa Xaa  
 305 310 315 320

Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Phe Xaa Leu Xaa  
 325 330 335

Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His Glu Xaa Xaa Ala Xaa  
 340 345 350

Xaa Ala Leu Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ala Ile Xaa Xaa Ala  
 355 360 365

Gly Xaa Xaa Thr Ser Xaa Xaa Asp Thr Leu Xaa Xaa Val Thr Ala Asp  
 370 375 380

His Ser His Val Phe Xaa Phe Gly Gly Tyr Xaa Xaa Arg Gly Xaa Ser  
 385 390 395 400

Ile Phe Gly Leu Ala Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Lys Xaa Xaa  
 405 410 415

Thr Xaa Xaa Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Gly  
 420 425 430

Xaa Arg Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa  
 435 440 445

Xaa Gln Xaa Ala Val Pro Leu Xaa Xaa Glu Thr His Xaa Gly Glu Asp  
 450 455 460

Val Ala Val Phe Xaa Xaa Gly Pro Xaa Ala His Leu Xaa His Gly Val  
 465 470 475 480

Xaa Glu Gln Xaa Xaa Xaa Xaa His Val Met Ala Xaa Ala Xaa Cys Xaa  
 485 490 495

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa

|  |                                                                 |  |     |  |     |
|--|-----------------------------------------------------------------|--|-----|--|-----|
|  | 500                                                             |  | 505 |  | 510 |
|  | Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa |  |     |  |     |
|  | 515                                                             |  | 520 |  | 525 |
|  | Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa |  |     |  |     |
|  | 530                                                             |  | 535 |  | 540 |

<210> 16

<211> 524

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> TNALP consenso de várias espécies de mamíferos (com péptido de sinalização e domínio de ancoragem GPI)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (14) ..(16)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (24)..(24)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (27)..(27)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (31)..(31)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220> <221> misc\_feature

<222> (35)..(35)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (39)..(39)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (42)..(42)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (45)..(45)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (51)..(51)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto serina ou valina

<220>

<221> misc feature

<222> (54)..(54)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (70)..(70)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (80)..(81)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (86)..(86)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> misc feature  
<222> (94)..(94)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (135)..(135)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> misc\_feature <222> (137)..(138)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (157)..(157)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (177)..(177)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto treonina

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (210)..(210)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> VARIANTE

<222> (212)..(212)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto fenilalanina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (213)..(213)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (216)..(216)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (227)..(227)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (231)..(231)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (238)..(238)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (242)..(243)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (245)..(245)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (251)..(251)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (253)..(255)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (258)..(258)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (262)..(263)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (268)..(269)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (274)..(274)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (277)..(277)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (281)..(282)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (291)..(291)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto lisina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (303)..(304)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (314)..(315)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (317)..(318)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (321)..(321)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (323)..(325)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (357)..(357)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (361)..(361)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (364)..(365)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (368)..(369)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (374)..(374)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural exceto metionina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (402)..(402)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (412)..(412)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (425)..(425)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (463)..(463)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (475)..(475)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (480)..(480)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (488)..(488)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (494)..(495)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (499)..(499)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (501)..(501)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (503)..(508)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (510)..(510)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (512)..(512)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (514)..(514)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (517)..(522)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 16

Met Ile Xaa Pro Phe Leu Xaa Leu Ala Ile Gly Thr Cys Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15  
 Ser Xaa Val Pro Glu Lys Glu Xaa Asp Pro Xaa Tyr Trp Arg Xaa Gln  
 20 25 30  
 Ala Gln Xaa Thr Leu Lys Xaa Ala Leu Xaa Leu Gln Xaa Leu Asn Thr  
 35 40 45  
 Asn Val Xaa Lys Asn Xaa Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val  
 50 55 60  
 Ser Thr Val Thr Ala Xaa Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Xaa  
 65 70 75 80  
 Xaa Gly Glu Glu Thr Xaa Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Xaa Val Ala  
 85 90 95  
 Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly  
 100 105 110  
 Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val  
 115 120 125  
 Gly Val Ser Ala Ala Thr Xaa Arg Xaa Xaa Cys Asn Thr Thr Gln Gly  
 130 135 140  
 Asn Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Xaa Gly Lys Ser  
 145 150 155 160  
 Val Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala  
 165 170 175  
 Xaa Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met  
 180 185 190  
 Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu  
 195 200 205  
 Met Xaa Asn Xaa Xaa Asp Ile Xaa Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys  
 210 215 220

Tyr Met Xaa Pro Lys Asn Xaa Thr Asp Val Glu Tyr Glu Xaa Asp Glu  
 225 230 235 240

Lys Xaa Xaa Gly Xaa Arg Leu Asp Gly Leu Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Trp  
 245 250 255

Lys Xaa Phe Lys Pro Xaa Xaa Lys His Ser His Xaa Xaa Trp Asn Arg  
 260 265 270

Thr Xaa Leu Leu Xaa Leu Asp Pro Xaa Xaa Val Asp Tyr Leu Leu Gly  
 275 280 285

Leu Phe Xaa Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Xaa Xaa  
 290 295 300

Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Ile Leu  
 305 310 315 320

Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile  
 325 330 335

Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala  
 340 345 350

Val Glu Met Asp Xaa Ala Ile Gly Xaa Ala Gly Xaa Xaa Thr Ser Xaa  
 355 360 365

Xaa Asp Thr Leu Thr Xaa Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr  
 370 375 380

Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro  
 385 390 395 400

Met Xaa Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Xaa Ile Leu Tyr Gly  
 405 410 415

Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Xaa Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser  
 420 425 430

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

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

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

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

Cys Ala Xaa Ala Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Leu Xaa  
 500 505 510

Leu Xaa Leu Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Phe  
 515 520

<210> 17

<211> 2232

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> hsTNALP-FcD10

<400> 17

```

atggtttcac cattcttagt actggccatt ggcacctgcc ttactaaactc cttagtgcc 60
gagaaagaga aagaccccaa gtactggcga gaccaagcgc aagagacact gaaatatgcc 120
ctggagcttc agaagctcaa caccaacgtg gctaagaatg tcatcatggt cctgggagat 180
gggatgggtg tctccacagt gacggctgcc cgcacctca agggtcagct ccaccacaac 240
cctggggagg agaccaggct ggagatggac aagttcccct tcgtggccct ctccaagacg 300
tacaacacca atgcccaggt ccctgacagc gccggcaccg ccaccgcta cctgtgtggg 360
gtgaaggcca atgagggcac cgtgggggta agcgcagcca ctgagcgttc ccggtgcaac 420
accacccagg ggaacgaggt cacctccatc ctgcgctggg ccaaggacgc tgggaaatct 480
gtgggcattg tgaccaccac gagagtgaac catgccaccc ccagcgccgc ctacgccac 540
tcggctgacc gggactggtg ctcagacaac gagatgcccc ctgaggcctt gagccagggc 600
tgtaaggaca tcgcctacca gctcatgcat aacatcaggg acattgacgt gatcatgggg 660
ggtggccgga aatacatgta ccccaagaat aaaactgatg tggagtatga gagtgcagag 720
aaagccaggg gcacgaggct ggacggcctg gacctcgttg acacctggaa gagcttcaaa 780
ccgagataca agcactccca cttcatctgg aaccgcacgg aactcctgac ccttgacccc 840

```

```

cacaatgtgg actacctatt gggctctcttc gagccagggg acatgcagta cgagctgaac   900
aggaacaacg tgacggaccc gtcactctcc gagatggtgg tggtgccat ccagatcctg   960
cggaagaacc ccaaaggctt cttcttgctg gtggaaggag gcagaattga ccacgggcac  1020
catgaaggaa aagccaagca ggcctgcat gaggcggtgg agatggaccg ggccatcggg  1080
caggcaggca gcttgacctc ctcggaagac actctgaccg tggtcactgc ggaccattcc  1140
cacgtcttca cttttggtgg atacaccccc cgtggcaact ctatctttgg tctggccccc  1200
atgctgagtg acacagacaa gaagcccttc actgccatcc tgtatggcaa tgggcctggc  1260
tacaaggtgg tgggcggtga acgagagaat gtctccatgg tggactatgc tcacaacaac  1320
taccaggcgc agtctgctgt gccctgcgc cagcagaccc acggcgggga ggacgtggcc  1380
gtcttctcca agggcccat ggcgacctg ctgcacggcg tccacgagca gaactacgtc  1440
ccccacgtga tggcgtatgc agcctgcatc ggggcccaacc tggccactg tgcctctgcc  1500
agctcgctta aggacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg  1560
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc  1620
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac  1680
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac  1740
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc  1800
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc  1860
tcaaagcca aagggcagcc ccgagaacca cagggtgtaca ccctgcccc atcccgggag  1920
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac  1980
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc  2040
gtgctggact ccgacggctc cttcttcttc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg  2100
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttga caaccactac  2160
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaagatatcg atgacgatga cgatgacgat  2220
gacgatgact ag                                     2232

```

<210> 18

<211> 541

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> ALP consenso: TNALP de vários tecidos de espécies de mamíferos e isoenzimas ALP humanas PLAP, GCALP, IALP (com péptido de sinalização e domínio de ancoragem GPI)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(4)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(9)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc feature

<222> (10)..(21)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (22).. (22)

<223> Xaa é uma serina ou uma glicina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (23)..(27)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (29)..(30)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (32)..(32)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (33)..(33)

<223> Xaa é uma tirosina ou uma fenilalanina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (35)..(37)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (39).. (41)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (43)..(44)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (46).. (47)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (50).. (53)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (54)..(54)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (55)..(55)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (59)..(59)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (61).. (61)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (70) ..(70)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (75)..(75)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (82)..(86)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (88)..(88)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (90)..(91)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (93).. (93)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (96).. (96)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (99)..(100)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (107)..(111)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (116)..(117)

<223> Xaa é uma alanina ou uma glicina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (128)..(128)

<223> Xaa é uma alanina ou uma glicina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (130)..(131)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (133)..(133)

<223> Xaa é uma valina ou uma isoleucina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (135)..(135)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (139)..(139)

<223> Xaa é uma treonina ou uma alanina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (140)..(140)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (141)..(141)

<223> Xaa é uma arginina ou uma fenilalanina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (142)..(143)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (148)..(148)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (155)..(158)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (161)..(162)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (168)..(168)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (175)..(175)

<223> Xaa é uma asparagina ou uma glutamina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (178)..(178)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (180)..(180)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (181)..(181)

<223> Xaa é uma alanina ou uma glicina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (182)..(182)

<223> Xaa é uma alanina, uma serina ou uma treonina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (186)..(186)

<223> Xaa é uma serina ou uma treonina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (187)..(188)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (190)..(190)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (195)..(195)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (196)..(196)

<223> Xaa é um glutamato ou um aspartato

<220>

<221> VARIANTE

<222> (197)..(197)

<223> Xaa é uma metionina ou uma valina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (199)..(200)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (202)..(204)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (207)..(207)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (211)..(211)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (214)..(215)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa é uma isoleucina, uma valina ou uma metionina

<220> <221> VARIANTE

<222> (218)..(218)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (221)..(221)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (224)..(224)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (232)..(237)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (239)..(239)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (240)..(240)

<223> Xaa é uma valina ou uma prolina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (242)..(243)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (245)..(248)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (250) .. (250)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (255) .. (256)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (258) .. (260)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (262) .. (262) <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (263) .. (265)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (266) .. (268)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (269) .. (269)

<223> Xaa é uma lisina ou uma glutamina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (270)..(274)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (279)..(279)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (281)..(286)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (287)..(287)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (288)..(288)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (290)..(291)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (293)..(293)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (297)..(297)  
<223> Xaa é um glutamato ou uma aspartato

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (302)..(302)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (305)..(305)  
<223> Xaa é uma leucina ou uma isoleucina

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (306)..(306)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (308)..(311)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (316)..(316)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (319)..(321)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (323)..(325)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (327)..(331)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (334)..(334)

<223> Xaa é uma fenilalanina ou uma tirosina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (336)..(336)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (349)..(350)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature <222> (352)..(353)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (356)..(356)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (358)..(359)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (360)..(360)

<223> Xaa é um glutamato ou uma metionina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (361)..(361)

<223> Xaa é uma metionina ou uma fenilalanina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (363)..(363)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (366)..(367)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (370)..(371)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (374)..(375)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (379)..(379)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (380)..(380)

<223> Xaa é uma valina, uma isoleucina ou uma leucina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (390)..(390)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (395)..(395)

<223> Xaa é uma treonina ou uma prolina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (396)..(396)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (399)..(399)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (407)..(410)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (411)..(411)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (413)..(413)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (415)..(415)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (416)..(416)

<223> Xaa é uma fenilalanina ou uma tirosina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (418)..(419)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (428)..(428)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (429)..(429)

<223> Xaa é uma valina, uma leucina ou uma fenilalanina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (430)..(430)

<223> Xaa é uma valina, uma lisina ou uma asparagina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (431)..(431)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (433)..(433)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (435)..(435)

