



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 023**

51 Int. Cl.:
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05739065 .0**
96 Fecha de presentación : **21.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1759001**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2007**

54 Título: **Conjugados de administración ósea y método de uso de los mismos para dirigir proteínas a hueso.**

30 Prioridad: **21.04.2004 US 563828 P**
23.07.2004 US 590347 P
04.10.2004 US 614984 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.09.2011

73 Titular/es: **ENOBIA PHARMA Inc.**
2901, Rue Rachel Est Suite 23
Montreal, Quebec H1W 4A4, CA

72 Inventor/es: **Crine, Philippe;**
Boileau, Guy;
Lemire, Isabelle y
Loisel, Thomas, P.

74 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

ES 2 365 023 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de administración ósea y método de uso de los mismos para dirigir proteínas a hueso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a conjugados de administración ósea y a un método de uso de los mismos para dirigir proteínas a hueso. Más específicamente, la presente invención se refiere a composiciones de administración ósea que comprenden motivos peptídicos, diseñados por ingeniería genética dentro de la estructura de una proteína mediante tecnología de ADN recombinante para promover la unión a la matriz ósea.

Antecedentes de la invención

Los avances tecnológicos en biología molecular, producción de proteínas recombinantes y purificación de proteínas a gran escala han permitido la producción de grandes cantidades de proteínas usadas ahora como productos biofarmacéuticos. Por ejemplo, se han usado anticuerpos monoclonales y formas solubles del receptor de TNF- α en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como enfermedad de Crohn o formas graves de psoriasis (1). Otro ejemplo de uso de una proteína recombinante es la terapia de sustitución enzimática (TSE). La TSE se ha usado para tratar enfermedades de almacenamiento lisosomal. Este grupo de trastornos genéticos se caracteriza por la pérdida de la función de enzimas de lisosomas dando como resultado patologías somáticas, y algunas veces neuronales, graves. En la TSE para estas enfermedades, se infunden a los pacientes grandes dosis de enzimas normales. Estas enzimas infundidas se internalizan entonces a partir de la circulación por medio de receptores de superficie celular (receptor de manosa-6-fosfato) y entran en la ruta endocítica o siguen su camino hasta su sitio de acción, el lisosoma. No todos los intentos de tratar trastornos genéticos mediante TSE han sido satisfactorios.

La hipofosfatasa es un tipo de raquitismo u osteomalacia hereditario, poco común que se produce con una incidencia de 1 por 100.000 nacimientos para la forma más grave de la enfermedad. Formas más leves son más prevalentes. En este defecto metabólico congénito, mutaciones inactivan el gen que codifica para la isoenzima no específica de tejido de la fosfatasa alcalina. Se caracteriza bioquímicamente por actividad fosfatasa alcalina en suero inferior a la normal. La deficiencia en fosfatasa alcalina en osteoblastos y condrocitos altera la mineralización esquelética, conduciendo a raquitismo u osteomalacia.

Existe una gama muy amplia de expresividad de la hipofosfatasa, que abarca desde una forma perinatal que provoca a menudo muerte fetal debido a un esqueleto no mineralizado, hasta una forma más leve que se caracteriza sólo por pérdida prematura de los dientes. Los niños y lactantes afectados de manera grave heredan la hipofosfatasa como un rasgo recesivo autosómico. Existen cuatro formas principales de la enfermedad: perinatal, del lactante, infantil y adulta. La hipofosfatasa perinatal se manifiesta durante la gestación y la mayoría de los recién nacidos afectados sólo sobreviven brevemente. La hipofosfatasa del lactante se hace clínicamente evidente antes de los 6 meses de edad. Aproximadamente el 50% de los pacientes mueren en el plazo de un año. La gravedad de la hipofosfatasa infantil varía enormemente aunque la mayoría de estos pacientes padecerán síntomas esqueléticos a lo largo de toda su vida. La hipofosfatasa adulta aparece durante la mediana edad, con síntomas tales como fracturas por sobrecarga recurrentes dolorosas que tienen una mala curación.

Los osteoblastos y condrocitos son normalmente ricos en fosfatasa alcalina no específica de tejido, en los que está unida a la superficie celular. En la hipofosfatasa, la falta de actividad fosfatasa alcalina da como resultado la acumulación extracelular de tres compuestos de fósforo que se cree que son sustratos de la enzima: fosfoetanolamina (PEA), pirofosfato inorgánico (PPi) y piridoxal-5'-fosfato (PLP). PPi es un inhibidor del crecimiento de cristales de hidroxapatita, y la acumulación de PPi en la enfermedad explica la mineralización esquelética alterada. En consecuencia, proporcionar una enzima activa a pacientes que padecen hipofosfatasa disminuirá los niveles de PPi extracelulares y mejorará la mineralización esquelética.

Actualmente, no existe ninguna terapia médica establecida para la hipofosfatasa. Los ensayos de sustitución enzimática usando infusiones intravenosas de fosfatasa alcalina no han tenido éxito. Parece que la actividad fosfatasa alcalina debe aumentarse no en la circulación sino en el propio esqueleto. Esta hipótesis se confirmó recientemente mediante trasplante de médula ósea. Desafortunadamente, los beneficios del trasplante duraron sólo un corto periodo de tiempo debido a un mal injerto.

Existe por tanto una necesidad de proporcionar un enfoque de terapia de sustitución enzimática para proporcionar enzima activa al esqueleto de pacientes que padecen hipofosfatasa.

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

XLH es la más prevalente de las hipofosfatemias familiares (OMIM 307800, 307810). Se caracteriza por reducción de la recaptación de fosfato en el riñón, hipofosfemia, normocalcemia, niveles de 1,25-dihidroxi-vitamina D3 (1,25(OH)2D, calcitriol) de normales a bajos, función normal de la glándula paratiroidea y actividad fosfatasa alcalina plasmática elevada. Estos cambios están asociados con retraso del crecimiento, deformidad de las extremidades inferiores, pruebas radiológicas e histomorfológicas de raquitismo y osteomalacia. Esta enfermedad parece resultar de defectos renales combinados en la reabsorción de fosfato tubular y el metabolismo de la vitamina D, así como un trastorno funcional en los huesos y los dientes. XLH resulta de mutaciones inactivantes en el gen PHEX, un miembro de la familia de metalopeptidasas de zinc de glicoproteínas de membrana integrales de tipo II. Estas mutaciones impiden la expresión de una enzima PHEX funcional en la superficie celular de osteoblastos. Por ahora, el tratamiento de pacientes con XLH se restringe a complementación con complementos de fosfato inorgánico oral (Pi) en cuatro o cinco dosis divididas al día, y coadministración de 1,25(OH)2D para compensar la síntesis inapropiada de 1,25(OH)2D. Tales altas dosis de fosfato provocan frecuentemente intolerancias gastrointestinales, particularmente diarrea, que conducen a incumplimiento por parte del paciente. Por un lado, la carga de fosfato conlleva el riesgo de provocar hiperparatiroidismo secundario (que puede ser lo suficientemente grave como para necesitar paratiroidectomía) mientras que por otro lado, la administración de 1,25(OH)2D en exceso puede conducir a hipercalcemia, hipercalcemia y nefrocalcinosis.

Por tanto, una TSE útil para XLH buscará sustituir la enzima PHEX defectuosa en pacientes con XLH por una enzima funcional obtenida a través de tecnología de ADN recombinante. Puesto que la enzima PHEX normal está anclada en la membrana plasmática de osteoblastos mediante un péptido hidrófobo, la forma natural de PHEX no puede producirse y purificarse en cantidades suficientes para usarse en una preparación farmacéutica. Para sortear el problema, se diseñó por ingeniería genética una forma soluble de PHEX recombinante (o sPHEX) y se produjo en cultivos celulares, se purificó y se formuló para su administración intravenosa (i.v.) (documento WO00/50580). Entonces se inyectó sPHEX en ratones *Hyp*, un modelo de ratón para XLH, tal como se describe en la solicitud estadounidense en tramitación junto con la presente n.º 10/362.259. Se observó una mejora de varios parámetros séricos relacionados con el hueso incluyendo una reducción de los niveles anómalamente altos de fosfatasa alcalina sérica. Aunque estos experimentos fueron satisfactorios, se creía que la eficacia de sPHEX terapéutica podía potenciarse si se modificase la proteína recombinante de modo que se estimulase su unión a minerales del hueso.

Existe por tanto una necesidad de medios para dirigir de manera satisfactoria proteínas a la matriz ósea.

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

Otra estrategia para dirigir moléculas pequeñas al hueso ha sido conjugar estas entidades con péptidos ácidos tales como poli-Asp (6). Esta estrategia se desarrolló tras la observación de que varias proteínas sintetizadas por osteoblastos, las células que forman el hueso, se unen a la matriz ósea a través de secuencias particularmente ricas en residuos de aminoácido ácidos (Asp y Glu). Este es el caso de la osteopontina (7) y la sialoproteína ósea, dos proteínas no colagenosas. Por tanto, se usaron péptidos ácidos (E₂₋₁₀ y D₂₋₁₀) para dirigir moléculas pequeñas (es decir, metotrexato, FITC; Fmoc, biotina, estradiol) a hidroxiapatita *in vitro*. Se usaron péptidos ácidos (E₆ y D₆₋₁₀) para dirigir moléculas pequeñas (es decir, FITC, Fmoc, estradiol) a hidroxiapatita *in vivo*. Finalmente, se mostró que E₆ confería a BSA, hemoglobina e IgG la capacidad de unirse a hidroxiapatita *in vitro*. En todos los casos anteriores, la unión de la secuencia ácida se realizó químicamente.

La presente invención busca satisfacer estas necesidades y otras necesidades.

Sumario de la invención

La presente invención muestra que pueden fusionarse moléculas grandes y complejas, tales como proteínas, con péptidos ácidos para dirigirlas de manera satisfactoria al hueso *in vivo*.

Según una realización específica de la presente invención, se proporciona un conjugado de administración ósea que tiene la estructura Z-sALP-Y-D_n-X, en la que X está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido; Y está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido; Z está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido; y D_n es un poliaspartato en el que n = 10 a 16 y sALP es una fosfatasa alcalina soluble, se da a conocer además una proteína en el conjugado de administración ósea que es un gen que regula el fosfato soluble con homología con endopeptidasas en el cromosoma X (sPHEX). Además, también se da a conocer un conjugado con la estructura X-D_n-Y-sPHEX-Z. sPHEX puede tener una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 46 a 749 de la figura 10; 47 a 749 de la figura 10; 48 a 749 de la figura 10; 49 a 749 de la figura 10; 50 a 749 de la figura 10; 51 a 749 de la figura 10; 52 a 749 de la figura 10; 53 a 749 de la figura 10; y 54 a 749 de la figura 10. En el contexto de estos conjugados de administración ósea, n es 10, n es 11, n es 12, n es 13, n es 14, n es 15, o n es 16. Se describe además que sPHEX consiste en la secuencia de aminoácidos 46 a 749 de la figura 10 y n=10.

La proteína en el conjugado es una fosfatasa alcalina soluble (sALP). En otra realización específica, sALP está codificada por la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 5. En otra realización específica, sALP tiene la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 6. En una realización específica de estos conjugados de administración ósea, n es 10. En otra realización específica de este conjugado de administración ósea, n es 11. En otra realización específica de este conjugado de administración ósea, n es 12. En otra realización específica de este conjugado de administración ósea, n es 13. En otra realización específica de este conjugado de administración ósea, n es 14. En otra realización específica de este conjugado de administración ósea, n es 15. En otra realización específica de este conjugado de administración ósea, n es 16. En una realización más específica, n=10.

10 También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste en: un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la figura 8; un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la figura 11; un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos tal como se expone en la figura 7; una secuencia de nucleótidos completamente complementaria a cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a), (b) o (c); y una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse en condiciones de alta rigurosidad con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a), (b), (c) o (d), comprendiendo las condiciones de alta rigurosidad: pre-hibridación e hibridación en 6X SSC, 5X reactivo de Denhardt, SDS al 0,5% y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 68°C; y lavados en 2X SSC y SDS al 0,5% a temperatura ambiente durante 10 min.; en 2X SSC y SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante 10 min.; y en 0,1X SSC y SDS al 0,5% a 65°C tres veces durante 5 minutos.