<223> Xaa é um glutamato ou uma prolina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (436)..(436)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (438)..(441)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (442)..(442)

<223> Xaa é uma tirosina ou uma serina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (443)..(446)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (448)..(449)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (451)..(451)

<223> Xaa é uma serina ou uma alanina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (456)..(456)

<223> Xaa é uma arginina, um aspartato ou uma serina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (456)..(456) <223> Xaa é uma arginina, um aspartato  
ou uma serina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (457)..(457)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência  
natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (461)..(461)

<223> Xaa é uma glicina ou uma alanina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (469)..(470)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência  
natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (473)..(473)

<223> Xaa é uma metionina ou uma glutamina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (477)..(477)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (481)..(481)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (484)..(484)

<223> Xaa é uma asparagina, uma treonina ou uma serina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (485)..(487)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (492)..(492)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (494)..(494)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (496)..(496)

<223> Xaa é uma isoleucina ou uma leucina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (497)..(497)

<223> Xaa é uma glicina ou um glutamato

<220>

<221> VARIANTE

<222> (498)..(501)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (502)..(507)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (509)..(516)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (517)..(520)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (521)..(524)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (526)..(532)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (534)..(534)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (535)..(540)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural ou ausente

<220>

<221> misc\_feature

<222> (541)..(541)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 18

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Pro Xaa



Leu Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 260 265 270

Xaa Xaa Trp Asn Arg Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 275 280 285

Val Xaa Xaa Leu Xaa Gly Leu Phe Xaa Pro Gly Asp Met Xaa Tyr Glu  
 290 295 300

Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Pro Ser Leu Xaa Glu Met Xaa Xaa  
 305 310 315 320

Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Phe Xaa Leu Xaa  
 325 330 335

Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His Glu Xaa Xaa Ala Xaa  
 340 345 350

Xaa Ala Leu Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ala Ile Xaa Xaa Ala  
 355 360 365

Gly Xaa Xaa Thr Ser Xaa Xaa Asp Thr Leu Xaa Xaa Val Thr Ala Asp  
 370 375 380

His Ser His Val Phe Xaa Phe Gly Gly Tyr Xaa Xaa Arg Gly Xaa Ser  
 385 390 395 400

Ile Phe Gly Leu Ala Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Lys Xaa Xaa  
 405 410 415

Thr Xaa Xaa Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Gly  
 420 425 430

Xaa Arg Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa  
 435 440 445

Xaa Gln Xaa Ala Val Pro Leu Xaa Xaa Glu Thr His Xaa Gly Glu Asp  
 450 455 460

Val Ala Val Phe Xaa Xaa Gly Pro Xaa Ala His Leu Xaa His Gly Val  
 465 470 475 480

Xaa Glu Gln Xaa Xaa Xaa Xaa His Val Met Ala Xaa Ala Xaa Cys Xaa  
 485 490 495

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa  
 500 505 510

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa  
 515 520 525

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 530 535 540

<210> 19

<211> 524

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> TNALP consenso de várias espécies de mamíferos (com  
 péptido de sinalização e domínio de ancoragem GPI)

<220>

<221> misc feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência  
 natural

<220>

<221> misc feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência  
 natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (14) ..(16)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência  
 natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (24)..(24)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc feature

<222> (27)..(27)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (31)..(31)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (35)..(35)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (39)..(39)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (42) ..(42)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (45)..(45)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (54)..(54)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (70)..(70)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (80)..(81)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (86)..(86)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (94)..(94)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (135)..(135)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (137)..(138)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (157)..(157)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (177)..(177)

<223> Xaa pode ser uma serina ou uma alanina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (210)..(210)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (212)..(212)

<223> Xaa pode ser isoleucina ou valina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (213)..(213)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (216)..(216)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (227)..(227)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (231)..(231)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (238)..(238)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (242)..(243)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (245)..(245)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (251)..(251)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (253)..(255)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (258)..(258)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (262)..(263)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (268)..(269)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (274)..(274)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (277)..(277)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (281)..(282)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (291)..(291)  
<223> Xaa pode ser um glutamato ou um aspartato

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (303)..(304)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (314)..(315)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220> <221> misc\_feature  
<222> (317)..(318)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (321)..(321)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (323)..(325)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (357)..(357)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (361)..(361)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (364)..(365)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (368)..(369)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (374)..(374)

<223> Xaa pode ser uma valina ou uma isoleucina

<220>

<221> misc\_feature

<222> (402)..(402)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature -

<222> (412)..(412)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (425)..(425)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (463)..(463)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (475)..(475)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (480)..(480)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (488)..(488)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (494)..(495)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (499)..(499)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (501)..(501)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (503)..(508)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (510)..(510)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (512)..(512)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (514)..(514)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (517)..(522)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 19

Met Ile Xaa Pro Phe Leu Xaa Leu Ala Ile Gly Thr Cys Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15  
 Ser Xaa Val Pro Glu Lys Glu Xaa Asp Pro Xaa Tyr Trp Arg Xaa Gln  
 20 25 30  
 Ala Gln Xaa Thr Leu Lys Xaa Ala Leu Xaa Leu Gln Xaa Leu Asn Thr  
 35 40 45  
 Asn Val Ala Lys Asn Xaa Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val  
 50 55 60  
 Ser Thr Val Thr Ala Xaa Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Xaa  
 65 70 75 80  
 Xaa Gly Glu Glu Thr Xaa Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Xaa Val Ala  
 85 90 95  
 Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly  
 100 105 110  
 Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val  
 115 120 125  
 Gly Val Ser Ala Ala Thr Xaa Arg Xaa Xaa Cys Asn Thr Thr Gln Gly  
 130 135 140  
 Asn Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Xaa Gly Lys Ser  
 145 150 155 160  
 Val Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala  
 165 170 175  
 Xaa Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met  
 180 185 190  
 Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu  
 195 200 205  
 Met Xaa Asn Xaa Xaa Asp Ile Xaa Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys  
 210 215 220

Tyr Met Xaa Pro Lys Asn Xaa Thr Asp Val Glu Tyr Glu Xaa Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Lys Xaa Xaa Gly Xaa Arg Leu Asp Gly Leu Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Trp  
 245 250 255  
 Lys Xaa Phe Lys Pro Xaa Xaa Lys His Ser His Xaa Xaa Trp Asn Arg  
 260 265 270  
 Thr Xaa Leu Leu Xaa Leu Asp Pro Xaa Xaa Val Asp Tyr Leu Leu Gly  
 275 280 285  
 Leu Phe Xaa Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Xaa Xaa  
 290 295 300  
 Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Ile Leu  
 305 310 315 320  
 Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile  
 325 330 335  
 Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala  
 340 345 350  
 Val Glu Met Asp Xaa Ala Ile Gly Xaa Ala Gly Xaa Xaa Thr Ser Xaa  
 355 360 365  
 Xaa Asp Thr Leu Thr Xaa Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr  
 370 375 380  
 Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro  
 385 390 395 400  
 Met Xaa Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Xaa Ile Leu Tyr Gly  
 405 410 415  
 Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Xaa Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser  
 420 425 430  
 Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro  
 435 440 445

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

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

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

Cys Ala Xaa Ala Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Leu Xaa  
 500 505 510

Leu Xaa Leu Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Phe  
 515 520

Lisboa, 24 de Fevereiro de 2012

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Uma fosfatase alcalina dirigida ao osso compreendendo um polipéptido com a estrutura:

Z-sALP-Y-spacer-X-W<sub>n</sub>-V,

em que sALP consiste nos resíduos de aminoácidos 18-502 da SEQ ID NO: 8;

em que V está ausente ou é uma sequência de aminoácidos de pelo menos um aminoácido;

X está ausente ou é uma sequência de aminoácidos de pelo menos um aminoácido;

Y está ausente ou é uma sequência de aminoácidos de pelo menos um aminoácido;

Z está ausente ou é uma sequência de aminoácidos de pelo menos um aminoácido;

W<sub>n</sub> é um poliaspartato ou poliglutamato em que n = 10 a 16; e o spacer compreende uma região de fragmento cristalizável (Fc).

2. A fosfatase alcalina da reivindicação 1, em que Fc compreende um domínio CH2, um domínio CH3, ou uma região flexível, ou em que Fc é um domínio constante de uma imunoglobulina selecionada do grupo consistindo em IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-3 e IgG-4, preferencialmente em que o Fc é um domínio constante de uma imunoglobulina IgG-1.
3. A fosfatase alcalina da reivindicação 2, em que Fc é um domínio constante de uma IgG-1 humana.
4. A fosfatase alcalina da reivindicação 3, em que Fc é tal como definido em SEQ ID NO: 3.

5. A fosfatase alcalina de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que  $W_n$  é um poliaspartato, preferencialmente em que  $n = 10$ .
6. A fosfatase alcalina de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que Z está ausente e/ou em que V está ausente.
7. A fosfatase alcalina de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que
  - a) Y é um resíduo de dois aminoácidos, preferencialmente em que Y é uma leucina-lisina; e/ou
  - b) X é um resíduo de dois aminoácidos, preferencialmente em que X é uma aspartato-isoleucina.
8. A fosfatase alcalina da reivindicação 1, em que o polipéptido é tal como definido em SEQ ID NO: 4.
9. A fosfatase alcalina de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, compreendendo o polipéptido numa forma compreendendo um dímero.
10. A fosfatase alcalina de qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a referida fosfatase alcalina consiste no referido polipéptido.
11. A fosfatase alcalina de qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a fosfatase alcalina se encontra num transportador farmacêuticamente aceitável, preferencialmente em que o transportador farmacêuticamente aceitável é uma solução salina, mais preferencialmente em que a fosfatase alcalina se encontra no estado liofilizado.

12. A fosfatase alcalina de qualquer uma das reivindicações 1 a 11 para uso como medicamento.
13. A fosfatase alcalina da reivindicação 12, numa dosagem diária de cerca de 0,2 a cerca de 20 mg/kg, ou uma dosagem semanal de cerca de 1,4 a cerca de 140 mg/kg.
14. Um ácido nucleico isolado compreendendo ou consistindo numa sequência que codifica o polipéptido definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8.
15. Um vetor de expressão recombinante compreendendo o ácido nucleico da reivindicação 14.
16. Um vetor de vírus associado a adenovírus recombinante compreendendo o ácido nucleico da reivindicação 14.
17. Uma célula hospedeira recombinante isolada, transformada ou transfectada com o vetor da reivindicação 15 ou 16.
18. Um método para a produção da fosfatase alcalina de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, compreendendo o cultivo da célula hospedeira da reivindicação 17, em condições adequadas para permitir a expressão da fosfatase alcalina, e a recuperação da fosfatase alcalina do meio de cultura.
19. O método da reivindicação 18, em que a célula hospedeira é uma célula L, uma célula C127, uma célula 3T3, uma célula CHO, uma célula BHK, uma célula COS-7 ou uma célula de ovário de hamster chinês (CHO),

preferencialmente em que a célula hospedeira é uma célula de ovário de hamster chinês (CHO), mais preferencialmente em que a célula hospedeira é uma célula CHO-DG44.

- 20.** Um kit compreendendo a fosfatase alcalina como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, e instruções para a sua utilização num método de correção ou prevenção de um fenótipo de hipofosfatasia (HPP).
- 21.** Uma fosfatase alcalina como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, para utilização num método de correção ou prevenção de pelo menos um fenótipo de hipofosfatasia (HPP) num indivíduo em necessidade da mesma.
- 22.** A fosfatase alcalina da reivindicação 21, em que
- a) o indivíduo tem pelo menos um fenótipo de HPP, preferencialmente em que
    - i) este fenótipo de HPP compreende convulsão relacionada com HPP, ou
    - ii) este fenótipo de HPP compreende perda prematura dos dentes decíduos, ou
    - iii) este fenótipo de HPP compreende mineralização óssea incompleta, preferencialmente em que a mineralização óssea incompleta se trata de mineralização óssea incompleta do fémur, ou mineralização óssea incompleta da tíbia, ou mineralização óssea incompleta do metatarso, ou mineralização óssea incompleta das costelas, ou
    - iv) este fenótipo de HPP compreende níveis elevados de pirofosfato inorgânico (PPi) no sangue e/ou urina, ou

v) este fenótipo de HPP compreende níveis elevados de fosfoetanolamina (PEA) no sangue e/ou urina, ou  
vi) este fenótipo de HPP compreende níveis elevados de piridoxal 5'-fosfato (PLP) no sangue e/ou urina, ou  
vii) este fenótipo de HPP compreende ganho inadequado de peso; ou  
viii) este fenótipo de HPP compreende raquitismo, ou  
ix) este fenótipo de HPP compreende dor óssea, ou  
x) este fenótipo de HPP compreende deposição de cristais de pirofosfato de cálcio dihidrato, ou  
xi) este fenótipo de HPP compreende aplasia, hipoplasia ou displasia do cemento dental.

**23.** A fosfatase alcalina da reivindicação 21 ou 22, em que o indivíduo em necessidade da mesma tem

- a) HPP pré-infantil; ou
- b) HPP infantil; ou
- c) HPP perinatal; ou
- d) HPP adulta;
- e) HPP odontohipofosfatasia.

**24.** A fosfatase alcalina de qualquer uma das reivindicações 21 a 23, em que a utilização compreende a transfecção de uma célula do indivíduo com o ácido nucleico que codifica a fosfatase alcalina, em particular em que a transfecção da célula é realizada *in vitro*, tal que a fosfatase alcalina seja expressa e secretada numa forma ativa e administrada ao indivíduo com a célula referida.

**25.** A fosfatase alcalina de qualquer uma das reivindicações 21 a 23, em que a utilização compreende a administração subcutânea da fosfatase alcalina ao indivíduo.

- 26.** A fosfatase alcalina de qualquer uma das reivindicações 21 a 23, em que a utilização compreende a administração intravenosa da fosfatase alcalina ao indivíduo.

Lisboa, 24 de Fevereiro de 2012

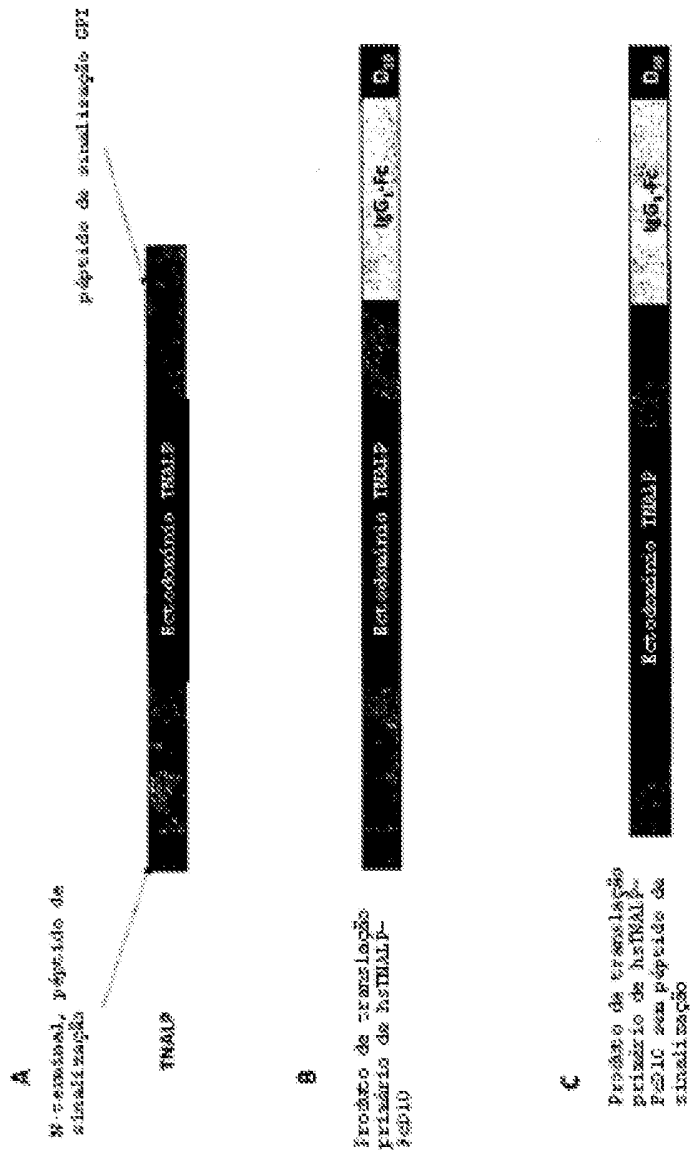


Figura 1

Sequência proteica para TNALF-FcD10 com o péptido de sinalização

MISPFLVLAIGTCLTNSLVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYLELQRLNTNVAKNVIMFLDGGMGVSTV  
TAARILKQQLHHNPOEETRLMDKPPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANBCTVGVSAAT  
ERSRCNTTQGNVTSILRWAKDAGKSVGIIVTTTRVNHATPSAAYAHASADRDWYSDNEMPPPEALSQCC  
KDIAYQLMHHNTRDIDVIMGGGRKYMYPKNKTVEYESDEKARGTRLGGDLVDTWKSEFKPKYKSHHF  
INRTELLTLDPHNVYLLGLFEPGDMQYELNRRNVTDPSLSEMVVVAIQILRXNPKGFFLLVEGCR  
IDGHHECKAKQALHEAVENDRAIQAGSLTSSDTLTVVTADHSHVFTPGCYTPRGNISIFGLAPML  
SDTDKKPFTAILYGNPGYKYVVGGERENVMVDYAHNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSGKPMAN  
LLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSLKDKTHTCPFCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKSTIM  
ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEDQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVENKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRERMTRKQVSLTCLLVKKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDIIDDD  
 DDDDD

|      |          |            |             |             |             |
|------|----------|------------|-------------|-------------|-------------|
| 10   | 20       | 30         | 40          | 50          | 60          |
| MIS  | PFLVLA   | I          | G           | T           | C           |
| 70   | 80       | 90         | 100         | 110         | 120         |
| GM   | GVSTV    | TAA        | RILKQQLHHN  | P           | GEETRLMD    |
| 130  | 140      | 150        | 160         | 170         | 180         |
| VKAN | BCTVGV   | SAATERSRCN | TTQGNVTSI   | LRWAKDAGKS  | VGIVTTTRVN  |
| 190  | 200      | 210        | 220         | 230         | 240         |
| SADR | WYSDN    | EMPPPEALSQ | CKDIA       | YQLMHHN     | NTRDIDVIMG  |
| 250  | 260      | 270        | 280         | 290         | 300         |
| KARG | TRLGGDL  | CLVD       | TWKSEFK     | PKYKSHHF    | I           |
| 310  | 320      | 330        | 340         | 350         | 360         |
| BN   | NVTDPSLS | EMVVVAIQIL | RKNPKGFFLL  | VEGGR       | IDHGH       |
| 370  | 380      | 390        | 400         | 410         | 420         |
| QA   | GLTSSD   | TLTVVTADHS | HVFTPGCYTP  | RGNISIFGLAP | MLSDTDKKPF  |
| 430  | 440      | 450        | 460         | 470         | 480         |
| YK   | VVGGEREN | VSMVDYAHNN | YQAQSAVPLR  | HETHGGEDVA  | VFSGKPMANL  |
| 490  | 500      | 510        | 520         | 530         | 540         |
| PH   | VMAYAACI | GANLGHCAPA | SSLKDKTHTC  | FPFCPAPELLG | GPSVFLFPPK  |
| 550  | 560      | 570        | 580         | 590         | 600         |
| PE   | VT       | CVVDV      | SHEDPEVKFN  | WYVDGVEVHN  | AKTPREEDQY  |
| 610  | 620      | 630        | 640         | 650         | 660         |
| KEY  | KCKVSNK  | ALPAPIEKT  | ISKAKGQPREP | QVYTLPPSR   | ERMTRKQVSLT |
| 670  | 680      | 690        | 700         | 710         | 720         |
| IA   | VEWESNGQ | PENNYKTTTP | VLDSDGSFFL  | YSKLTVDKSR  | WQQGNVFPSCS |
| 730  | 740      |            |             |             |             |
| YQ   | KSLSLSPG | KDIDDDDDDD | DDD         |             |             |

Figura 2

Sequência proteica para TNALP-TC10 sem o péptido de sinalização

```

LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNITVAKQVIMFLQDGMGVSTVTAARILKQQLHNP
GEETRLSEMDKPPFVALSKTYNTNAQVFDASAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAATERSRCNTTOGN
EYTSILRWAKDAGKSVGOIVTTTHVNHATPFAAYAHNSADRDWYSDNEMPFPEALSQCKDIAVQLM
HNIIRDIDVIMGGGRKMYPIKKTQDVEYESDEKARGTRLQGLDLDVDTWKSFKPKRYKHSHPFWMT
ELLTLOPHNVQDYLGLFEPGDMQYELNRRNVTOPSLSEMVVVAIQILKKNPKGFFLLVEGGRID
HGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIQAGSLTSSSEDTLTVVTADSHSVFTFGGYTPRONSIPGLAMP
LSDTDKKPFTAILYGNKGPQYKVVEGERENYVSMVDYAHNNYQAQSAVPLRNETHGQEDVAVPSKG
PHANLLHGVNHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSLKDKTWTCTPCPCAPELLOGPSVFLFPP
KPKDTLMIKSTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNNYVDGVEVHNAKTKPREBOYNSTYRVVSVLTVL
HGHNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKANGQPREPOVYTLFPPREEMTKNOVSLTCLVROFY
PSDIAVWESNGQPENNYKTFPVLDSDGSPFLYSLKLTVDKSRWQQQNVFSCSVMHKALHNNYTT
QKSLSLSPCKDIDDDDDDDDDDD