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

25 También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste en: un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos tal como se expone en la figura 17A; un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la figura 17B; una secuencia de nucleótidos completamente complementaria a cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a) o (b); y una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse en condiciones de alta rigurosidad con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a), (b) o (c), comprendiendo las condiciones de alta rigurosidad: pre-hibridación e hibridación en 6X SSC, 5X reactivo de Denhardt, SDS al 0,5% y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 68°C; y lavados en 2X SSC y SDS al 0,5% a temperatura ambiente durante 10 min.; en 2X SSC y SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante 10 min.; y en 0,1X SSC y SDS al 0,5% a 65°C tres veces durante 5 minutos.

35 También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para una PHEX soluble funcional que comprende una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste en: un polinucleótido que codifica para una sPHEX que comprende los aminoácidos 54 a 749 tal como se expone en la figura 10; un polinucleótido que codifica para una sPHEX que comprende los aminoácidos 53 a 749 tal como se expone en la figura 10; un polinucleótido que codifica para una sPHEX que comprende los aminoácidos 52 a 749 tal como se expone en la figura 10; un polinucleótido que codifica para una sPHEX que comprende los aminoácidos 51 a 749 tal como se expone en la figura 10; un polinucleótido que codifica para una sPHEX que comprende los aminoácidos 50 a 749 tal como se expone en la figura 10; un polinucleótido que codifica para una sPHEX que comprende los aminoácidos 49 a 749 tal como se expone en la figura 10; un polinucleótido que codifica para una sPHEX que comprende los aminoácidos 48 a 749 tal como se expone en la figura 10; un polinucleótido que codifica para una sPHEX que comprende los aminoácidos 47 a 749 tal como se expone en la figura 10; un polinucleótido que codifica para una sPHEX que comprende los aminoácidos 46 a 749 tal como se expone en la figura 10; una secuencia de nucleótidos completamente complementaria a cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a) a (i); y una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse en condiciones de alta rigurosidad con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a) a (j), comprendiendo las condiciones de alta rigurosidad: pre-hibridación e hibridación en 6X SSC, 5X reactivo de Denhart, SDS al 0,5% y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 68°C; y lavados en 2X SSC y SDS al 0,5% a temperatura ambiente durante 10 min.; en 2X SSC y SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante 10 min.; y en 0,1X SSC y SDS al 0,5% a 65°C tres veces durante 5 minutos. La molécula de ácido nucleico aislada comprende además en su extremo 5' un polinucleótido que codifica para un poliaspartato seleccionado del grupo que consiste en D₁₀ a D₁₆.

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

65 También se proporciona una composición de administración ósea que comprende un conjugado de administración ósea de la presente invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona un método de administración de una proteína a tejido óseo de un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un conjugado de administración ósea tal como se menciona de la presente invención.

- 5 También se proporciona un método de administración de sPHEX a tejido óseo de un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un conjugado de administración ósea.

10 También se proporciona un método de administración de ALP a tejido óseo de un mamífero que lo necesita que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un conjugado de administración ósea de la presente invención.

15 También se proporciona un método de tratamiento de un estado o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de, o una cantidad insuficiente de, gen que regula el fosfato funcional con homología con endopeptidasas en el cromosoma X (PHEX) que comprende administrar a un mamífero que lo necesita un conjugado, estando dicho conjugado en un portador farmacéuticamente aceptable. El estado o enfermedad puede ser raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (XLH).

20 También se proporciona un método de tratamiento de un estado o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de, o una cantidad insuficiente de, fosfatasa alcalina funcional que comprende administrar a un mamífero que lo necesita un conjugado de la presente invención, estando dicho conjugado en un portador farmacéuticamente aceptable. En realizaciones específicas; el estado o enfermedad es hipofosfatasa.

25 También se proporciona un uso de un conjugado de administración ósea de la presente invención para administrar una proteína a tejido óseo de un mamífero.

30 También se proporciona un uso de un conjugado de administración ósea para tratar un estado o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de, o una cantidad insuficiente de, gen que regula el fosfato funcional con homología con endopeptidasas en el cromosoma X (PHEX), estando dicho conjugado en un portador farmacéuticamente aceptable.

35 También se proporciona un uso de un conjugado de administración ósea en la fabricación de un medicamento para tratar un estado o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de, o una cantidad insuficiente de, gen que regula el fosfato funcional con homología con endopeptidasas en el cromosoma X (PHEX). El estado o enfermedad puede ser raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (XLH).

40 También se proporciona un uso de un conjugado de administración ósea de la presente invención para tratar un estado o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de, o una cantidad insuficiente de, fosfatasa alcalina funcional, estando dicho conjugado en un portador farmacéuticamente aceptable.

45 También se proporciona un uso de un conjugado de administración ósea de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar un estado o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de, o una cantidad insuficiente de, fosfatasa alcalina funcional, estando dicho conjugado en un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el estado o enfermedad es hipofosfatasa.

50 También se proporciona un método de selección de péptidos para su uso en un conjugado de proteína-péptido de administración ósea que comprende las etapas de: fusionar un péptido candidato con una proteína indicadora para formar un conjugado de proteína-péptido; poner en contacto el conjugado con el tejido óseo o la fase mineral del hueso; y en el que el péptido candidato se selecciona cuando la presencia de la proteína indicadora en el tejido óseo o la fase mineral del hueso es superior cuando está conjugado con el péptido candidato que cuando no lo está.

55 Según otra realización específica de la presente invención, se proporciona un conjugado de administración ósea de una proteína fusionada con un péptido seleccionado del grupo que consiste en deca-aspartato (D₁₀) a hexadeca-aspartato (D₁₆).

Además, en conjugados, la sPHEX está fusionada en su extremo N-terminal con D₁₀, D₁₁, D₁₂, D₁₃, D₁₄, D₁₅ o D₁₆.

60 Según realizaciones específicas de conjugados de la presente invención, la sALP está fusionada en su extremo C-terminal con DID. En otras realizaciones específicas, la sALP está fusionada en su extremo C-terminal con D₁₁. En otra realización específica, la sALP está fusionada en su extremo C-terminal con D₁₂. En otra realización específica, la sALP está fusionada en su extremo C-terminal con D₁₃. En otra realización específica, la sALP está fusionada en su extremo C-terminal con D₁₄. En otra realización específica, la sALP está fusionada en su extremo C-terminal con D₁₅. En otra realización específica, la sALP está fusionada en su extremo C-terminal con D₁₆.

65 Se entiende que puede usarse cualquier proteína soluble funcional en el conjugado de la presente invención. Aunque se presentan en el presente documento resultados para conjugados que comprenden una sALP específica de la presente invención, se entiende que puede usarse así cualquier otra sALP funcional.

sPHEX

5 Tal como se usa en el presente documento, sPHEX significa cualquier fragmento biológicamente activo soluble de sPHEX o muteína de la misma. Los expertos en la técnica pueden preparar constructos de expresión distintos de los descritos expresamente en el presente documento para la producción óptima de sPHEX en líneas celulares adecuadas transfectadas con los mismos. Además, los expertos en la técnica pueden diseñar fragmentos de ADNc que codifican para fragmentos biológicamente activos solubles y muteínas de la PHEX que se produce de manera natural que poseen la misma o similar actividad biológica que la enzima de longitud completa que se produce de manera natural.

15 Para crear una fuente recombinante para sPHEX, puede construirse una gran serie de vectores de expresión y someterse a prueba para detectar la expresión de un ADN de PHEX. Basándose en experimentos de transfección transitoria, así como transfecciones estables, puede identificarse un constructo de expresión que proporciona un nivel de expresión particularmente alto.

Sin limitarse a ello, puede usarse cualquier sPHEX que comprenda al menos una parte de ectodominio de PHEX nativo que comience con la cisteína en la posición 54 de la secuencia presentada en la figura 10.

20 Los conjugados son por tanto cualquier sPHEX que comprenda este fragmento 54-749 de la PHEX nativa, preferiblemente el fragmento nativo 53-749, más preferiblemente el fragmento nativo 52-749, más preferiblemente el fragmento nativo 51-749, más preferiblemente el fragmento nativo 50-749, más preferiblemente el fragmento nativo 49-749, más preferiblemente el fragmento nativo 48-749, más preferiblemente el fragmento nativo 47-749, y más preferiblemente el fragmento nativo 46-749, junto con un poliaspartato seleccionado del grupo que consiste en D₁₀ a D₁₆ fusionado inmediatamente en el sentido de 5' de este fragmento.

25 El conjugado puede comprender además opcionalmente uno o más aminoácidos adicionales 1) en el sentido de 5' del poliaspartato; y/o 2) entre el poliaspartato y el fragmento nativo o equivalente funcional. Estos aminoácidos pueden ser cualquier aminoácido. Pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en cualquier aminoácido excepto cisteína, prolina y triptófano, concretamente los aminoácidos que se sabe que inducen la formación de enlaces disulfuro o cambios en la conformación.

30 Estos aminoácidos pueden estar presentes en el conjugado cuando por ejemplo la estrategia de clonación usada para producirlos los introduce en estas ubicaciones.

35 Según estrategias de clonación específicas, los aminoácidos ubicados en el sentido de 5' del poliaspartato en la PHEX escindible recombinante pueden seleccionarse según parámetros conocidos de modo que proporcionan un sustrato adecuado para enzimas específicas de la ruta secretora (por ejemplo furina o peptidasa señal) de la célula huésped que se usará para escindir las PHEX escindibles recombinantes producidas para dar una sPHEX de direccionamiento óseo secretada. La probabilidad de que una secuencia diseñada se escinda por la peptidasa señal de la célula huésped puede predecirse mediante un algoritmo informático apropiado tal como el descrito en Bendtsen *et al.* (J Mol Biol. 16 de julio de 2004; 340(4):783-95) y disponible en la Web en <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> que tiene en cuenta parámetros incluyendo los siguientes: los aminoácidos en la posición -3 y -1 respecto al sitio de escisión mediante la peptidasa señal tienen de manera deseable cadenas laterales no cargadas y pequeñas. Preferiblemente, en la posición -1: Ala, Ser, Gly, Cys, Thr y ocasionalmente Gln, Pro y Leu. De manera similar, los de la posición -3 deben ser preferiblemente: Ala, Ser, Gly, Cys, Thr, Ile, Leu, Val. Además, los aminoácidos en la posición -6 y -4 respecto al sitio de escisión son de manera deseable los que pueden inducir la formación de residuos con un giro beta (tales como Pro).

40 Se dan a conocer además conjugados que comprenden aminoácidos adicionales que pueden seleccionarse basándose en la estrategia de clonación usada para producir una PHEX recombinante escindible. Por tanto, la PHEX recombinante escindible dada a conocer en los ejemplos 3 y 4 a continuación contiene tales aminoácidos adicionales en el sentido de 5' del poliaspartato y entre el poliaspartato y la secuencia de ectodominio nativa. Además, se da a conocer un conjugado que comprende la secPHEX dada a conocer en la solicitud en tramitación junto con la presente n.º WO 02/15918 preparada fusionando el fragmento N-terminal NL-1 que comprende un sitio de furina con el ectodominio nativo de PHEX con el vector pCDNA3/RSV/NL-1-PHEX, y una secPHEX que comprende un fragmento de inmunoglobulina en su extremo N-terminal. Más particularmente, la figura 12 presenta esquemáticamente la estructura de secPHEX que comprenden aminoácidos adicionales en el sentido de 5' del fragmento de ectodominio de PHEX 46-749 nativo. Los constructos n.º 1 a 3 y 5 podrían fusionarse con un poliaspartato y usarse como conjugados. El constructo n.º 4 constituye un conjugado: comprende un poliaspartato D₁₀ y un fragmento de ectodominio nativo.

45 Los conjugados pueden también abarcar además sPHEX que comprenden deleciones en su extremo C-terminal no perjudiciales para su actividad enzimática.

65 Además, pueden darse a conocer conjugados en los que el poliaspartato estará unido al extremo C-terminal del

fragmento de ectodominio de PHEX nativo.

sALP

5 ALP es una proteína unida a la membrana anclada a través de un glicolípido a su extremo C-terminal. Este anclaje de glicolípido (GPI) se añade de manera postraduccionnal tras la eliminación de un extremo C-terminal hidrófobo que sirve como anclaje de membrana transitoria y como señal para la adición del GPI. Por tanto, la sALP usada en el ejemplo 6 en el presente documento está constituida por una ALP en la que el primer aminoácido de la secuencia C-terminal hidrófoba, concretamente alanina, se sustituye por un codón de terminación. La ALP soluble así formada
10 contiene todos los aminoácidos de la forma anclada nativa y por tanto activa de ALP.