```

Figure 3

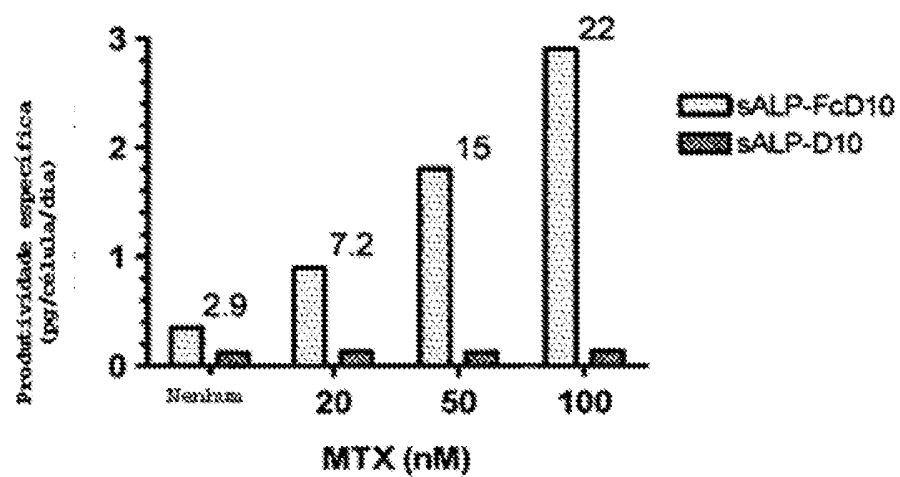


Figura 4

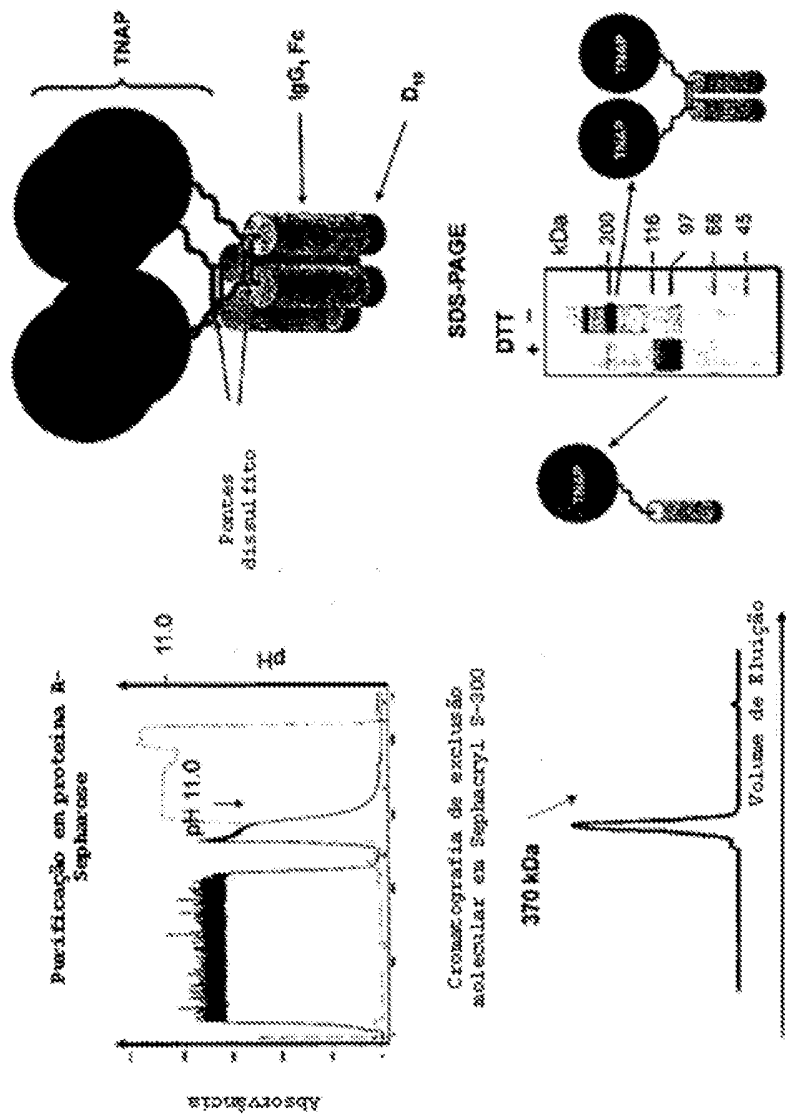


Figura 5

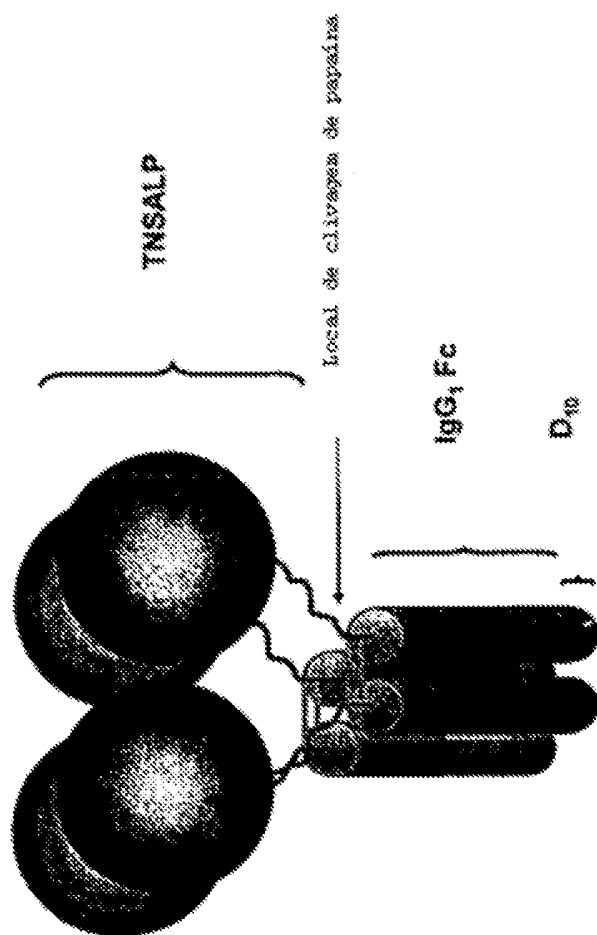


Figura 6

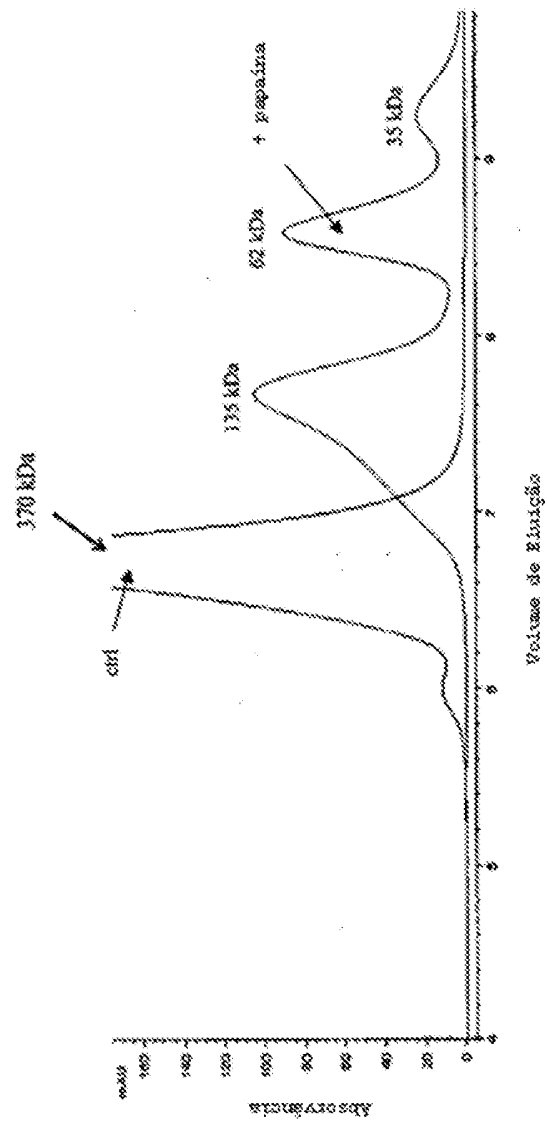


Figura 7

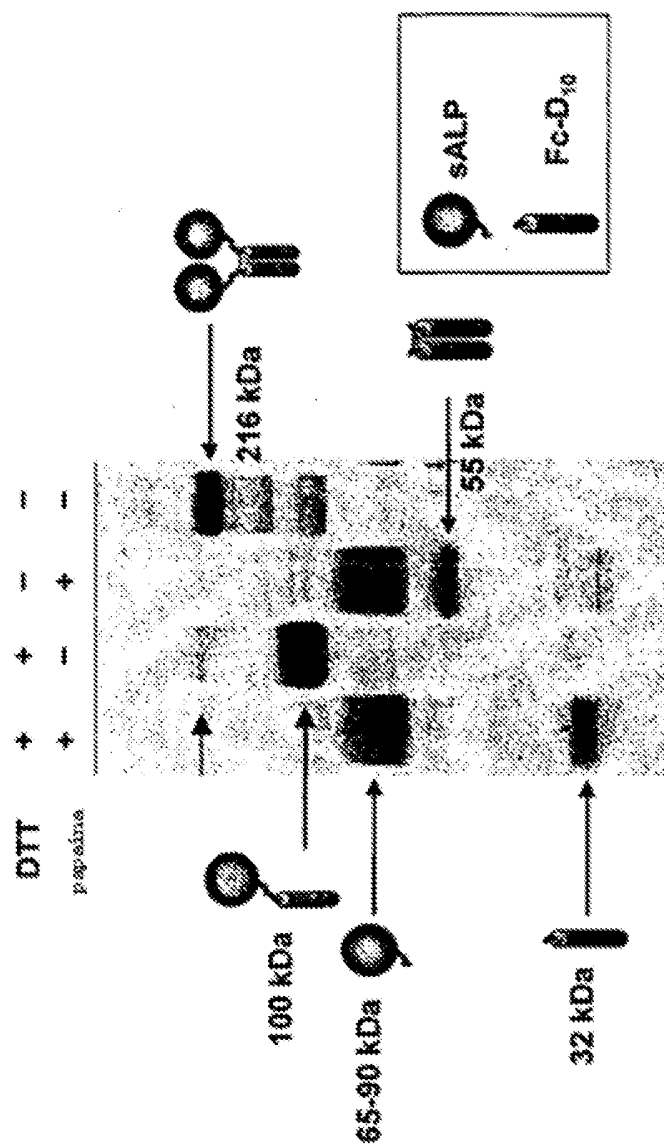


Figura 8

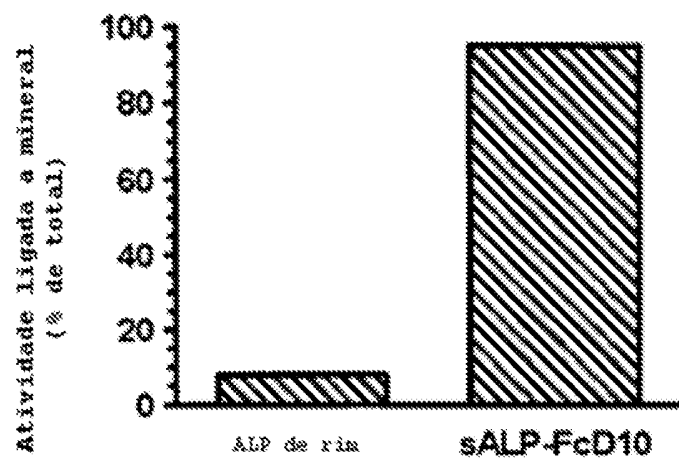


Figura 9

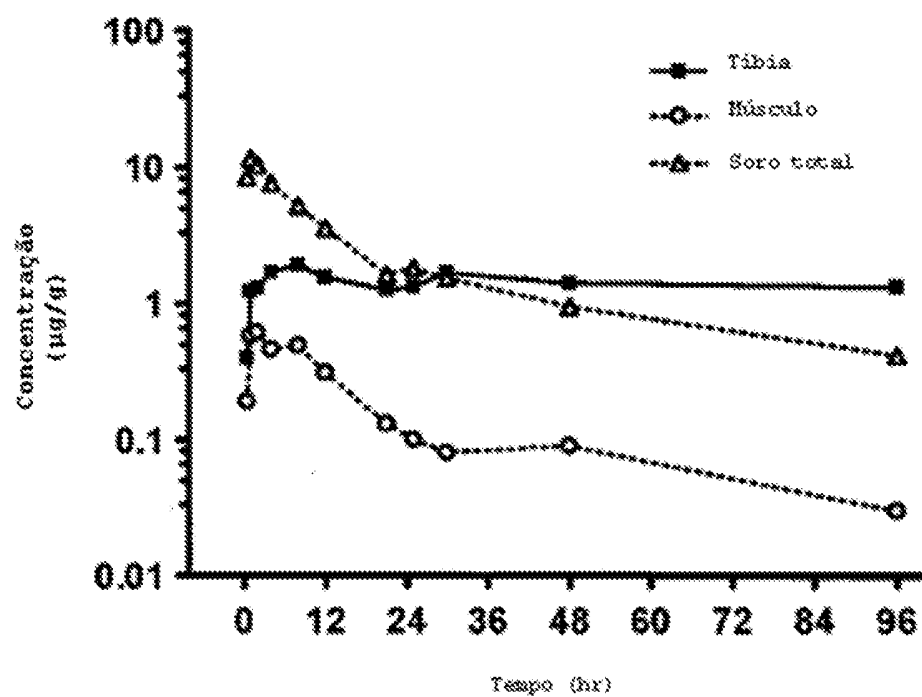


Figura 10

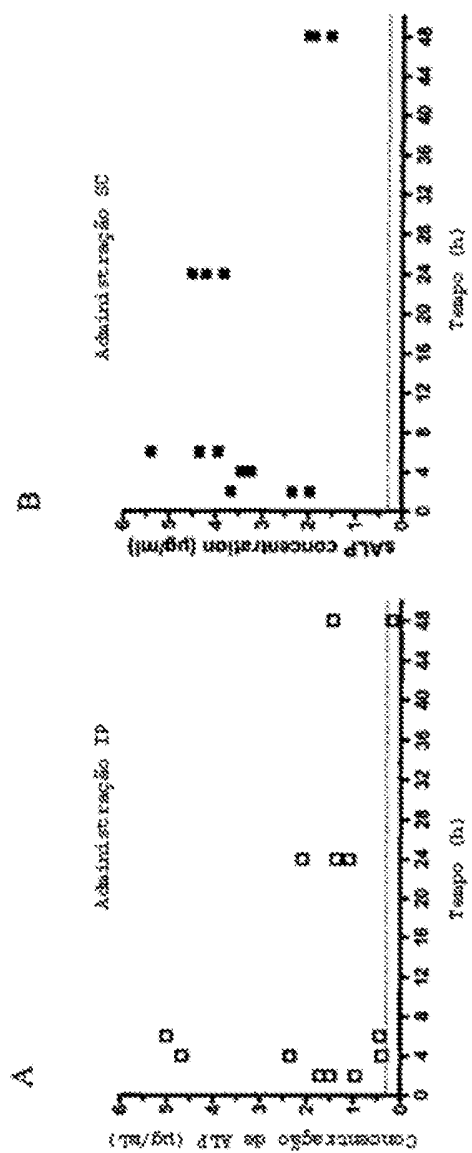


Figura 11

Simulação com dosagem múltipla  
(SC, 10 mg/kg a cada 24 horas)

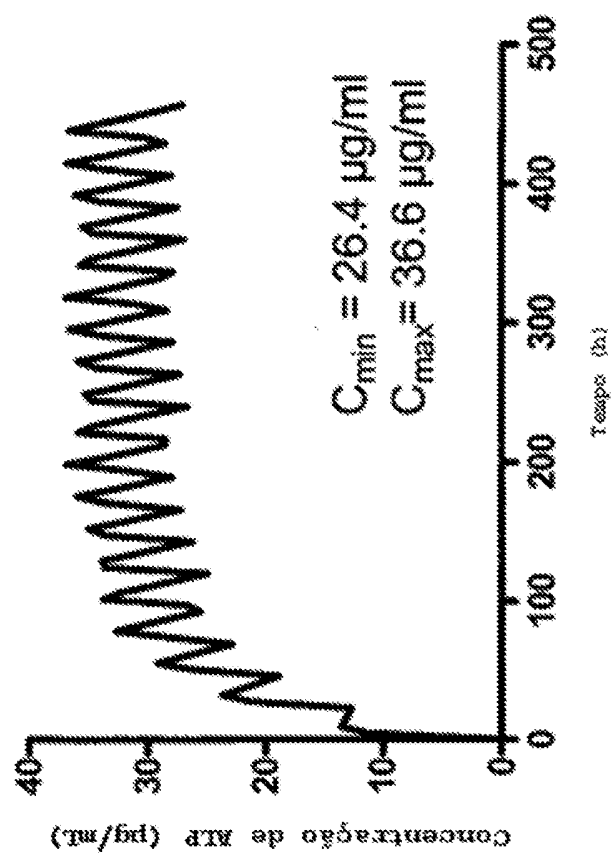
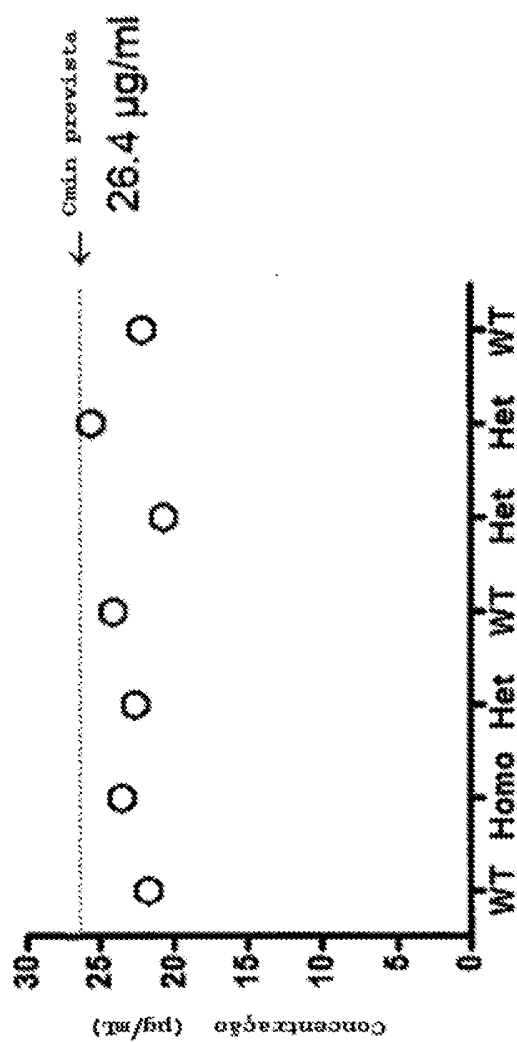


Figura 12



Dia 6 do estudo

Figura 13



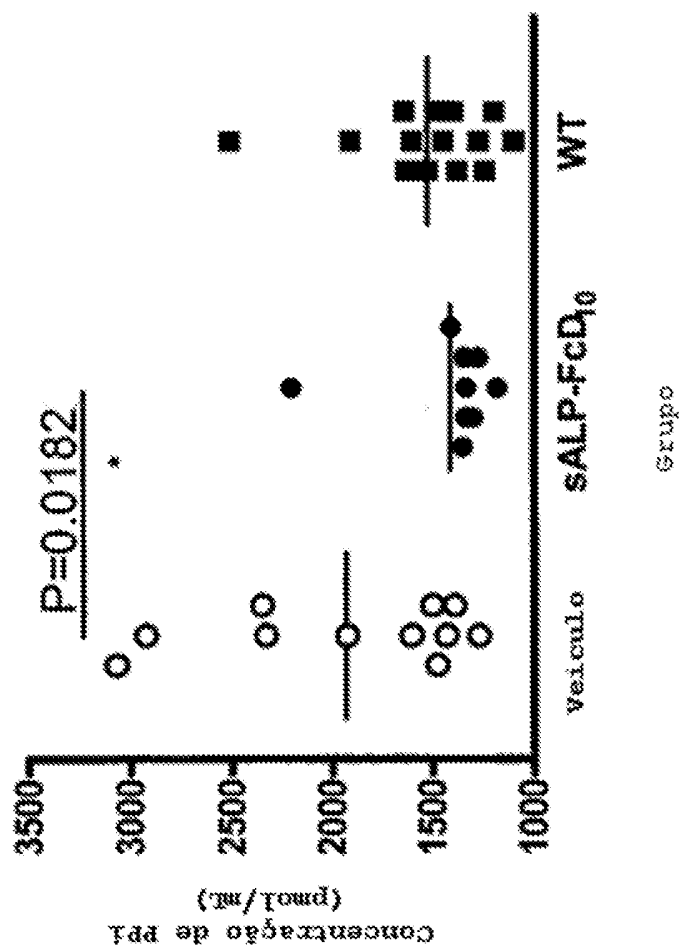


Figura 15

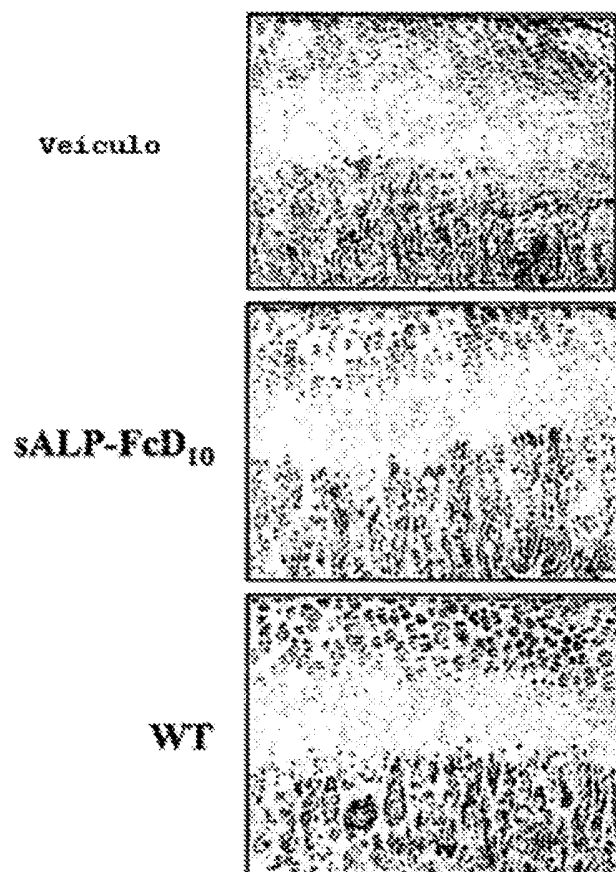


Figura 16

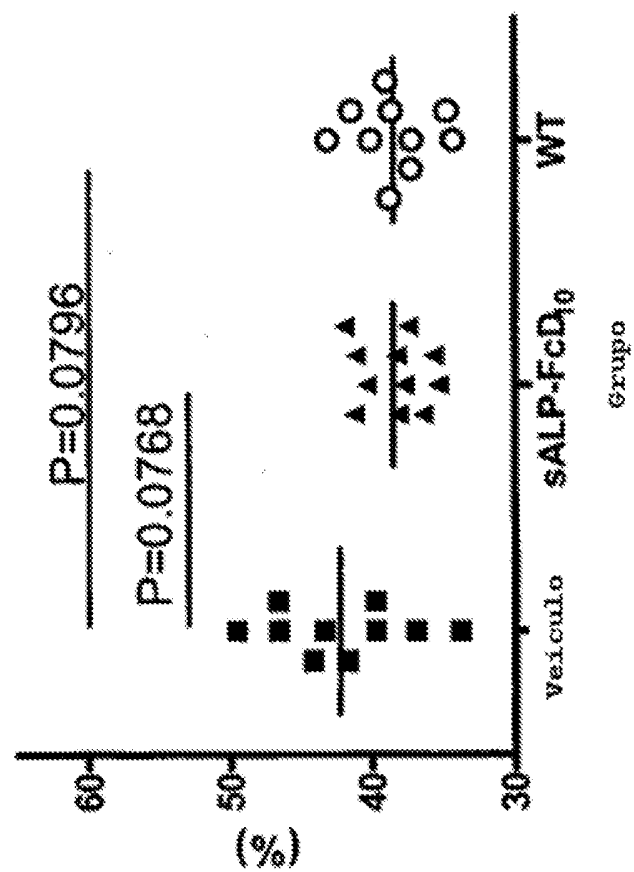


Figura 17

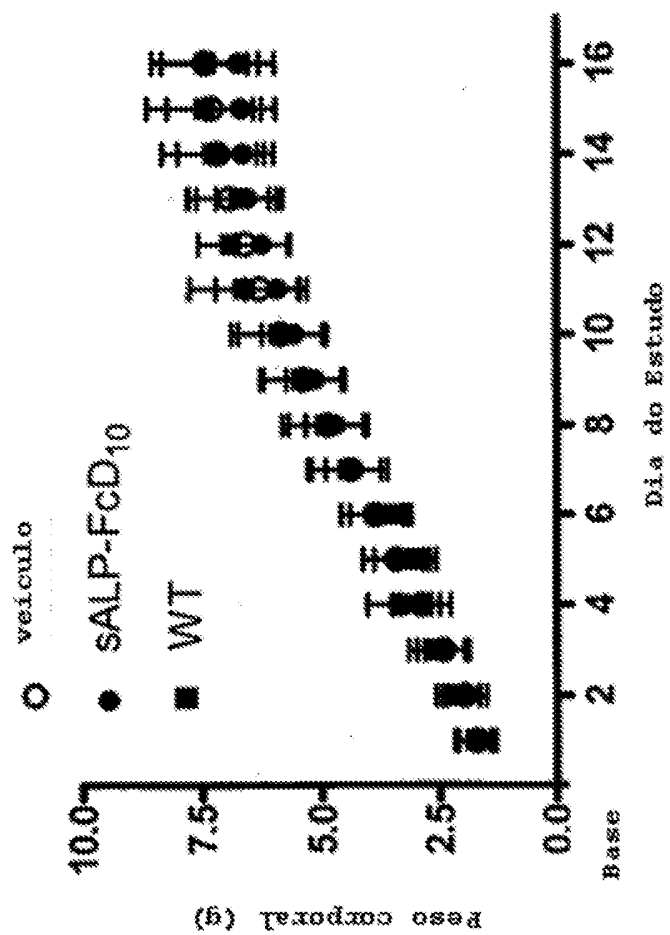


Figura 18

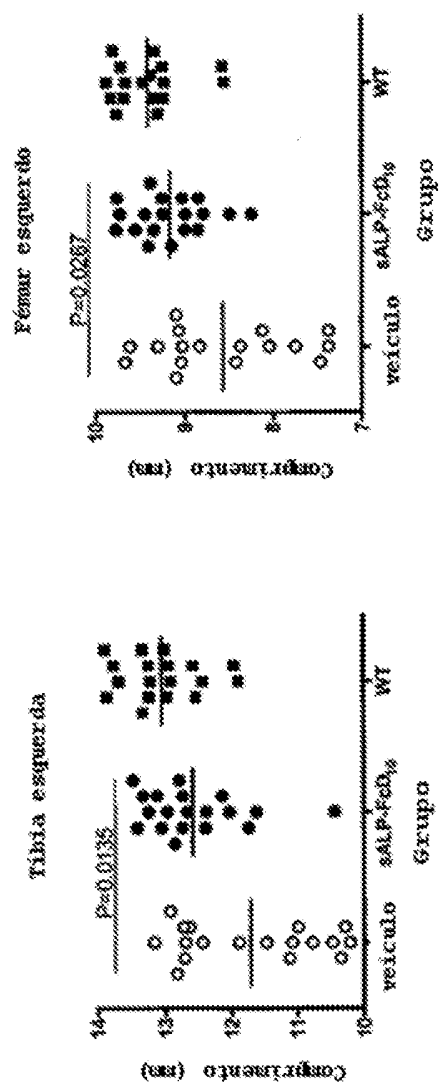
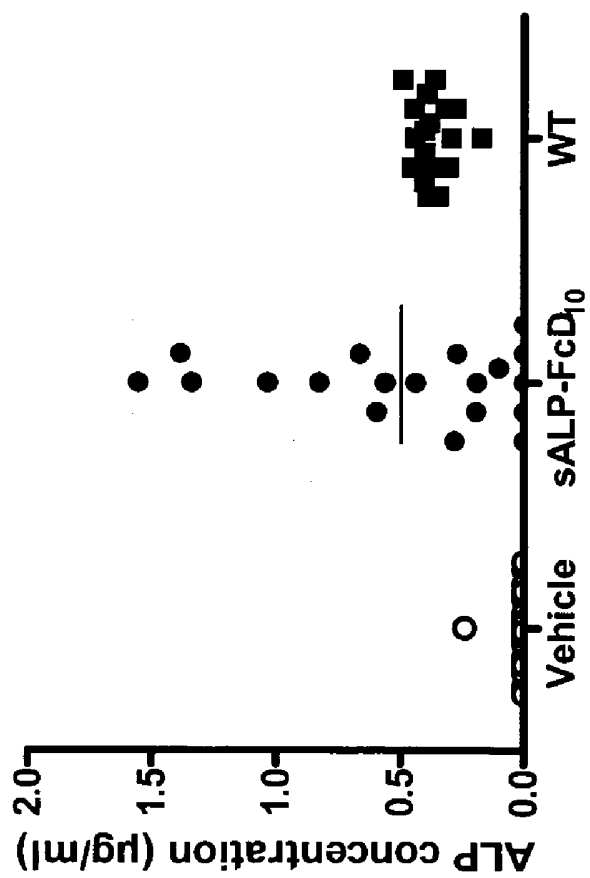