Los conjugados de sALP según realizaciones específicas de la presente invención son por tanto cualquier sALP junto con un poliaspartato seleccionado del grupo que consiste en D₁₀ a D₁₆ fusionado inmediatamente en el sentido de 3' de este fragmento.

15 El conjugado puede comprender además opcionalmente uno o más aminoácidos adicionales 1) en el sentido de 5' del poliaspartato; y/o 2) entre el poliaspartato y el fragmento de sALP nativa o equivalente funcional. Este es el caso por ejemplo cuando la estrategia de clonación usada para producir el conjugado de direccionamiento óseo introduce aminoácidos exógenos en estas ubicaciones. Sin embargo, los aminoácidos exógenos deben seleccionarse de modo que no proporcionen un sitio de transaminación adicional. La probabilidad de que una secuencia diseñada se escinda mediante la transaminasa de la célula huésped puede predecirse tal como se describe por Ikezawa (Biol Pharm. Bull. 2002, 25(4) 409-417).

20 Los conjugados de la presente invención también abarcan además sALP que comprenden delecciones en su extremo N-terminal no perjudiciales para su actividad enzimática.

Además, la presente invención comprende conjugados en los que el poliaspartato estaría unido al extremo N-terminal del fragmento anclado de ALP nativa o su fragmento biológicamente activo.

30 La expresión "proteína recombinante" se usa en el presente documento para referirse a una proteína codificada por un ácido nucleico manipulado genéticamente insertado en una célula huésped procariota o eucariota. El ácido nucleico se coloca generalmente dentro de un vector, tal como un plásmido o virus, según sea apropiado para la célula huésped. Aunque se ha usado *E. coli* como huésped para expresar los conjugados de la presente invención en los ejemplos presentados en el presente documento; un experto en la técnica entenderá que pueden usarse
35 varios otros huéspedes para producir proteínas recombinantes según métodos que son rutinarios en la técnica. Se dan a conocer métodos representativos en Maniatis, *et al.* Cold Springs Harbor Laboratory (1989). "Proteína escindible recombinante" tal como se usa en el presente documento pretende referirse a una proteína recombinante que puede escindirse mediante una enzima del huésped de modo que produce una proteína secretada/soluble.

40 La expresión "fragmento de ectodominio" en el presente documento cuando se usa en relación con PHEX pretende referirse a un fragmento de PHEX que está ubicado fuera de la membrana celular cuando se encuentra en su forma nativa.

45 La expresión "tejido óseo" se usa en el presente documento para referirse a tejido sintetizado por osteoblastos compuesto por una matriz orgánica que contiene en su mayor parte colágeno y mineralizada mediante la deposición de cristales de hidroxiapatita.

50 Las proteínas de fusión comprendidas en los conjugados de administración ósea de la presente invención son útiles para el tratamiento terapéutico de estados defectuosos óseos proporcionando una cantidad eficaz de la proteína de fusión al hueso. La proteína de fusión se proporciona en forma de una composición farmacéutica en cualquier portador farmacéuticamente aceptable, y se administra mediante cualquier procedimiento convencional, por ejemplo mediante inyección intravenosa.

55 La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" se usa en el presente documento para referirse, cuando se elige la administración parenteral como la vía de administración, a emulsiones, suspensiones o disolventes acuosos o no acuosos estériles farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, aceite de pescado y ésteres orgánicos inyectables. Los disolventes acuosos incluyen agua; disoluciones de agua-alcohol; solución salina fisiológica; vehículos parenterales médicos tamponados incluyendo disolución de cloruro de sodio, disolución de dextrosa de Ringer, disolución de dextrosa más cloruro de sodio, reabastecedores de fluidos y nutrientes; reabastecedores de electrolitos; disolución de Ringer que contiene
60 lactosa, o aceites fijos.

65 La expresión "cantidad eficaz" se usa en el presente documento para referirse a la cantidad mínima de una composición farmacéutica que debe administrarse a un mamífero con el fin de lograr un efecto terapéutico significativo. Las dosificaciones dependerán de muchos factores incluyendo el modo de administración. Normalmente, la cantidad de proteína contenida dentro de una única dosis será una cantidad que previene, retrasa o

trata de manera eficaz un estado no deseado relacionado con los huesos sin inducir toxicidad significativa. En particular, una cantidad eficaz del conjugado y las composiciones de la presente invención comprenderá una cantidad de proteína de fusión que provocará un alivio significativo de los síntomas clínicos del estado.

5 La cantidad eficaz puede administrarse diariamente, semanalmente, mensualmente o fracciones de los mismos. Normalmente, una composición farmacéutica de la invención puede administrarse en una cantidad de desde aproximadamente 0,001 mg hasta aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal al día (por ejemplo, 10 mg, 10
10 aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 10 gramos del conjugado que va a dirigirse al hueso al día, desde aproximadamente 100 mg hasta aproximadamente 5 gramos del conjugado que va a dirigirse al hueso al día, aproximadamente 1 gramo del conjugado que va a dirigirse al hueso al día, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 25 gramos del conjugado que va a dirigirse al hueso a la semana, de aproximadamente 50 mg a
15 aproximadamente 10 gramos del conjugado que va a dirigirse al hueso a la semana, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 5 gramos del conjugado que va a dirigirse al hueso cada dos días, y aproximadamente 1 gramo del conjugado que va a dirigirse al hueso una vez a la semana.

20 Estas son simplemente directrices puesto que la dosis real debe seleccionarse y ajustarse cuidadosamente por el médico encargado basándose en factores clínicos únicos para cada paciente. La dosis diaria óptima se determinará mediante métodos conocidos en la técnica y se verá influida por factores tales como la edad del paciente y otros factores clínicamente relevantes. Además, los pacientes pueden tomar medicamentos para otras enfermedades o estados. Puede continuarse con los otros medicamentos durante el tiempo en el que la proteína para administración al hueso se administra al paciente, pero es particularmente aconsejable en tales casos comenzar con dosis bajas para determinar si se experimentan efectos secundarios adversos.

La expresión "condiciones de alta rigurosidad" pretende referirse a condiciones que permiten que se unan secuencias con una alta homología. Sin limitarse a ello, se enumeran ejemplos de tales estados en el manual "Molecular cloning, a laboratory manual", segunda edición de 1989 de Sambrook *et al.*: 6X SSC o 6X SSPE, reactivo
30 de Denhardt o no, SDS al 0,5% y la temperatura usada para obtener condiciones de alta rigurosidad está lo más a menudo alrededor de 68°C (véanse las páginas 9.47 a 9.55 de Sambrook) para ácido nucleico de 300 a 1500 nucleótidos. Aunque la temperatura óptima que va a usarse para una sonda de ácido nucleico específica puede calcularse empíricamente, y aunque hay espacio para alternativas en las condiciones del tampón seleccionadas, dentro de estos intervalos de condiciones muy bien conocidos, el ácido nucleico capturado no variará
35 significativamente. De hecho, Sambrook indica claramente que la "elección depende en gran medida de la preferencia personal" (véase la página 9.47). Sambrook especifica que la fórmula para calcular la temperatura óptima que varía según la fracción de guanina y citosina en la sonda de ácido nucleico y la longitud de la sonda (de 10 a 20°C inferior a la T_m en la que $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41(\text{fracción de G+C}) - 0,63 (\% \text{ de formamida} - (600/\text{l}))$) (véanse las páginas 9.50 y 9.51 de Sambrook).

40 Otros objetos, ventajas y características de la presente invención resultarán más evidentes tras la lectura la siguiente descripción no restrictiva de realizaciones preferidas de la misma, proporcionadas a modo de ejemplo sólo con referencia a los dibujos adjuntos.

45 **Breve descripción de los dibujos**

En los dibujos adjuntos:

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

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

55 la figura 3 proporciona una representación esquemática del vector pCDNA3-RSV-D10sPHEX-NEO de plásmido;

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

60 la figura 5 presenta un análisis de SDS-PAGE teñida con Sypro-ruby™ de las diferentes fracciones recogidas durante todo el procedimiento de purificación de D₁₀sPHEX;

65 la figura 6 muestra la variación en los niveles séricos de fosfatasa alcalina (ALP) observados en ratones Hyp a los que se les inyectaron diariamente dosis i.v. de sPHEX y D₁₀-sPHEX durante 14 días. Los valores de U/l representan la disminución observada entre el día -3 (que corresponde en la gráfica a 0 U/l) y el día 15 del régimen de inyección y son la media de medidas realizadas en 6 animales;

la figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ADN recombinante que codifica para una proteína que puede escindirse de modo que produce D₁₀-sPHEX (SEQ ID NO: 1);

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

la figura 9 compara la unión a la fase mineral del hueso de proteínas (A. GST, B. sPHEX) con la de sus homólogos fusionados con deca-aspartato;

10 la figura 10 muestra los aminoácidos de una PHEX nativa (o unida a la membrana) (SEQ ID NO: 3);

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

15 la figura 12 ilustra esquemáticamente la estructura y las actividades de diversos constructos de secPHEX;

la figura 13 ilustra gráficamente a través de medición fluorimétrica la actividad fosfatasa alcalina en el extracto celular soluble y medio gastado de HEK293 transfectadas de manera transitoria con vectores de expresión que codifican para sALP-D₁₀ y sALP;

20 la figura 14 ilustra gráficamente la detección de sALP y sALP-D₁₀ mediante inmunotransferencia de tipo Western con el anticuerpo B4-78 específico en los medios gastados y el extracto celular de HEK-293 tras la transfección transitoria. (Panel A: tinción con rojo Ponceau; Panel B: inmunotransferencia de α-B4-78). Se muestran en la izquierda los tamaños de los marcadores de peso molecular;

25 la figura 15 muestra gráficamente la unión a la fase mineral del hueso de un deca-aspartato fusionado con fosfatasa alcalina secretada;

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

la figura 17 muestra A. la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 7) que codifica para un conjugado de la presente invención, concretamente sALP-D₁₀; y B. la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de ese conjugado; y

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

Descripción de realizaciones ilustrativas

40 La presente invención mostró que péptidos poli-aspárticos específicos fusionados en marco con una proteína, tal como se muestra a modo de ejemplo en el presente documento mediante la proteína glutatión-S-transferasa (GST), usada como proteína indicadora, mediante sPHEX y mediante sALP, pueden aumentar significativamente la capacidad de unión al hueso de estas proteínas.

45 La presente invención se ilustra en detalles adicionales mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

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

Tabla 1: secuencia de oligonucleótidos sintéticos usados en los ejemplos 1 a 7

D ₆	SEQ ID NO: 9	5'-GATCCGATGACGATGACGATGACGC-3'
	SEQ ID NO: 10	5'-GGCCGGTCATCGTCATCGTCATCG-3'
D ₁₀	SEQ ID NO: 11	5'-GATCCGATGACGATGACGATGACGATGACGC-3'
	SEQ ID NO: 12	5'-GGCCGGTCATCGTCATCGTCATCGTCATCG-3'
D ₁₆	SEQ ID NO: 13	5'-GATCCGATGACGATGACGATGACGATGACGATGACGC-3'
	SEQ ID NO: 14	5'-GGCCGGTCATCGTCATCGTCATCGTCATCGTCATCG-3'
HMEPE	SEQ ID NO: 15	5'-GATCCGATGACAGTAGTAGTCACTGACAGTGGCAGTTCAGTGAGAGCGGATGGTGACGC-3'
	SEQ ID NO: 16	5'-GGCCGGTCACCCATCGCTCCTCAGTCCACTGCCACTGTCAGATGACTCACTACTGTCATCG-3'
Esterina h	SEQ ID NO: 17	5'-GATCCGATCATCTGAAGAGAAATTTTGGTAGAATGGAAAGATTCGGTGC-3'
	SEQ ID NO: 18	5'-GGCCGCACCCGAATCTCCAAATCTACGCCAAAAATTTCTCTTCAGATGAATCG-3'
hMGP	SEQ ID NO: 19	5'-GATCCTGTTATGAATCACATGAAAGCATGGAATCTTATGAACTTAATCCCTTCAATTGC-3'
	SEQ ID NO: 20	5'-GGCCGCAATGAAAGGATTAAGTTCATAAGATTCATGCTTTCCATGTCATGATAACAG-3'
Osteopontina h	SEQ ID NO: 21	5'-GATCCCAGAATGCTGTGTCCTCTGAAGAAACCAATGACTTTAAAGG3'
	SEQ ID NO: 22	5'-GGCCGGCTTAAAGTCAATGGTTTCTTCAGAGGACACAGCATTCTGG-3'
hBSP2	SEQ ID NO: 23	5'- GATCCGGCAGTAGTGACTCATCCGAAAGAAAATGGAGATGACAGTTCAGAAAGAGGAGGAAAGC- 3'
	SEQ ID NO: 24	5'- GGCCGGCTTCCTCCTCCTCTCTGAACTGTCATCTCCATTTCTTCGGATGAGTCACTACTGCCG- 3'
hIGFBP5	SEQ ID NO: 25	5'-GATCCCGCAAGGATTTACAAGAGAAAAGCAGTGCAAACTTCCGTGGCCGCAAGCGTGC-3'
	SEQ ID NO: 26	5'-GGCCGCACCGCTTGGCCACCGGAATTTGCACGTGCTTTCTGTAGAATCCITTCGCC-3'
M81736 CBS	SEQ ID NO: 27	5'-AGTCGGGATCCGGAACAAGCAGCGTGTCTAC-3'
	SEQ ID NO: 28	AGATCGCGCCGCTCAATTTGACACGGTGTGATTAAGG-3'
D ₁₀	SEQ ID NO: 29	5'-CCGGAGATGACGATGACGATGACGATGACGATGACT-3'
	SEQ ID NO: 30	TCTACTGCTACTGCTACTGCTACTGCTACTGAGGCC-5'