Figura 19



### Figure 20



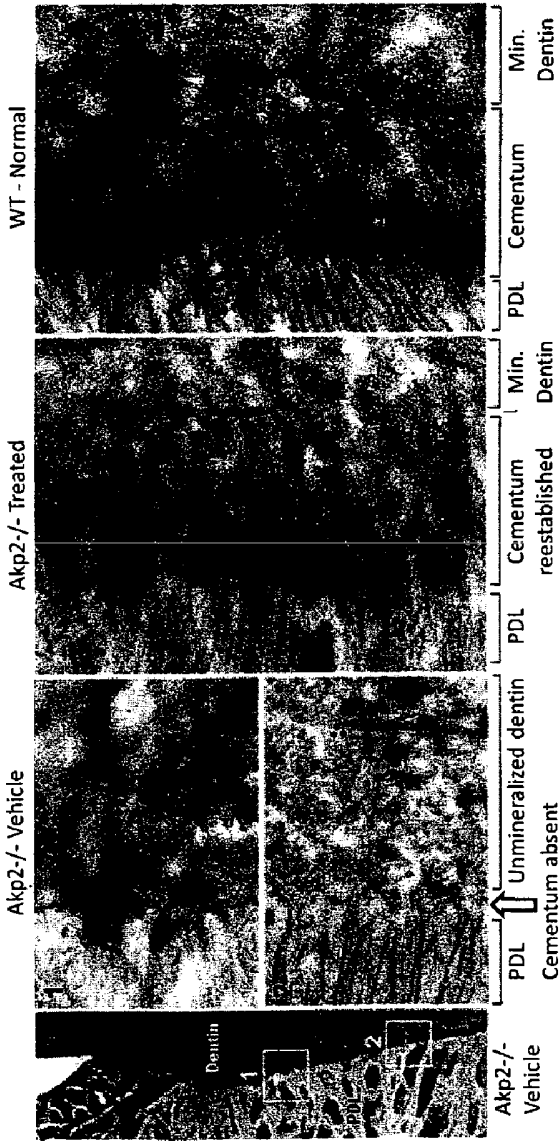


Figure 22

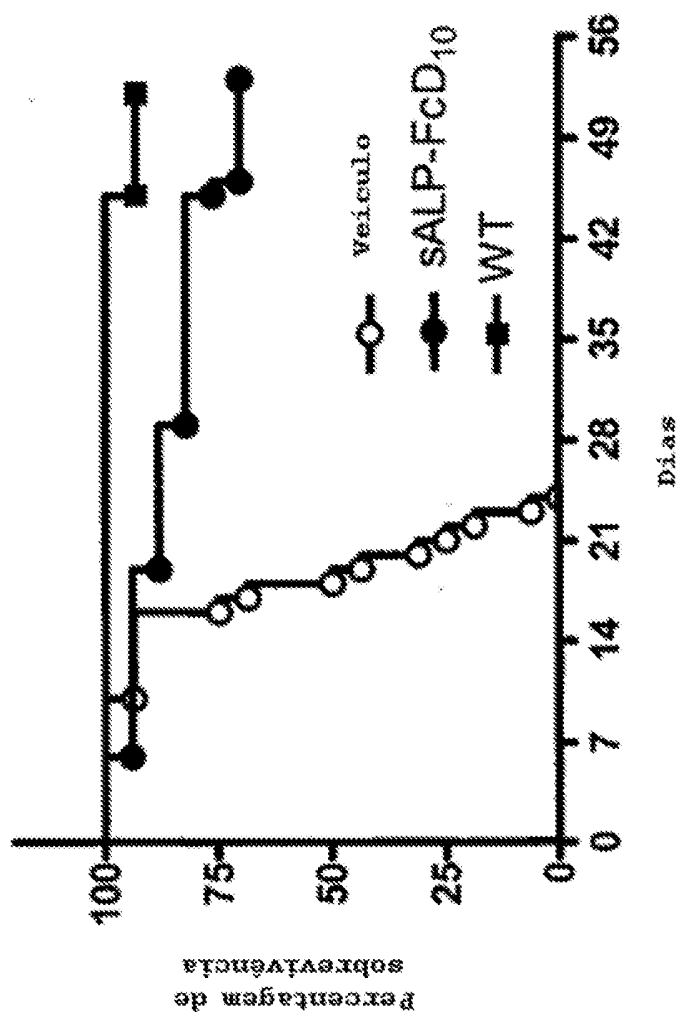


Figura 23



Figura 24

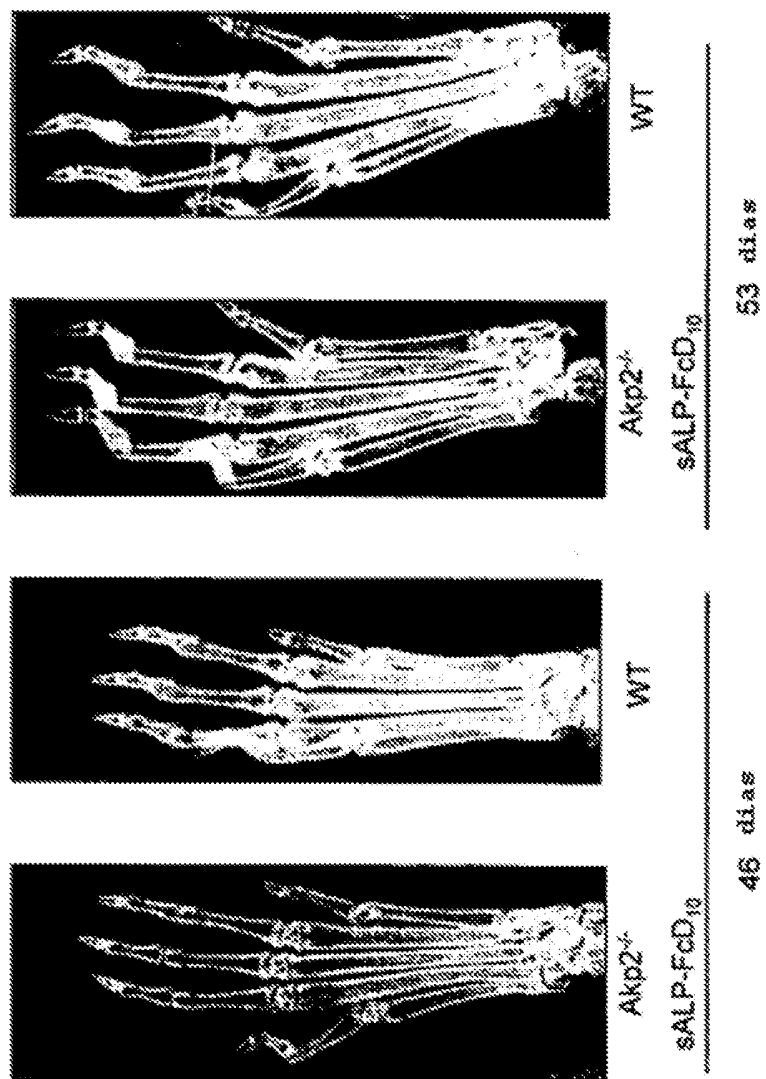


Figura 25

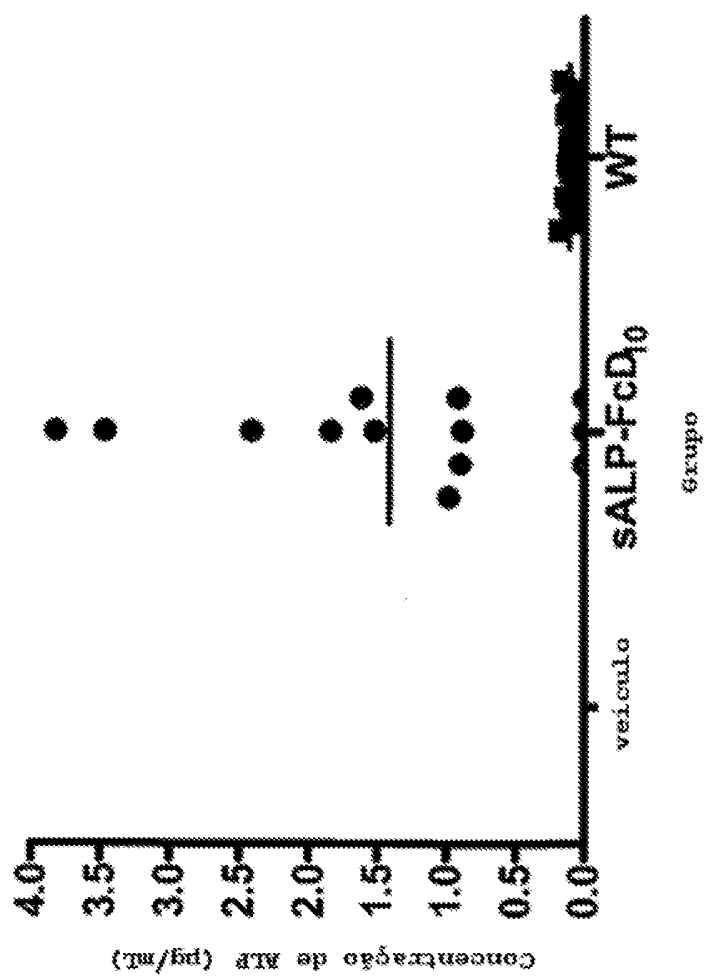
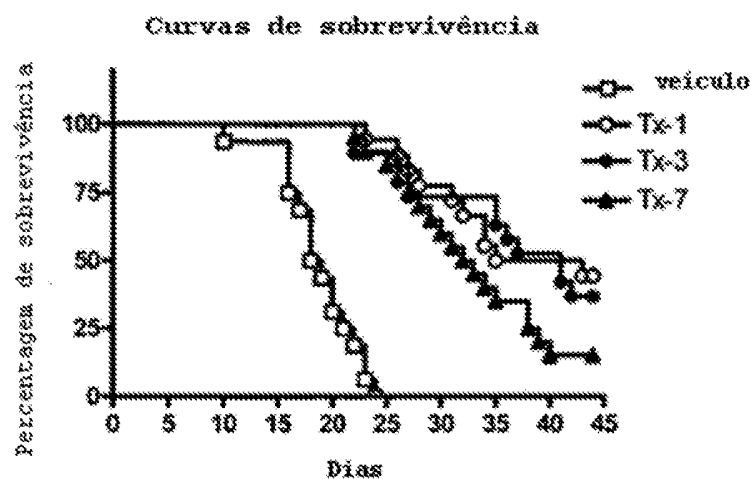


Figura 26

A

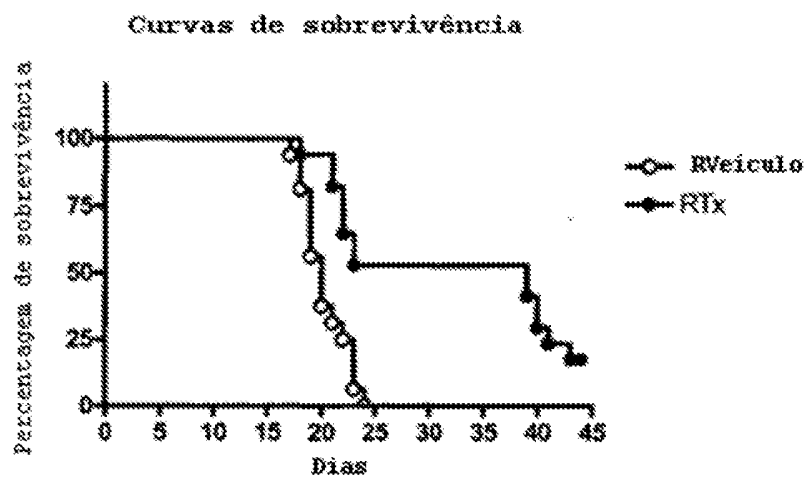


B

| Grupo   | Sobrevivência<br>mediana (dia) |
|---------|--------------------------------|
| veículo | 18.5                           |
| Tx-1    | 39                             |
| Tx-3    | 41                             |
| Tx-7    | 32.5                           |

Figura 27

A



B

| Grupo    | Sobrevivência<br>mediana (dia) |
|----------|--------------------------------|
| RVeiculo | 20                             |
| RTx      | 39                             |