Ejemplo 1**Unión al hueso de GST-D₆, GST-D₁₀ y GST-D₁₆**

5 Se usó tecnología de ADN recombinante para generar un plásmido que contenía un ácido nucleico que codificaba para GST seguido en marco por un ácido nucleico que codificaba para un péptido ácido D₆, D₁₀ o D₁₆. Para obtener los conjugados GST-D₆, GST-D₁₀ y GST-D₁₆, se mezcló en primer lugar el oligonucleótido de SEQ ID NO: 9 (véase la tabla 1) con el oligonucleótido de SEQ ID NO: 10, se mezcló el oligonucleótido de SEQ ID NO: 11 con oligonucleótido de SEQ ID NO: 12, y se mezcló el oligonucleótido de SEQ ID NO: 13 con oligonucleótido de SEQ ID NO: 14. Este procedimiento generó oligonucleótidos dobles que codificaban para D₆, D₁₀ y D₁₆, respectivamente, y que tenían extremos compatibles con la clonación en el plásmido pGEX3T-4 (Pharmacia biotechnology) digerido previamente con las endonucleasas de restricción BamHI y NotI. Se transformaron vectores pGEX3T-4 en la cepa bacteriana de *E. coli* AP401 deficiente en proteasa (*lon::mini tetR ara-Δlac-pro nalA argEam rifR thiI* [F' *pro AB lacIq Z M15*]).

10 Se usaron colonias bacterianas positivas para sembrar un precultivo de 10 ml de medio YT doble y ampicilina 100 mg/litro. Se hicieron crecer las bacterias durante la noche a 37°C en un agitador orbital fijado a 250 rpm. Se añadió el precultivo a 500 ml de medio YT con ampicilina doble nuevo en un matraz Erlenmeyer de 2 litros. Se dejaron crecer las bacterias a 37°C con agitación orbital hasta que se alcanzó una densidad óptica a 595 nm de 0,7. Se indujo entonces la expresión de proteínas añadiendo 500 μl de disolución de IPTG 0,1 M y se pusieron de nuevo las bacterias en incubación durante 2 horas. Se centrifugaron las bacterias a 8000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se suspendió el sedimento en 25 ml de PBS enfriado con hielo que contenía inhibidor de proteasas en comprimido oblongo Complete-EDTA (Boehringer Mannheim) y se congeló a -20°C.

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

35 Se dializaron GST y GST fusionado a péptido frente a PBS y se fijó la concentración a 2 mg/ml. Se inició la reacción de yodación añadiendo 2 perlas de yodo enjuagadas con PBS a 2 mCi de Na¹²⁵I (100 pCi/μl, ICN) disuelto en 500 μl de PBS. Se incubaron las perlas a temperatura ambiente durante cinco minutos antes de añadir 1 mg de proteína dializada. Se produjo la reacción de yodación durante 15 minutos antes de eliminar las perlas y enjuagar en 500 ml de PBS. A los 1,5 ml finales de la disolución de proteína yodada, se le añadieron 15 μl de NaI 6 mM para diluir la radiactividad no específica. Entonces se desaló la mezcla usando columnas de filtración en gel PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech) equilibradas con PBS. Las proteínas eluyeron en el volumen vacío. Se concentraron y dializaron frente al tampón *in vivo* (PO₄ de sodio 1 mM pH 7,4 y NaCl 150 mM) usando cartuchos Centriprep-YM10™ (Amicon). Se midió la radiactividad usando un contador de radiación gamma, se evaluó la concentración de proteína mediante el ensayo de Bradford y se reveló el enlace químico de ¹²⁵I a proteínas mediante autorradiografía de SDS-PAGE secada. Se mantuvieron las muestras yodadas a 4°C.

Capacidad de unión al hueso de proteínas de fusión GST-péptidos poliaspárticos en comparación con la de GST sola

50 Se inyectaron las proteínas de fusión de GST yodadas en ratones bajo anestesia de isoflurano como un bolo intravenoso a través de la vena subclavia. Se inyectó una dosis de 1 mg de proteína yodada / por kg de peso corporal. Se fijó el volumen de dosis máxima a 10 ml/kg. La duración del tratamiento fue de sesenta minutos. Diez y sesenta minutos tras la inyección, se extrajeron muestras de sangre (de 0,1 a 0,2 ml) a través de la vena subclavia bajo anestesia en tubos Microvette™ (Sarstedt, n.º 20.1291) con suero/activador de la coagulación en gel. En la necropsia, se extrajeron muestras de sangre y se sacrificaron los animales mediante exanguinación del corazón bajo anestesia de isoflurano. Se extrajeron los órganos (riñones, hígado, fémures, tibias y tiroide), se enjuagaron en solución salina al 0,9% USP, se transfirieron sobre una gasa y se transfirieron a tubos para contador gamma. Se pesaron las muestras de suero y los órganos y se midió la radiactividad. Se expresaron los resultados como porcentaje de dosis inyectada. Ni D₁₀-GST ni D₁₆-GST promovieron la unión a otros órganos distintos de hueso. Esto mostró la especificidad de estos conjugados para el hueso (datos no mostrados).

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

El hecho de que D₆, un péptido que se muestra que administra satisfactoriamente moléculas pequeñas a hueso, no podía administrar satisfactoriamente una proteína, concretamente GST, a hueso muestra que no puede predecirse si un péptido ácido específico que se sabe que administra eficazmente una molécula pequeña a hueso también será eficaz en la administración de una proteína a hueso.

5

Ejemplo 2

Capacidad de unión de GST fusionada con diversos péptidos

10 La fosfoglicoproteína extracelular de la matriz humana (hMEPE) es una proteína sintetizada por osteoblastos que muestra similitudes importantes con un grupo de fosfo-glicoproteínas de la matriz mineral de huesos y dientes, proteínas que se sabe que se unen de manera natural a la matriz ósea (8). De particular importancia, hMEPE presenta en su extremo carboxilo terminal una secuencia de 18 residuos de aminoácido (DDSESSDSGSSSESDDGD) (SEQ ID NO: 31) similar a péptidos ácidos que se encuentran en la fosforina dentinaria y la sialofosfoproteína dentinaria, que se sabe que se unen ambas a la matriz ósea (8).

15

La estaterina humana (estaterina h) es una proteína sintetizada por las glándulas salivales, que de manera similar a la histatina modula directamente la nucleación y/o el crecimiento de la hidroxiapatita. De particular importancia, estaterina h presenta una secuencia de 15 residuos de aminoácido en las posiciones 20 a 34 (DSSEKFLRRIGRFG) (SEQ ID NO: 32) que se muestra que se une fuertemente a hidroxiapatita (9).

20

La proteína Gla de la matriz humana (hMGP) es una proteína sintetizada por células de músculo liso vascular y condrocitos que funciona como inhibidor de la polimerización de la hidroxiapatita uniéndose a núcleos de cristal. De particular importancia, hMGP presenta en su extremo amino-terminal una secuencia de 17 residuos de aminoácido en las posiciones 19 a 35 del marco de lectura abierto (CYESHESMESYELNPF) (SEQ ID NO: 33) similar a péptidos ácidos gamma-carboxiglutámicos fosforilados encontrados en osteocalcina que se sabe que se unen a la matriz ósea, y que se cree que promueven la unión a la matriz ósea (10).

25

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

30

35

La sialoproteína II ósea humana (hBSP2) es una proteína sintetizada por osteoblastos que muestra similitudes importantes con un grupo de fosfo-glicoproteínas de la matriz mineral de huesos y dientes, proteínas que se sabe que se unen de manera natural a la matriz ósea. De particular importancia, hBSP2 presenta en su extremo amino-terminal una secuencia de 18 residuos de aminoácido en las posiciones 62 a 79 del marco de lectura abierto (GSSDSSEENGDDSSSEEE) (SEQ ID NO: 35) similar a péptidos ácidos que se encuentran en la fosforina dentinaria y MEPE, y que se cree que promueven la unión a la matriz ósea (8).

40

La proteína 5 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina humana (hIGFBP5) se sintetiza por osteoblastos. Esta proteína, de manera similar a proteínas de la familia de IGFBP, se cree que regula la función de osteoblastos en el proceso de remodelación ósea. De particular importancia, hIGFBP5 presenta una secuencia de 18 residuos de aminoácido en las posiciones 221 a 238 del marco de lectura abierto (RKGIFYKRKQCKPSRGRKR) (SEQ ID NO: 36) que se mostró que se unía fuertemente a hidroxiapatita (12).

45

50 La adhesina de colágeno de *Staphylococcus aureus* (M81736) es una proteína expresada en la superficie de *S. aureus* que promueve la unión de bacterias a la matriz de colágeno de tejidos cartilagosos y óseos de mamíferos. Se notificó que una unión de este tipo puede desempeñar un papel decisivo en el desarrollo de patógenos tales como osteomielitis y artritis infecciosa. De particular importancia, se notificó que el dominio de unión a colágeno (CBS) de esta adhesina abarcaba 151 residuos de aminoácido (G168 a N318) del marco de lectura abierto de la proteína (13,14). La secuencia primaria de aminoácidos es la siguiente:

55

```
GTSSVFYKYKTGDMLPEDTTHVRWFLNINNEKSYVSKDITI
KDQIQGGQQLDLSTLNINVTGTHSNYYSGQSAITDFEKAFPGSKITVDNTKNTI
DVTIPQGYGSYNSFSINYKTKITNEQQKEFVNNSQAWYQEHGKEEVNGKSFN HTVHN. (SEQ ID NO: 37)
```

60

Se construyeron plásmidos que contenían las secuencias de péptidos ácidos derivadas de hMEPE, estaterina h, hMGP, hOPN, hBSP2, hIGFBP5 y CBS tras GST en marco para determinar si podían promover el direccionamiento óseo de una proteína recombinante. Se usó tecnología de ADN recombinante tal como se describió en el ejemplo 1 para generar plásmidos para péptidos derivados de hMEPE, estaterina h, hMGP, hOPN, hBSP2 y hIGFBP5. Se mezclaron los pares de oligonucleótidos identificados en la tabla 1 para cada uno de estos péptidos para obtener la proteína de fusión GST-péptido ácido correspondiente. Este procedimiento generó oligonucleótidos dobles que

65

codificaban para estos péptidos ácidos y que tenían extremidades compatibles con la clonación en el plásmido pGEX3T-4 (Pharmacia biotechnology) digerido previamente con las endonucleasas de restricción BamHI y NotI.

- 5 Se construyó un plásmido que contenía CBS tal como sigue. Se obtuvo un gen sintético que correspondía a la secuencia de CBS de Bio S&T (Montreal) y se insertó en el plásmido pLIV Select. Se usaron oligonucleótidos de SEQ ID NO: 27 y 28 como cebadores en reacciones de PCR con el plásmido pLIV Select que contenía el gen CBS para amplificar las secuencias específicas de CBS. Se transformaron vectores pGEX-4T-3 en la cepa bacteriana de *E. coli* AP401 deficiente en proteasa (*lon::mini tetR ara- Δlac-pro nalA argEam rifR thil [F' pro AB lacIq Z M15]*).
- 10 La producción y purificación de proteínas, y la farmacodistribución de la proteína de fusión yodada se realizaron tal como se describió en el ejemplo 1.

Ninguno de estos GST-péptidos ácidos mostró unirse a huesos (resultado no mostrado).

- 15 El hecho de que el péptido derivado de estaterina, un péptido que se muestra que administra satisfactoriamente una pequeña parte de osteopontina a hueso, no podía administrar satisfactoriamente la proteína GST a hueso muestra que no puede predecirse si un péptido ácido específico que se sabe que administra eficazmente un péptido pequeño a hueso será también eficaz en la administración de una proteína a hueso.

20 Ejemplo 3

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

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

30 Vector de expresión de D₁₀sPHEX

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

- 35 5'-CAGTCAAGGTCTCTTATCCGGAAGTCTCCAAGCTAAACAGG-3' (SEQ ID NO: 38)

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

- 40 Se insertó la secuencia de BspEI de hexámero (subrayada) en marco con y en el sentido de 5' de la secuencia de ADN de sPHEX. Este constructo codifica para una proteína recombinante que puede escindirse entre la leucina y serina en las posiciones 41 y 42, respectivamente en la figura 8. Está constituido por tanto por dos aminoácidos exógenos, seguidos en el sentido de 3' por un deca-aspartato, que a su vez está seguido por dos aminoácidos exógenos adicionales. Estos 4 aminoácidos exógenos se derivan de la estrategia de clonación usada para producir el conjugado. Se mostró que estos aminoácidos exógenos no suprimían la actividad enzimática del conjugado (véase la figura 12 que muestra la actividad específica de este constructo) pero puede prescindirse de los mismos. En el sentido de 3' de estos aminoácidos exógenos está un fragmento de ectodominio de la PHEX nativa que comienza por tanto con la serina en la posición 46 de la secuencia presentada en la figura 10. Se escindió el vector pCDNA3-RSV-NEO modificado con BspEI y entonces se digirió con fosfatasa alcalina para eliminar los restos fosfato en 5'. Se fosforiló en primer lugar un oligonucleótido doble que codificaba para deca-aspartato: [5'-CCGGAGATGACGATGACGATGACGATGACGATGACT-3' (SEQ ID NO: 29) y 3'-TCTACTGCTACTGCTACTGCTACTGCTACTGAGGCC-5' (SEQ ID NO: 30)] en sus extremos 5' con polinucleótido cinasa de T4 y se ligó con el vector digerido con BspEI. Esto produjo el vector pCDNA3-RSV-D₁₀sPHEX-NEO (figura 3). Este vector comprendía la secuencia presentada en la figura 7 que codifica para la PHEX escindible
- 55 recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos presentada en la figura 8.

Expresión de D₁₀sPHEX recombinante

- 60 Para inducir la expresión estable de la proteína D₁₀sPHEX, se transfectó el vector pCDNA3-RSV-D₁₀sPHEX-NEO en células LLC-PK1 (células de riñón porcino; n.º de la ATCC CRL-1392) usando el kit de transfección de liposomas Lipofectamine-Plus® (Invitrogen). Se seleccionaron células transfectadas añadiendo G-418 400 µg/ml (Life Technologies) al medio: se examinaron clones de células resistentes a G-418 para detectar la expresión de D₁₀sPHEX usando el ensayo enzimático fluorescente de PHEX [Campos M. *et al.* *Biochem. J.* (2003) 373, 271-9]. Se estimó el peso molecular aparente de la proteína recuperada en el medio gastado mediante inmunotransferencia usando un anticuerpo monoclonal generado contra un fragmento de PHEX humana recombinante (K121-E294) tal como se describió anteriormente (Ruchon AF *et al.* *J. Bone Miner. Res.* (2000) 15, 1440-1450). Se usó un clon
- 65

resistente a G-418 que expresaba de 1 a 2 mg de D10sPHEX por litro para la producción de proteína. Se sembraron las células en Cellstack-10® (Corning) a una densidad de 7×10^7 en 1,75 litros de medio (medio 199, FBS al 6%, piruvato de Na 1 mM, penicilina 1×10^5 U/litro, estreptomycin 100 mg/litro y G-418 al 1%). Se aumentó la expresión de D10sPHEX incubando las células en 1,75 litros de DMEM + butirato de sodio 10 mM durante cuatro días a 37°C y el 5% de CO₂ antes de la recogida del medio gastado.

Purificación y caracterización

Se centrifugó el sobrenadante celular a 500 x g durante 5 minutos a 4°C y se filtró sobre fibra de vidrio (Fisher, APFC09050) y se concentró de 10 a 40 veces usando un dispositivo de filtración de flujo tangencial Ultrasette® 30 (Pall Canada). Se llevó el pH de la disolución hasta 5,6 con ácido acético 1 M antes de una diálisis durante la noche a 4°C frente a acetato de sodio 50 mM, NaCl 100 mM pH 5,6 (tampón SP). Se cargó el sobrenadante dializado, a una velocidad de flujo de 4 ml/min., sobre una columna de intercambio catiónico SulfoPropyl-Sepharose de 20 ml (Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibrada con tampón SP. Se lavó la columna con el mismo tampón a la misma velocidad de flujo hasta que se alcanzó un nivel inicial de absorbancia de 280 nm. Entonces se eluyeron la mayoría de las proteínas contaminantes con una etapa de NaCl 226 mM en el tampón SP. Entonces se eluyó D10sPHEX con una etapa de NaCl 280 mM (figura 4A). Se analizaron las fracciones mediante SDS-PAGE y con el ensayo de actividad enzimática de PHEX. Se reunieron las fracciones que contenían sPHEX y se dializaron de manera exhaustiva frente a MOPS 20 mM pH 7, NaCl 250 mM antes de cargar en una columna Blue-Sepharose® HP (Amersham Pharmacia) de 5 ml a 5 ml/min. Se enjuagó la columna, a la misma velocidad de flujo con el mismo tampón y se recuperó la mayoría de la proteína D10sPHEX aumentando la concentración de NaCl gradualmente hasta 350 mM (figura 4B). La pureza de la fracción final fue mayor del 95%. Alternativamente, la Blue-Sepharose® podía reemplazarse por Heparin-Sepharose® (Amersham Pharmacia) en la que D10sPHEX se une fuertemente a lo largo de un intervalo de pH (de 5 a 8). Se eluyó D10sPHEX usando un gradiente de NaCl. Se determinó que la pureza estaba por encima del 90%. Se concentró D10sPHEX y se dializó frente a PO₄ de sodio 1 mM pH 7,4, NaCl 150 mM usando cartuchos Centriprep-50®. Se filtró la muestra dializada en un entorno estéril sobre una membrana de 0,22 µm. Se mostró que D10sPHEX purificada permanecía estable a lo largo de meses a 4°C. Se determinaron las concentraciones de proteína usando el método de Bradford (kit de ensayo de proteínas DC; Biorad) con albúmina sérica bovina (BSA) como patrón. Se evaluó la pureza de la proteína mediante tinción con Sypro-Ruby® (Molecular Probes) de proteínas resueltas en SDS-PAGE al 4-12% (figura 5). Se determinó la actividad enzimática de D10sPHEX usando el sustrato fluorogénico.

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

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

Se investigó por tanto el posible efecto terapéutico de D10sPHEX y sPHEX con inyección intravenosa en bolo a ratones Hyp/Y a lo largo de un periodo de 2 semanas.

Se dializaron D10sPHEX y sPHEX frente a vehículo y se filtraron las disoluciones a través de un filtro de proteínas de baja unión de 0,22 µm. Se tomaron alícuotas de las disoluciones y volvieron a someterse a ensayo para determinar la actividad enzimática y la concentración mediante ensayo enzimático fluorogénico y el método de Bradford, respectivamente.

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

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

Ejemplo 4

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

Marcaje con fluoresceína de proteínas purificadas

Se marcaron proteínas purificadas recombinantes con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Molecular Probes F143). Se llevó a cabo la reacción añadiendo proteínas a fosfato de sodio 10 mM, tampón NaCl 50 mM pH 7 a una concentración de proteínas final de 1 mg/ml. Se inició la reacción de marcaje añadiendo FITC disuelto en DMSO a una concentración de 20 mg/ml hasta alcanzar una razón molar de 20:1 con respecto a la concentración de proteína. Se dejó reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora. Se separó la proteína marcada de la fluoresceína libre en una columna PD-10® (Pharmacia) antes de la diálisis en el tampón de unión (fosfato de sodio 1 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4).

Preparación de la fase mineral de huesos

Se diseccionaron huesos largos de una rata y se trituraron hasta dar un polvo en un mortero enfriado con nitrógeno líquido. El polvo o bien se mantuvo a -80°C o bien se usó directamente. Se lavó una alícuota del polvo (300 mg) 3 veces con 8 ml de PBS y se añadieron 8 ml de HCl 1 M. Se mantuvo la mezcla en suspensión en una mezcladora rotatoria durante 1 hora a temperatura ambiente. Se centrifugó la fracción insoluble y se recogió el sobrenadante ácido transparente. Esta disolución ácida era estable a temperatura ambiente durante al menos dos semanas.

Reacción de unión

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

Resultados

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

Ejemplo 5

La fusión de D₁₀ con sPHEX aumenta su unión al hueso

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

En cambio, se construyó D₆-sPHEX y se sometió a prueba tras una inyección *in vivo* en animales (tal como se describió en el ejemplo 1 anterior) y no promovió la unión de proteínas recombinantes a hueso (datos no mostrados).

Ejemplo 6

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

Construcción de vectores de expresión que codifican para fosfatasa alcalina soluble recombinante humana, sALP y sALP-D₁₀

Se obtuvo el ADNc de longitud completa humano que codifica para fosfatasa alcalina no específica de tejido (ALP) a partir del ARN poliA de médula ósea (Clonotech) mediante RT-PCR. En resumen, se transcribieron de manera inversa 20 ng de poliA con SuperscriptII® y un oligo dT₁₂₋₁₈ usando el sistema de síntesis de primera cadena (Invitrogen). Se usó directamente una alícuota que representaba 1/20º de la etapa de RT en una reacción de PCR con oligos específicos de ALP (directo 5'-gataaagcaggctctggggtgcacc-3' (SEQ ID NO: 40); inverso 5'-gttgcatctgtcacgggctgtgg-3' (SEQ ID NO: 41)) y el kit enzimático de alta fidelidad Expand® (Roche). Se separó el producto específico de ALP resultante (1644 pb) en y se purificó a partir de un gel de agarosa (1%) usando el kit de extracción de gel Qiaquick® (QIAGEN). Entonces se ligó el ADNc de ALP en el vector pCR4-blunt-TOPO® (Invitrogen), se transformó en bacterias Top10® (Invitrogen) y se identificó un clon positivo mediante PCR de colonias. Se verificó la identidad del ADNc mediante secuenciación de ADN automatizada.

Generación de células HEK293 que secretan de manera constitutiva sALP y sALP-D₁₀

Para inducir la expresión estable de las proteínas sALP y sALP-D₁₀, se transfectaron por separado los vectores pCDNA3-RSV-sALP-NEO y pCDNA3-RSV-sALP-D₁₀-NEO en células HEK-293S usando el kit de transfección de liposomas Lipofectamine-Plus® (Invitrogen). Se seleccionaron células transfectadas añadiendo 800 µg/ml de G418 (Life Technologies) al medio. Para cada transfección, se analizó un conjunto de células resistentes a G-418 para detectar la expresión de sALP o sALP-D₁₀ en los medios de cultivo gastados usando el ensayo enzimático fluorescente de ALP. Los medios condicionados recogidos de las líneas celulares estables se usaron para el estudio de ensayo de unión en el mineral del hueso.

Unión a la fase mineral reconstituida del hueso

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

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

Tal proteína de fusión puede dirigirse directamente a huesos en los que la acumulación de PPi inhibe la mineralización esquelética.