Figura 28

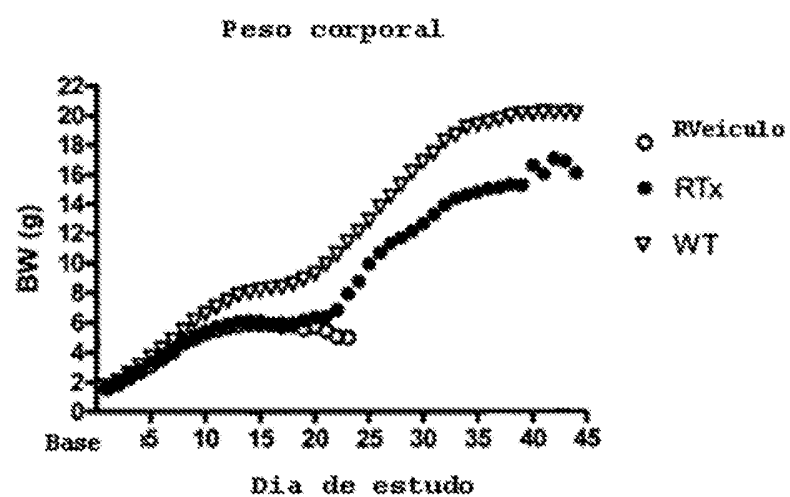


Figura 29

## Alinhamento de sequências múltiplas CLUSTAL 2.0.5

|           |                                                                |     |
|-----------|----------------------------------------------------------------|-----|
| TNALPrr   | NIILP-----FLVLAIGTCLTNISFVPEKERDPSYWRQQAQETLNALRLQKLNTHVAKNII  | 55  |
| TNALPrrm  | NIISF-----FLVLAIGTCLTNISFVPEKERDPSYWRQQAQETLNALRLQKLNTHVAKNII  | 55  |
| TNALPrrh  | NIISF-----FLVLAIGTCLTNISLVPEKERDPSYWRQQAQETLNALRLQKLNTHVAKNII  | 55  |
| TNALPrrf  | -----EKDPKYMRDQAQQTLYVALRLQKLNTHVAKNII                         | 33  |
| TNALPrrc  | NIISF-----FLVLAIGTCLTNISLVPEKERDPSYWRQQAQQTLNALRLQKLNTHVAKNII  | 55  |
| TNALPrrt  | NIISF-----FLVLAIGTCLTNISLVPEKERDPSYWRQQAQQTLYVALRLQKLNTHVAKNII | 55  |
| GALPrrh   | MQSPFWV---LILLAGLRLQLSLGIIIPVEENPDPFMRGAELGAALKQAQTPAQ-AAKNLI  | 56  |
| PLALPrrh  | MLGDCMLLILLAGLRLQLSLGIIIPVEENPDPFMRGAELGAALKQAQTPAQ-AAKNLI     | 59  |
| IALLPrrh  | MQSPFWV---LILLAGLRLQLSLGIIIPAKKNPDPFMRGAELGAALKQAQTPAQ-AAKNLI  | 56  |
| Consensus | XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX   |     |
| TNALPrr   | MFILGDCMGVSTVTAARILKQQLKHNHGTSEETLEMDKFFPVALSCTYNTNAQVFDGAGTAT | 115 |
| TNALPrrm  | MFILGDCMGVSTVTAARILKQQLKHNHGTSEETLEMDKFFPVALSCTYNTNAQVFDGAGTAT | 115 |
| TNALPrrh  | MFILGDCMGVSTVTAARILKQQLKHNHGTSEETLEMDKFFPVALSCTYNTNAQVFDGAGTAT | 115 |
| TNALPrrf  | MFILGDCMGVSTVTAARILKQQLKHNHGTSEETLEMDKFFPVALSCTYNTNAQVFDGAGTAT | 93  |
| TNALPrrc  | MFILGDCMGVSTVTAARILKQQLKHNHGTSEETLEMDKFFPVALSCTYNTNAQVFDGAGTAT | 115 |
| TNALPrrt  | MFILGDCMGVSTVTAARILKQQLKHNHGTSEETLEMDKFFPVALSCTYNTNAQVFDGAGTAT | 115 |
| GALPrrh   | IFILGDCMGVSTVTAARILKQKKKDLGPEITFLMDRFFPVALSCTYNTNAQVFDGAGTAT   | 116 |
| PLALPrrh  | IFILGDCMGVSTVTAARILKQKKKDLGPEITFLMDRFFPVALSCTYNTNAQVFDGAGTAT   | 119 |
| IALLPrrh  | IFILGDCMGVSTVTAARILKQKKKDLGPEITFLMDRFFPVALSCTYNTNAQVFDGAGTAT   | 116 |
| Consensus | KFILGDCMGVSTVTAARILKQKKKDLGPEITFLMDRFFPVALSCTYNTNAQVFDGAGTAT   |     |
| TNALPrr   | AYLCGVKANEETVGVSAATQRTCHNTTQGNHVTSLRWAKDAGEKSVGIVTTTRYGNHATPS  | 175 |
| TNALPrrm  | AYLCGVKANEETVGVSAATQRTCHNTTQGNHVTSLRWAKDAGEKSVGIVTTTRYGNHATPS  | 175 |
| TNALPrrh  | AYLCGVKANEETVGVSAATQRTCHNTTQGNHVTSLRWAKDAGEKSVGIVTTTRYGNHATPS  | 175 |
| TNALPrrf  | AYLCGVKANEETVGVSAATQRTCHNTTQGNHVTSLRWAKDAGEKSVGIVTTTRYGNHATPS  | 163 |
| TNALPrrc  | AYLCGVKANEETVGVSAATQRTCHNTTQGNHVTSLRWAKDAGEKSVGIVTTTRYGNHATPS  | 175 |
| TNALPrrt  | AYLCGVKANEETVGVSAATQRTCHNTTQGNHVTSLRWAKDAGEKSVGIVTTTRYGNHATPS  | 175 |
| GALPrrh   | AYLCGVKANEETVGVSAATQRTCHNTTQGNHVTSLRWAKDAGEKSVGIVTTTRYGNHATPS  | 176 |
| PLALPrrh  | AYLCGVKANEETVGVSAATQRTCHNTTQGNHVTSLRWAKDAGEKSVGIVTTTRYGNHATPS  | 179 |
| IALLPrrh  | AYLCGVKANEETVGVSAATQRTCHNTTQGNHVTSLRWAKDAGEKSVGIVTTTRYGNHATPS  | 176 |
| Consensus | AYLCGVKANEETVGVSAATQRTCHNTTQGNHVTSLRWAKDAGEKSVGIVTTTRYGNHATPS  |     |
| TNALPrr   | AAAYASADRWYSNENHMPFALSQCKCDIAYQLMGNVXDIIVIMGGGRKYMFPKMTDVE     | 235 |
| TNALPrrm  | AAAYASADRWYSNENHMPFALSQCKCDIAYQLMGNVXDIIVIMGGGRKYMFPKMTDVE     | 235 |
| TNALPrrh  | AAAYASADRWYSNENHMPFALSQCKCDIAYQLMGNVXDIIVIMGGGRKYMFPKMTDVE     | 235 |
| TNALPrrf  | AAAYASADRWYSNENHMPFALSQCKCDIAYQLMGNVXDIIVIMGGGRKYMFPKMTDVE     | 213 |
| TNALPrrc  | AAAYASADRWYSNENHMPFALSQCKCDIAYQLMGNVXDIIVIMGGGRKYMFPKMTDVE     | 235 |
| TNALPrrt  | AAAYASADRWYSNENHMPFALSQCKCDIAYQLMGNVXDIIVIMGGGRKYMFPKMTDVE     | 235 |
| GALPrrh   | AAAYASADRWYSNENHMPFALSQCKCDIAYQLMGNVXDIIVIMGGGRKYMFPKMTDVE     | 235 |
| PLALPrrh  | AAAYASADRWYSNENHMPFALSQCKCDIAYQLMGNVXDIIVIMGGGRKYMFPKMTDVE     | 235 |
| IALLPrrh  | AAAYASADRWYSNENHMPFALSQCKCDIAYQLMGNVXDIIVIMGGGRKYMFPKMTDVE     | 235 |
| Consensus | AAAYASADRWYSNENHMPFALSQCKCDIAYQLMGNVXDIIVIMGGGRKYMFPKMTDVE     |     |
| TNALPrr   | YELDEKARGTSLDGLDLISIWKSFKPRKHSHHYVWNTTELLALDPS-AYDYLGLGFEPGD   | 294 |
| TNALPrrm  | YELDEKARGTSLDGLDLISIWKSFKPRKHSHHYVWNTTELLALDPS-AYDYLGLGFEPGD   | 294 |
| TNALPrrh  | YELDEKARGTSLDGLDLISIWKSFKPRKHSHHYVWNTTELLALDPS-AYDYLGLGFEPGD   | 294 |
| TNALPrrf  | YELDEKARGTSLDGLDLISIWKSFKPRKHSHHYVWNTTELLALDPS-AYDYLGLGFEPGD   | 272 |
| TNALPrrc  | YELDEKARGTSLDGLDLISIWKSFKPRKHSHHYVWNTTELLALDPS-AYDYLGLGFEPGD   | 294 |
| TNALPrrt  | YELDEKARGTSLDGLDLISIWKSFKPRKHSHHYVWNTTELLALDPS-AYDYLGLGFEPGD   | 294 |
| GALPrrh   | YELDEKARGTSLDGLDLISIWKSFKPRKHSHHYVWNTTELLALDPS-AYDYLGLGFEPGD   | 293 |
| PLALPrrh  | YELDEKARGTSLDGLDLISIWKSFKPRKHSHHYVWNTTELLALDPS-AYDYLGLGFEPGD   | 295 |
| IALLPrrh  | YELDEKARGTSLDGLDLISIWKSFKPRKHSHHYVWNTTELLALDPS-AYDYLGLGFEPGD   | 292 |
| Consensus | YELDEKARGTSLDGLDLISIWKSFKPRKHSHHYVWNTTELLALDPS-AYDYLGLGFEPGD   |     |

Figure 30

[illegible]

Figura 38 (Cont.)

**Alinhamento de sequências múltiplas CLUSTAL W (1.82):** foi usado algoritmo de alinhamento específico

|     |                     |           |           |            |            |            |            |
|-----|---------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| 1   | P09487 PF8T_BOVIN   | MISFELLAI | GTCTFSSLP | EKEKDPKMR  | EQAQQTAKA  | LKLOTLATNV | AKNVIMFLD  |
|     | Q29486 PF8T_FELCA   | MISFELVLA | GTCLTNSLP | EKEKDPKMR  | EQAQQTAKA  | LKLOKLATNV | VRNVIMFLD  |
|     | P05186 PF8T_HUMAN   | MISFELVLA | GTCLTNSLP | EKEKDPKMR  | EQAQQTAKA  | LKLOKLATNV | AKNVIMFLD  |
|     | P09242 PF8T_MOUSE   | MISFELVLA | GTCLTNSFP | EKEKDPKMR  | EQAQQTAKA  | LKLOKLATNV | AKNVIMFLD  |
|     | P08289 PF8T_RAT     | MISFELVLA | GTCLTNSFP | EKEKDPKMR  | EQAQQTAKA  | LKLOKLATNV | AKNVIMFLD  |
|     | Q9N0V0 Q9N0V0_CAMPA | *****     | *****     | ---EKDPKMR | EQAQQTAKA  | LKLOKLATNV | AKNVIMFLD  |
|     | Consensus           | XXXXXXXXX | XXXXXXXXX | *:*:*:*    | :*:*:*:*   | *:*:*:*    | :*:*:*:*   |
| 61  | P09487 PF8T_BOVIN   | QMGSTVTAA | RIILKQLHN | PGEETRLMD  | KFFVVALSKT | YTNNAQVDS  | AGTATAYLC  |
|     | Q29486 PF8T_FELCA   | QMGSTVTAA | RIILKQLHN | PGEETRLMD  | KFFVVALSKT | YTNNAQVDS  | AGTATAYLC  |
|     | P05186 PF8T_HUMAN   | QMGSTVTAA | RIILKQLHN | PGEETRLMD  | KFFVVALSKT | YTNNAQVDS  | AGTATAYLC  |
|     | P09242 PF8T_MOUSE   | QMGSTVTAA | RIILKQLHN | TGEETRLMD  | KFFVVALSKT | YTNNAQVDS  | AGTATAYLC  |
|     | P08289 PF8T_RAT     | QMGSTVTAA | RIILKQLHN | TGEETRLMD  | KFFVVALSKT | YTNNAQVDS  | AGTATAYLC  |
|     | Q9N0V0 Q9N0V0_CAMPA | QMGSTVTAT | RIILKQLHN | PGEETRLMD  | KFFVVALSKT | YTNNAQVDS  | AGTATAYLC  |
|     | Consensus           | QMGSTVTAX | RIILKQLHN | XGEETRLMD  | KFFVVALSKT | YTNNAQVDS  | AGTATAYLC  |
| 121 | P09487 PF8T_BOVIN   | VRANECTGV | SAATQSQCH | TTCQNEVTSI | LMAWKDCKS  | VGIVTTTAVN | HATPSAAYAN |
|     | Q29486 PF8T_FELCA   | VRANECTGV | SAATQSQCH | TTCQNEVTSI | LMAWKDCKS  | VGIVTTTAVN | HATPSAAYAN |
|     | P05186 PF8T_HUMAN   | VRANECTGV | SAATERSCH | TTCQNEVTSI | LMAWKDCKS  | VGIVTTTAVN | HATPSAAYAN |
|     | P09242 PF8T_MOUSE   | VRANECTGV | SAATEIRCH | TTCQNEVTSI | LMAWKDCKS  | VGIVTTTAVN | HATPSAAYAN |
|     | P08289 PF8T_RAT     | VRANECTGV | SAATEIRCH | TTCQNEVTSI | LMAWKDCKS  | VGIVTTTAVN | HATPSAAYAN |
|     | Q9N0V0 Q9N0V0_CAMPA | VRANECTGV | SAATQTHCH | TTCQNEVTSI | LMAWKDCKS  | VGIVTTTAVN | HATPSAAYAN |
|     | Consensus           | VRANECTGV | SAATEIRCH | TTCQNEVTSI | LMAWKDCKS  | VGIVTTTAVN | HATPSAAYAN |