Ejemplo 7

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

Se hicieron crecer células UMR106 hasta la confluencia. Entonces se cultivaron durante otros 7 días en medios que contenían β-glicerofosfato 10 mM para inducir la mineralización. A lo largo de todo este periodo de cultivo de 7 días, se trataron las células con o sin pirofosfato 75 µM (PPi), un inhibidor de la mineralización y un sustrato de fosfatasa alcalina. Para evaluar la capacidad de la fosfatasa alcalina para rescatar la inhibición de la mineralización inducida por PPi, se cultivaron células tratadas con o sin PPi con concentraciones variables de D₁₀-sALP semipurificada producida a partir de HEK293, células de riñón embrionario humano. Se evaluó la mineralización mediante la captación de ⁴⁵Ca. Los parámetros usados para este experimento se presentan en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2 - parámetros usados en D₁₀-ALP sobre la inhibición de la mineralización inducida por PPi

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

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

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

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

10 **Bibliografía**

- 1- Weinberg, JM (2003) An overview of infliximab, etanercept, efalizumab, and alefacept as biologic therapy for psoriasis. *Clin Ther* 25: 2487-2505.
- 15 2- Whyte MP, Valdes R Jr, Ryan LM, McAlisterWH(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.
- 20 3- Whyte MP, Kurtzberg J, McAlister WH, Mumm S, Podgornik MN, Coburn S, Ryan LM, Miller CR, Gottesman GS, Smith AK, Douville J, Waters-Pick B, Armstrong RD, Martin PL (2003) Marrow cell transplantation for infantile hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* 18: 624-636.
- 25 4- Fujisaki J, Tokunaga Y, Takahashi T, Shimojo F, Kimura S, Hata T (1997) Osteotropic drug delivery system (ODDS) based on biphosphonic prodrugs. IV: Effects of osteotropic estradiol on bone mineral density and uterine weight in ovariectomized rats. *J. Drug Targeting* 5: 129-138.
- 5- Uludag H, Gao T, Wohl GR, Kantoci D, Zemicke RF (2000) Bone affinity of a biphosphonate-conjugated protein in vivo. *Biotechnol Prog* 16: 1115-1118.
- 30 6- Sekido T, Sakura N, Higashi Y, Miya K, Nitta Y, Nomura M, Sawanishi H, Morito K, Masamune Y, Kasugai S, Yokogawa K, Miyamoto K-I (2001) Novel drug delivery system to bone using acidic oligopeptides: pharmacokinetic characteristics and pharmacological potential. *J Drug Targeting* 9: 111-121.
- 35 7- Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA (1994) Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J* 300: 723-728.
- 8- Rowe PSN, de Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ, Oudet CL (2000) MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. *Genomics* 67: 54-68.
- 40 9- Gilbert M, Shaw WJ, Long JR, Nelson K, Drobny GP, Giachelli CM, Stayton PS (2000) Chimeric peptides of statherin and osteopontin that bind hydroxyapatite and mediate cell adhesion. *J Biol Chem* 275: 16213-16218.
- 10-Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG (1992) Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bones. *Clin Orthop* 281: 275-294.
- 45 11-Salih E, Ashkar S, Gerstenfeld FC, Glimcher MJ (1997) Identification of the phosphorylated sites of metabolically 32P-labeled osteopontin from cultured chicken osteoblasts. *J Biol Chem* 272: 13966-13973.
- 50 12-Campbell PG, Andress DL (1997) Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-5-(201-218) region regulates hydroxyapatite and IGF-I binding. *Am J Physiol* 273: E1005-E1013.
- 13-Patti JM, House-Pompeo K, Boles JO, Garza N, Gurusiddappa S, Hook M (1995) Critical residues in the ligand-binding site of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding adhesin (MSCRAMM). *J Biol Chem* 270: 12005-12011.
- 55 14-Symersky J, Patti JM, Carson M, House-Pompeo K, Teale M, Moore D, Jin L, Schneider A, DeLucas LJ, Hook M, Narayana SV (1997) Structure of the collagen-binding domain from a *Staphylococcus aureus* adhesin. *Nat Struct Biol* 4: 833-838.