Figura 31

```

181
P09487|PPRT_BOVIN      SACRDWYSON  EMPPEALSQG  CKDIAYQLMK  NRDIDYVING  GCKRYHFFPN  RTDVEYELDE
Q29486|PPRT_FELCA      SACRDWYSON  EMPPEALSQG  CKDIAYQLMK  NRDIDYVING  GCKRYHFFPN  RTDVEYENDE
P05186|PPRT_HUMAN      SACRDWYSON  EMPPEALSQG  CKDIAYQLMK  NRDIDYVING  GCKRYHFFPN  RTDVEYEDS
P09442|PPRT_MOUSE      SACRDWYSON  EMPPEALSQG  CKDIAYQLMK  NRDIDYVING  GCKRYHFFPN  RTDVEYELDE
P08289|PPRT_RAT        SACRDWYSON  EMPPEALSQG  CKDIAYQLMK  NRDIDYVING  GCKRYHFFPN  RTDVEYELDE
Q98090|Q98090_CANFA    *****
Consensus              *****
SACRDWYSON  EMPPEALSQG  CKDIAYQLMK  NRDIDYVING  GCKRYHFFPN  RTDVEYENDE

241
P09487|PPRT_BOVIN      KANGTRLSGL  KSLDINKSEK  PPKHSHYVM  NRTLLALOP  NVDYLLGLF  EPDMQYELN
Q29486|PPRT_FELCA      KANGTRLSGL  KSLDINKSEK  PPKHSHYVM  NRTLLALOP  NVDYLLGLF  EPDMQYELN
P05186|PPRT_HUMAN      KANGTRLSGL  KSLDINKSEK  PPKHSHYVM  NRTLLALOP  NVDYLLGLF  EPDMQYELN
P09442|PPRT_MOUSE      KANGTRLSGL  KSLDINKSEK  PPKHSHYVM  NRTLLALOP  NVDYLLGLF  EPDMQYELN
P08289|PPRT_RAT        KANGTRLSGL  KSLDINKSEK  PPKHSHYVM  NRTLLALOP  NVDYLLGLF  EPDMQYELN
Q98090|Q98090_CANFA    KSTCARLSGL  KSLDINKSEK  PPKHSHYVM  NRTLLALOP  NVDYLLGLF  EPDMQYELN
*****
Consensus              *****
KANGTRLSGL  KSLDINKSEK  PPKHSHYVM  NRTLLALOP  NVDYLLGLF  EPDMQYELN

301
P09487|PPRT_BOVIN      RNNATOPSL  ENWEIAXIL  RNNPFGFTL  VEGGRIDGN  HEGKAKQALH  EAVEMQAIG
Q29486|PPRT_FELCA      RNNATOPSL  ENWEIAXIL  RNNPFGFTL  VEGGRIDGN  HEGKAKQALH  EAVEMQAIG
P05186|PPRT_HUMAN      RNNATOPSL  ENWEIAXIL  RNNPFGFTL  VEGGRIDGN  HEGKAKQALH  EAVEMQAIG
P09442|PPRT_MOUSE      RNNATOPSL  ENWEIAXIL  RNNPFGFTL  VEGGRIDGN  HEGKAKQALH  EAVEMQAIG
P08289|PPRT_RAT        RNNATOPSL  ENWEIAXIL  RNNPFGFTL  VEGGRIDGN  HEGKAKQALH  EAVEMQAIG
Q98090|Q98090_CANFA    RNNATOPSL  ENWEIAXIL  RNNPFGFTL  VEGGRIDGN  HEGKAKQALH  EAVEMQAIG
*****
Consensus              *****
RNNATOPSL  ENWEIAXIL  RNNPFGFTL  VEGGRIDGN  HEGKAKQALH  EAVEMQAIG

```

Figure 31 (Cont.)

|                     |              |             |             |            |           |            |
|---------------------|--------------|-------------|-------------|------------|-----------|------------|
| P09487:FPBT_BOVIN   | QAGMTSVED    | TLTVVADHS   | AVFTFGGTP   | KNSIFGLAP  | MVSDTKKPF | TALLVGNQPG |
| Q29486:FPBT_FELCA   | KAGMTSVED    | TLTVVADHS   | AVFTFGGTP   | KNSIFGLAP  | MVSDTKKPF | TSILVGNQPG |
| P05186:FPBT_HUMAN   | QAGMTSSED    | TLTVVADHS   | AVFTFGGTP   | KNSIFGLAP  | NLSDTKKPF | TALLVGNQPG |
| P09242:FPBT_MOUSE   | KAGMTSQKD    | TLTVVADHS   | AVFTFGGTP   | KNSIFGLAP  | MVSDTKKPF | TALLVGNQPG |
| P08289:FPBT_RAT     | KAGMTSQKD    | TLTVVADHS   | AVFTFGGTP   | KNSIFGLAP  | MVSDTKKPF | TALLVGNQPG |
| Q9NOV0:Q9NOV0_CANFA | KAGMTSLED    | TLTVVADHS   | AVFTFGGTP   | KNSIFGLAP  | MVSDTKKPF | TALLVGNQPG |
| Consensus           | :** : ** : * | ***:*****   | *****       | *****      | *,*****   | *,*****    |
|                     | KAGATSEKXK   | TLTKVADHS   | AVFTFGGTP   | KNSIFGLAP  | MVSDTKKPF | TXLLVGNQPG |
| 421                 |              |             |             |            |           |            |
| P09487:FPBT_BOVIN   | YKVVGEREN    | VSMVDYAHNN  | YQQSAPVLR   | HETGGEQVA  | VFAGKPMHL | LGVVFQNYI  |
| Q29486:FPBT_FELCA   | YKVVGEREN    | VSMVDYAHNN  | YQQSAPVLR   | HETGGEQVA  | VFAGKPMHL | LGVVFQNYI  |
| P05186:FPBT_HUMAN   | YKVVGEREN    | VSMVDYAHNN  | YQQSAPVLR   | HETGGEQVA  | VFAGKPMHL | LGVVFQNYI  |
| P09242:FPBT_MOUSE   | YKVVDEREN    | VSMVDYAHNN  | YQQSAPVLR   | HETGGEQVA  | VFAGKPMHL | LGVVFQNYI  |
| P08289:FPBT_RAT     | YKVVDEREN    | VSMVDYAHNN  | YQQSAPVLR   | HETGGEQVA  | VFAGKPMHL | LGVVFQNYI  |
| Q9NOV0:Q9NOV0_CANFA | YKVVGEREN    | VSMVDYAHNN  | YQQSAPVLR   | HETGGEQVA  | VFAGKPMHL | LGVVFQNYI  |
| Consensus           | **** : ****  | *****       | *****       | *****      | *,*****   | *,*****    |
|                     | YKVVGEREN    | VSMVDYAHNN  | YQQSAPVLR   | HETGGEQVA  | VFAGKPMHL | LGVVFQNYX  |
| 481                 |              |             |             |            |           |            |
| P09487:FPBT_BOVIN   | PRMAYAACI    | GANLDRCASA  | SSGSPSPFG   | LLLLALLPL  | GSFL      |            |
| Q29486:FPBT_FELCA   | PRMAYAACI    | GANLDRCASA  | SSAGSPSPFG  | LLLLALLPL  | GILF      |            |
| P05186:FPBT_HUMAN   | PRMAYAACI    | GANLHCAPA   | SSAGSLASP   | LLLLALLPL  | SVLF      |            |
| P09242:FPBT_MOUSE   | PRMAYAACI    | GANLDRCANA  | SSGASPSFGA  | LLLPVAVLSI | PTLF      |            |
| P08289:FPBT_RAT     | PRMAYAACI    | GANLDRCANA  | SSAGSPSPCA  | LLLPVAVLSI | RTLF      |            |
| Q9NOV0:Q9NOV0_CANFA | PRMAYAACI    | GANLDRCASA  | SSGSPSPFG   | LLLLALLPV  | GILF      |            |
| Consensus           | *****:***    | *** : *** * | ..... : . * | * : * *    | *, *      | *, *       |
|                     | PRMAYAACI    | GANLHCANA   | XSINXXXXX   | LALXAXXX   | XXLF      |            |

Figura 31 (Cont.)

```

1 atggtttcac cattcttagt actggccatt ggcacctgcc ttactaaetc cttagtgcca
61 gagaaagaga aagaccccaa gtactggcga gaccaagcgc aagagacact gaalatatgcc
121 ctggagcttc agaagctcaa caaccaacgtg gctaagaatg tcatcatgtt cctgggagat
181 gggatgggtg tctccacagt gacggctgcc cgcctctcca agggtcagct ccaccacaac
241 cctggggagg agaccaggct ggagatggac aagttccctt tctgtggcct ctccaagacg
301 tacaacacca atgcccaggc cctgacagc gccggcaccc ccaccgccta cctgtgtggg
361 gtgaaggcca atgagggcac cgtgggggta agcgcagcca ctgagcgttc ccggtgcaac
421 accacccagg ggaacgaggc caectccatc ctgocctggg ccaaggagcg tgggaaatct
481 gtgggcatig tgaccaccac gagagtgaac catgccaccc ccagcgcctc ctacgcccac
541 tgggctgacc gggactggta ctacagcaac gagatgcccc ctgaggcctt gagccagggc
601 tgaaggaca tgcctacca gctcatgat aacatcaggg acattgacgt gatcatgggg
661 ggtggccgga aatacatgta ccccaagaat aaaactgatg tggagtatga gagtgcagag
721 aaagccaggg gcacgaggtt ggaaggcctg gacctcgttg aacccctggg gagtttcaa
781 ccgagatata agcactccca ctctctctgg aaccgcacgg aactcctgac ccttgacccc
841 caaatgttg actaactatt gggctctctt gagccagggg acatgcagta ctagctgaac
901 aggaacaaag tgacggaccc gtccctctcc gagatgggtg tgggtggcat ccagatcctg
961 cgggaagaac ccaaaggctt cttcttctg gtggaggag gcagaattga ccacgggac
1021 catgaaggaa aagccaaagc ggcctctgat gagggcggtg agatggaccg ggccatcggg
1081 caggcaggca gcttgacctc ctgggaagac actctgaccg tggctcactg ggaccattcc
1141 cagctcttca catttgggtg atacaacccc cgtggcaact ctatcttgg tctggcccc
1201 atgctgagtg acacagacaa gaagcccttc actgacatcc tgtatggcaa tgggctggg
1261 tacaagggtg tgggcggtga acgagagaat gtctccatgg tggactatgc tcacaacaac
1321 taccaggcgc agtctgctgt gcccttgccc caagagaccc aaggcgggga ggaagtggcc
1381 gtctctctca agggcccatc ggcgcacctg ctgcacggcg tcacagagca gaactacgtc
1441 cccacagtga tggcgatgac agcctgcate ggggccaacc tgggccactg tgcctctgcc
1501 agctcgCTTA AGgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg
1561 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaaa ccaaggaca cctcatgat ctcccgacc
1621 cctgaggtca catgctggtt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac
1681 tggtagctgg aaggcggtga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac
1741 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc
1801 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatctga gaaaaccatc
1861 tccaagcca aagggcagcc ccagagaacca caggtgtaca cctgcccc atccggggg
1921 gagatgacca agaaccaggc cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagggc
1981 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc
2041 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcacgtgga caagagcagg
2101 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcag aggtctctga caaacactac
2161 acgcagaaga gacctcctt gtctcgggtt aaacATATCG ATGACGATGA CGATGACGAT
2221 GACGATGACT AG

```

Figura 32