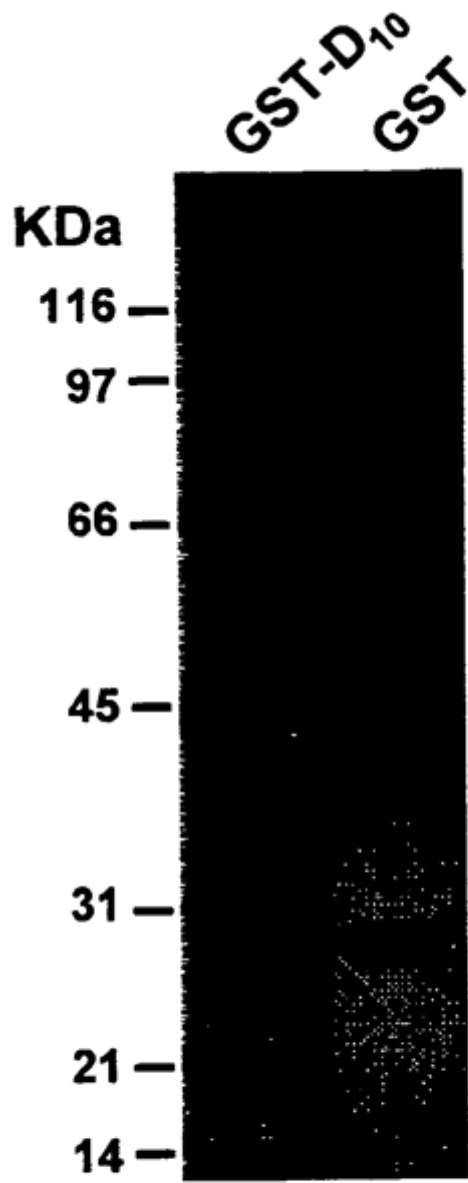


Figura 1

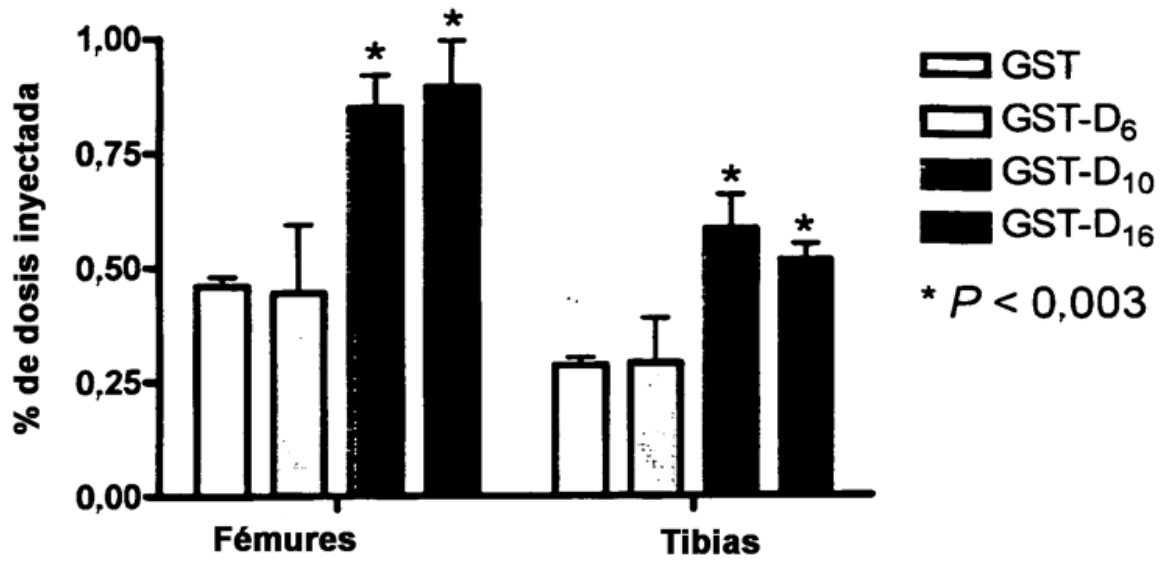


Figura 2

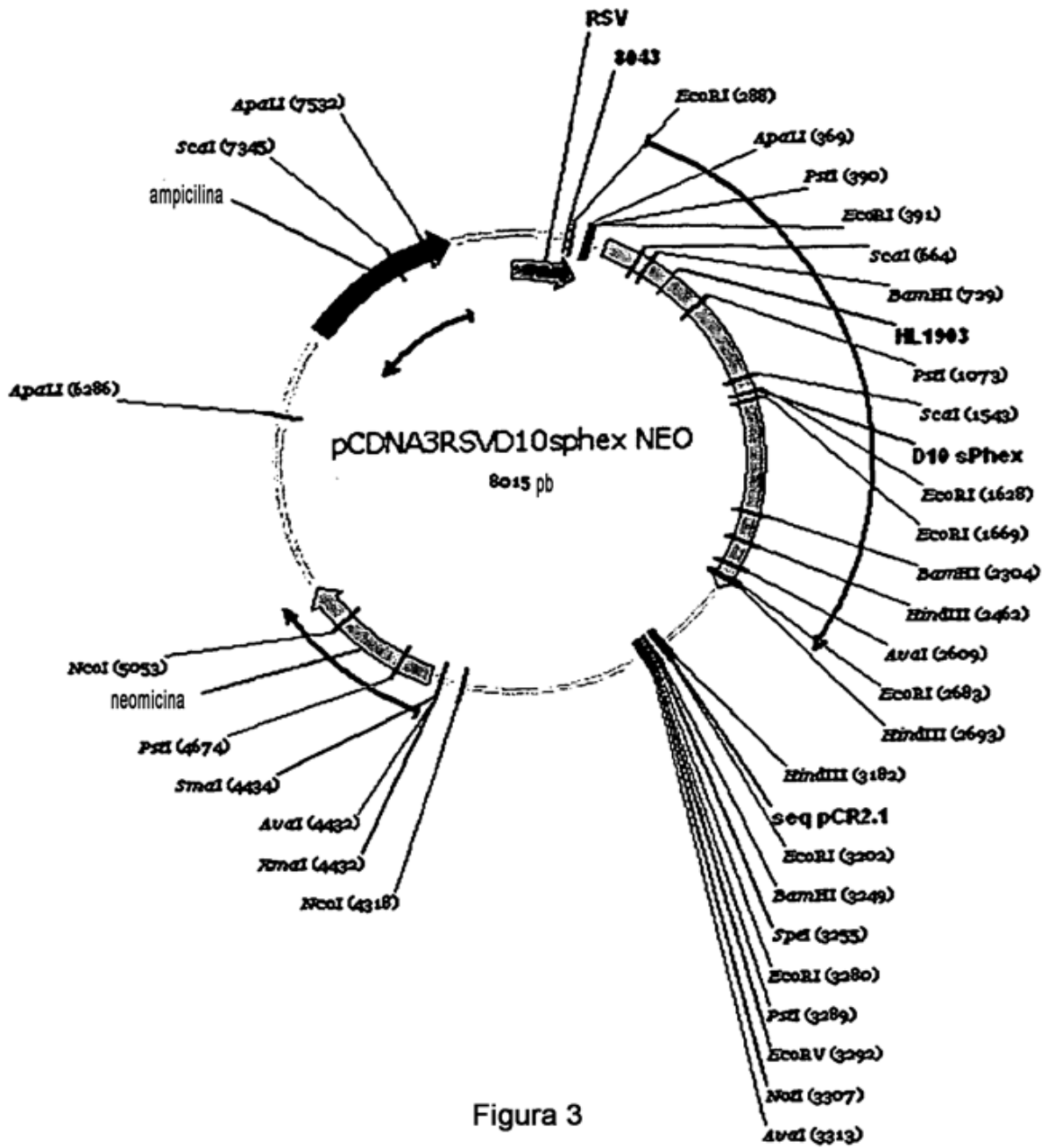


Figura 3

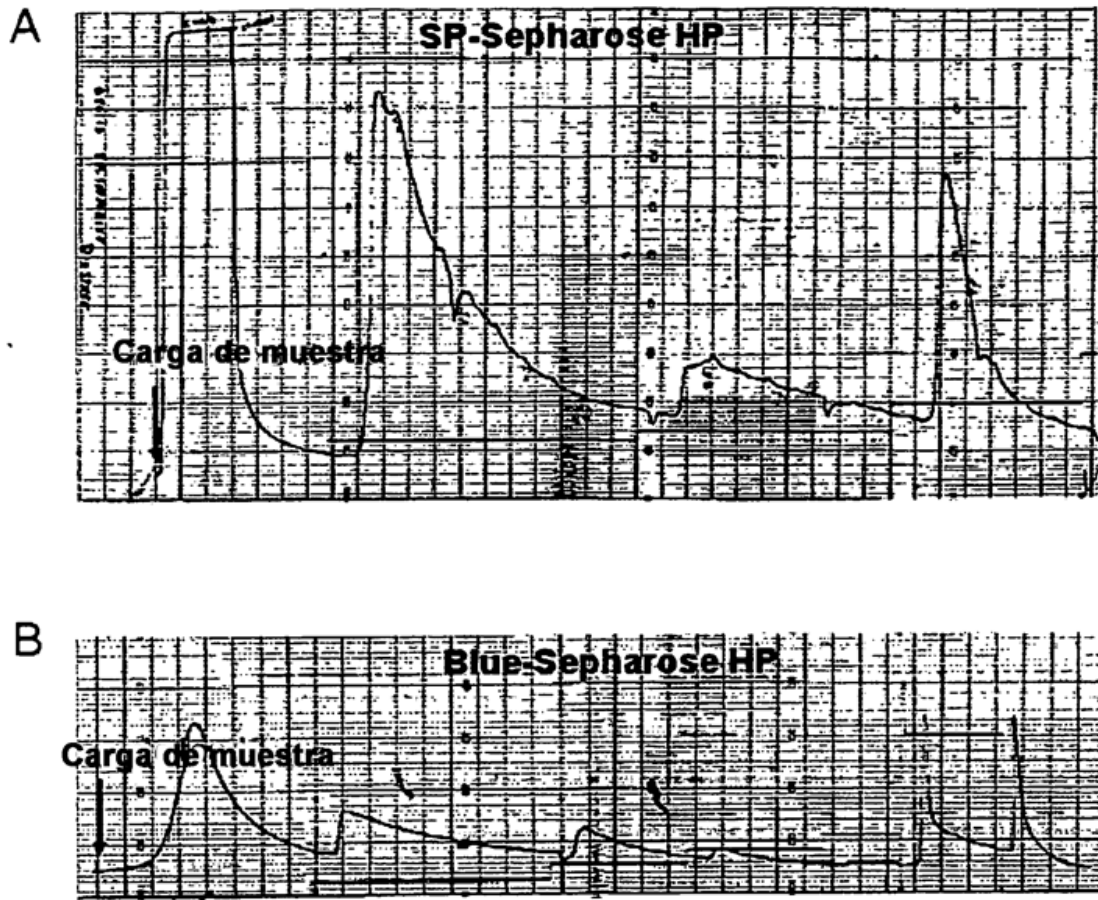


Figura 4

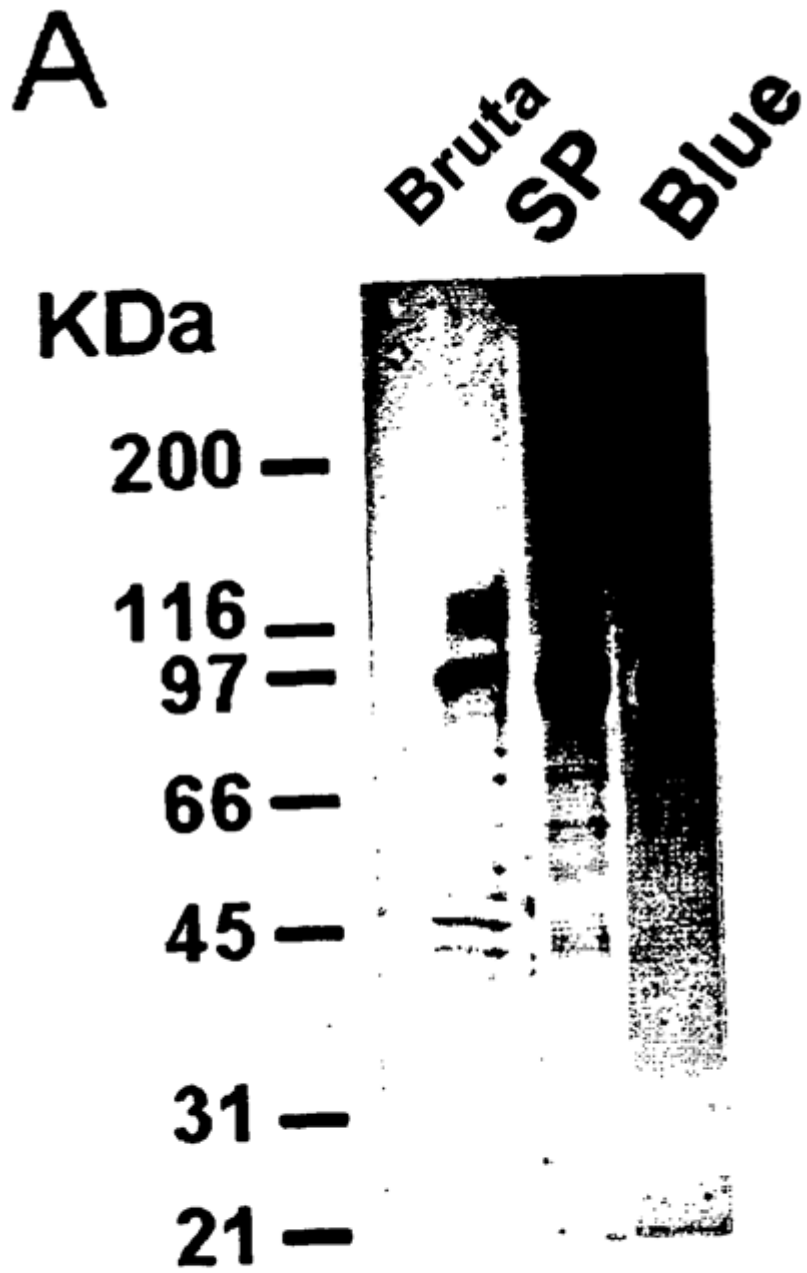


Figura 5

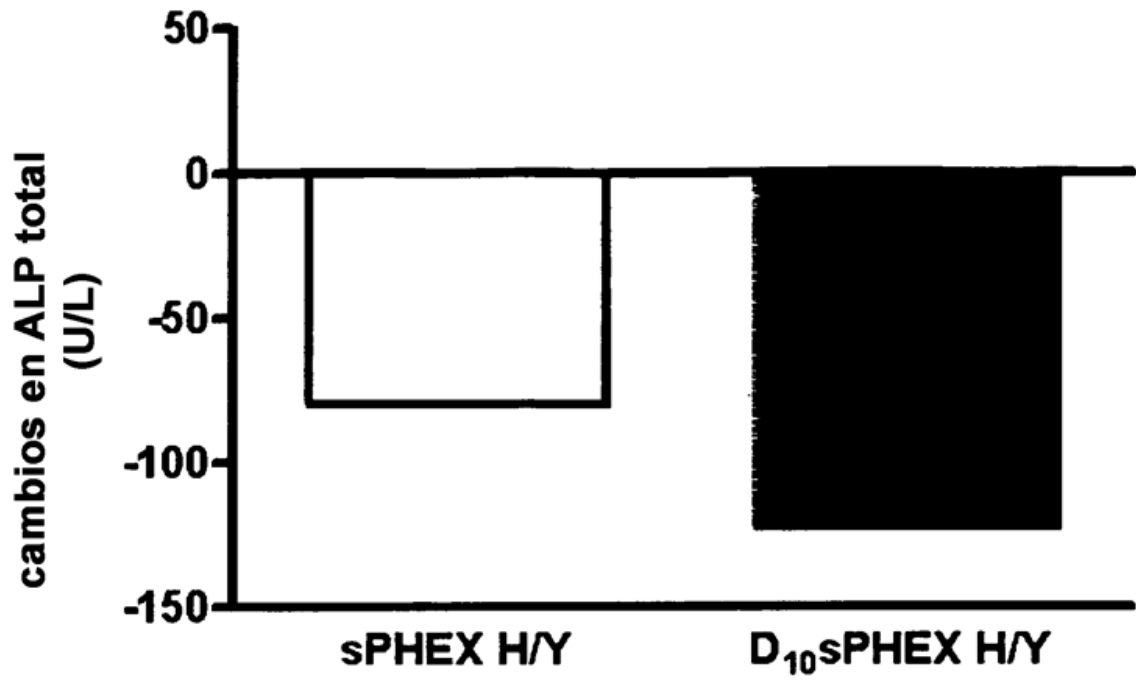


Figura 6

atggaagcagaaacagggagcagcgtggagactggaaagaaggccaacagaggcactcgaattgccctgg
tctgtgttctgctgacagtgatcgctcaacaaacaaccagtcaaggtctcttatccggagatgacgatga
cgatgacgatgacgatgactccggaagtctccaagctaaacaggagtagctgcctgaagccagaatgcatc
gaagcggctgctgccatcttaagtaaagtaaatctgtctgtggatccttgtgataatttcttccggttcg
cttgtgatggctggataagcaataatccaatccccgaagatagccaagctatggggttatccttggct
gagacataatgttgacctcaagttgaaggaacttttgagaaatcaatcagtagaaggcgggacaccgaa
gccatacagaaagccaaaatcctttatctcatcctgcatgaatgagaaagcgattgaaaaagcagatgcca
agccactgctacacatcctacggcattcaccttccgctggcccgtgcttgaatctaataatggccctga
aggggttgggtcagagagaaagttcagccttctgcagacacttgcaacgtttcgtgggtcaatacagcaat
tctgtgttcatccgttctgtatgtgtcccctgatgacaaagcatccaatgaacataatcttgaagctggacc
aagcaacactctcctggcgtgaggggaagactaccttgataacagtagacagaagccaagttatcggga
tgccctttacaagttcatgggtggatactgcccgtgcttttaggagctaacagttccagagcagagcatgac
atgaagtcagtgctcagattggaaattaagatagctgagataatgattccacatgaaaaccgaaccagcg
aggccatgtacaacaaaatgaacatttctgaactgagtgctatgattccccagttcgactggctgggtg
catcaagaaggtcattgacaccagactctacccccatctgaaagacatcagcccctccgagaatgtgggtg
gtccgctcccgcagtagctttaaagatttgtttaggataatagggtctgagagaaagaagaccatgcca
actatttgggtgaggagaatgggttattccagaattccaaaccttagcaggcgtttcagtatagatggct
ggaattctcaagggtaatccaggggaccacaactttgctgcctcaatgggacaaatgtgtaaaactttatt
gaaagtgccctcccttatgttgttggaaagatgtttagtagatgtgtacttccaggaagataagaaggaaa
tgatggaggaattgggtgagggcgcttcgctgggcctttattgacatgctagagaaagaaaatgagtggt
ggatgcaggaacgaaaaggaaagccaaagaaaaggcgagagctgtttggcaaaagtggctatccagag
tttataatgaatgatactcatgttaatgaagacctcaaagctatcaagttttcagaagccgactactttg
gcaacgtcctacaaactcgcaagtattagcacagctctgatttcttctggctaagaaaagccgttccaaa
aacagagtgggtttacaaatccgacgactgtcaatgccttctacagtgcattccaccaaccagatccgattt
ccagcaggagagctccagaagcctttcttttggggaaacagaatatcctcgatctctgagttatggtgcta
taggagtaattgtcggacatgaatttacacatggatttgataataatggtagaaaaatgatataaaatgg
aaacctggatccttgggtggtctactgaatcagaagaaaagtttaaggaaaaaacaaaatgcatgattaac
cagtatagcaactattattggaagaaagctggcttaaatgtcaaggggaagaggaccctgggagaaaata
ttgctgataatggaggcctgcgggaagcttttagggcttacaggaaatggataaatgacagaaggcaggg
acttgaggagcctcttaccaggcatcacattaccaacaaccagctcttcttctgagttatgctcat
gtgaggtgcaattcctacagaccagaagctgcccgagaacaagtccaaattgggtgctcacagtccccctc
agtttaggggtcaatgggtgcaattagtaactttgaagaattccagaaagcttttaactgtccaccaattc
cacgatgaacagaggcatggactcctgcccactctggtag

Figura 7

MEAETGSSVETGKKANRGTRIALVVFVLTVIAQQTTSQGLLSGDDDDDDDDDDSGSLQAKQEYCLKPECI
EAAAAILSKVNLSDPCDNFFRFACDGIWISNNPIPEDMPSYGVYPWLRHNVDLKLEKLEKSI SRRRDTE
AIQKAKILYSSCMNEKAI EKADAKPLLHILRHSPFRWPVLESNIGPEGVWSEKFSLLQTLATFRGQYSN
SVFIRLYVSPDDKASNEHILKLDQATLSLAVREDYLDNSTEAKSYRDALYKFMVDTAVLLGANS SRAEHD
MKSVLRL EIKIAEIMI PHENRTSEAMY NKMNI SELSAMI PQFDWLG YIKKVIDTRLYPHLKDISPENVV
VRVPQYFKDLFRILGSEKKTIANYL VWRMVYSRI PNL SRRFQYRWLEFSRVIQGT TLLPQWDKCVNFI
ESALPYVVGKMFVDVYFQEDKKEMMEELVEGVRWAFIDMLEKENEWMDAGTKRKAKEKARAVLAKVGYPE
FIMNDTHVNEDLKAIKFSEADYFGNVLQTRKYLAQSDFFWLRKAVPKTEWFTNPTTVNAFY SASTNQIRF
PAGELQKPF FFWGTEYPRSLSYGAI GVI VGHEFTHGFDNNGRKYDKNGNLD PWWSTESEEFKEKTKCMIN
QYSNYWKKAGLNVKGRKTLGENIADNGGLREAFRAYRKWINDRRQGLEEPLLPGITFTNNQLFFLSYAH
VRCNSYRPEAAREQVQIGAHSPQFRVNGAISNFEEFQKAFNCPPNSTMNRGMDSCLW

Figura 8

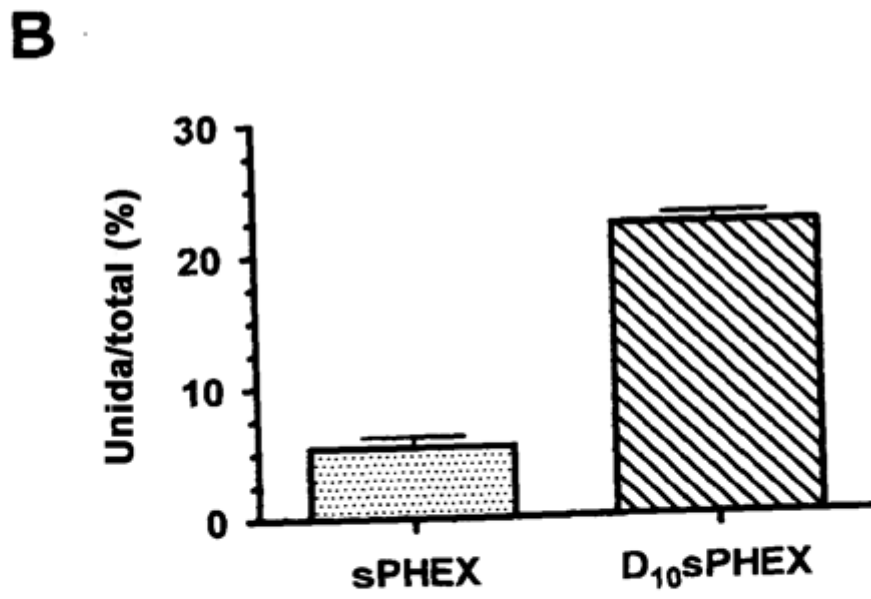
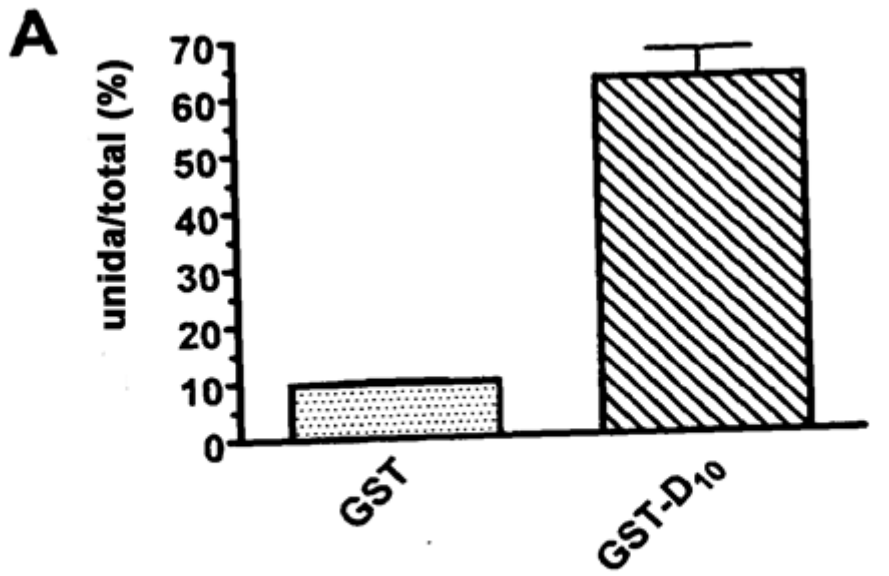


Figura 9

```

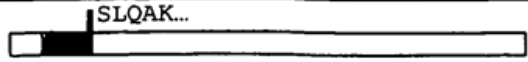
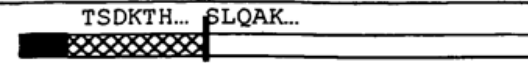
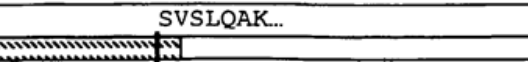
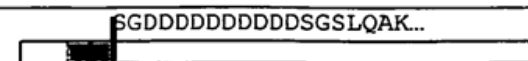
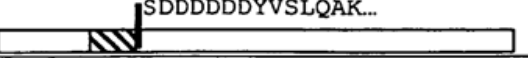
 1 MEAETGSSVE TGKKANRGTR IALVVFVGGT LVLGTILFLV SQGLLSLQAK QEYCLKPECI
 61 EAAAAILSKV NLSVDPCDNF FRFACDGWIS NNPIPEDMPS YGVYPWLRHN VDLKLELLE
121 KSISRRTDTE AIQKAKILYS SCMNEKAIEK ADAKPLLHIL RHSPFRWPVL ESNIGPEGVW
181 SERKFSLLQT LATFRGQYSN SVFIRLYVSP DDKASNEHIL KLDQATLSLA VREDYLDNST
241 EAKSYRDALY KFMVDTAVLL GANSSRAEHD MKSVLRLEIK IAEIMIPHEN RTSEAMYNKM
301 NISELSAMIP QFDWLGYIKK VIDTRLYPHL KDISPSENVV VRVPQYFKDL FRILGSERKK
361 TIANYLVWRM VYSRIPNLSR RFQYRWLEFS RVIQGTFTLL PQWDKCVNFI ESALPYVVGK
421 MFVDVYFQED KKEMMEELVE GVRWAFIDML EKENEWMDAG TKRKAKEKAR AVLAKVGYPE
481 FIMNDTHVNE DLKAIKFSEA DYFGNVLQTR KYLAQSDFFW LRKAVPKTEW FTNPTTVNAF
541 YSASTNQIRF PAGELQKPPF WGTEYPRSL S YGAIGVIVGH EFTHGFDNNG RKYDKNGNLD
601 PWWSTESEEK FKEKTKCMIN QYSNYYWKKA GLNVK GKRTL GENIADNGGL REAFRAYRKW
661 INDRRQGLEE PLLPGITFTN NQLFFLSYAH VRCNSYRPEA AREQVQIGAH SPPQFRVNGA
721 ISNSEEFQKA FNCPPNSTMN RGMDSCLRW

```


Figura 10


SGDDDDDDDDSGSLQAKQEYCLKPECIEAAAAI LSKVNLSVDPCDNFFRFACDGWISNNPI PEDMPSY
GVYPWLRHNVDLKLKELLEKSI SRRRDTEAIQKAKILYSSCMNEKAIEKADAKPLLHILRHSPFRWPVLE
SNIGPEGVWSEKFSLLQTLATFRGQYSNSVFIRLYVSPDDKASNEHILKLDQATLSLAVREDYLDNSTE
AKSYRDALYKFMVDTAVLLGANS SRAEHDMKSVLRLEIKIAEIMI PHENRTSEAMYNKMNI SELSAMI PQ
FDWLG YIKKVIDTRLYPHLKDISPSENVVVRVPQYFKDLFRILGSEKKTIANYLWVRMVYSRI PNL SRR
FQYRWLEFSRVIQGT TTTLLPQWDKCVNFIESALPYVVGKMFVDVYFQEDKKEMMEELVEGVRWAFIDMLE
KENEWMDAGTKRKAKEKARAVLAKVGYPEFIMNDTHVNEDLKAIFSEADYFGNVLQTRKYLAQSDFFWL
RKAVPKTEWFTNPTTVNAFY SASTNQIRFPAGELQKPF FWGTEYPRSLSYCAIGVIVGHEFTHGFDNNGR
KYDKNGNLD PWWSTESEEKFKKTCMINQYSNYWKKAGLNVKGKRTLGENIADNGGLREAFRAYRKWI
NDRRQGLEEPLPGITFTNNQLFFLSYAHVRCNSYRPEAAREQVQIGAHSPQFRVNGAISNFEEFQKAF
NCPNSTMNRGMDSCRLW

Figura 11


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

 : Representa el dominio transmembrana mutado de PHEX.

 : Representa el péptido señal de IgG1 humana.

 : Representa los dominios bisagra de cadena pesada de IgG1 humana, CH2 y CH3.

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

 : Sitio de escisión de furina.


 : Sitio de escisión de peptidasa señal.

Figura 12

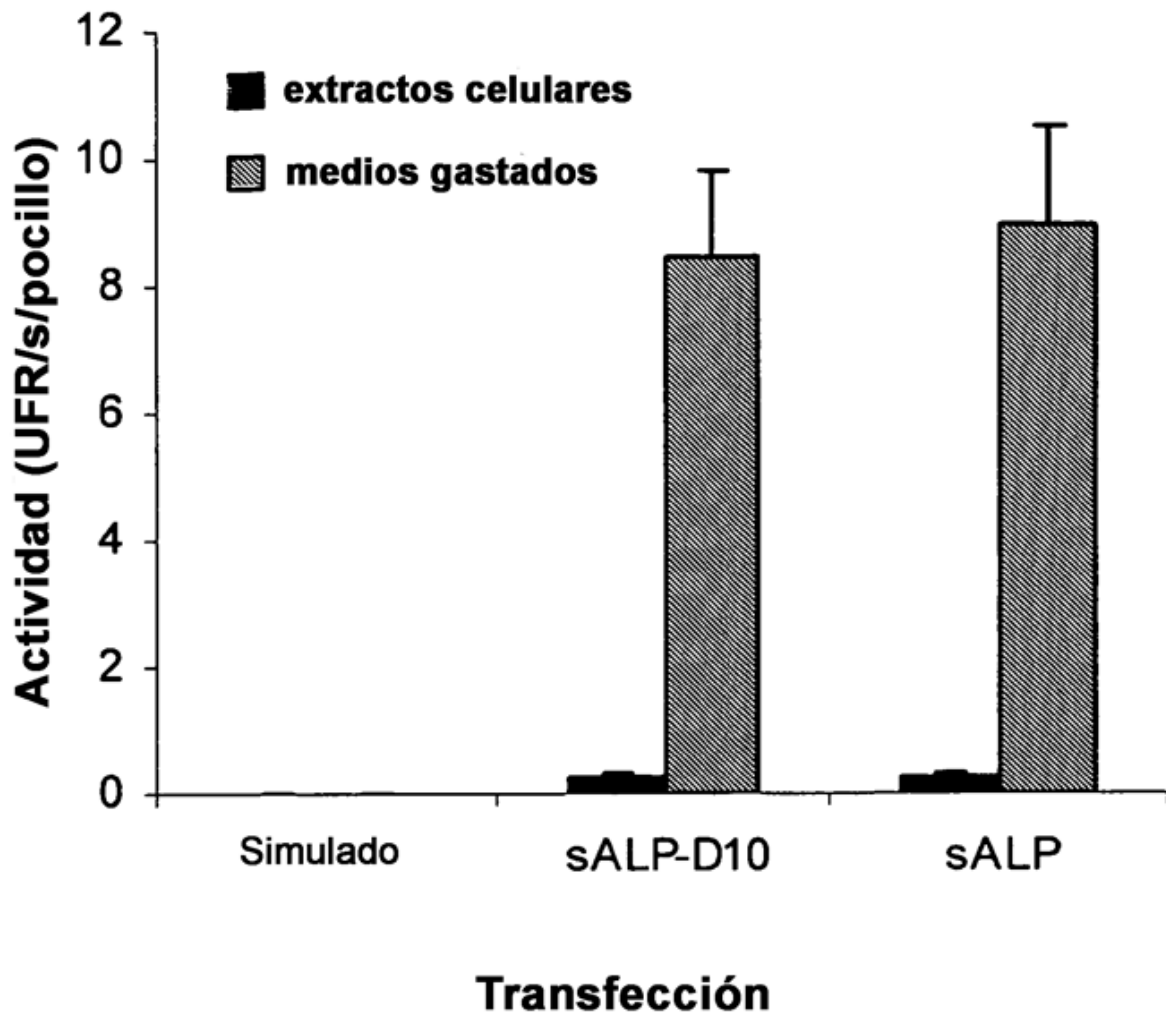


Figura 13

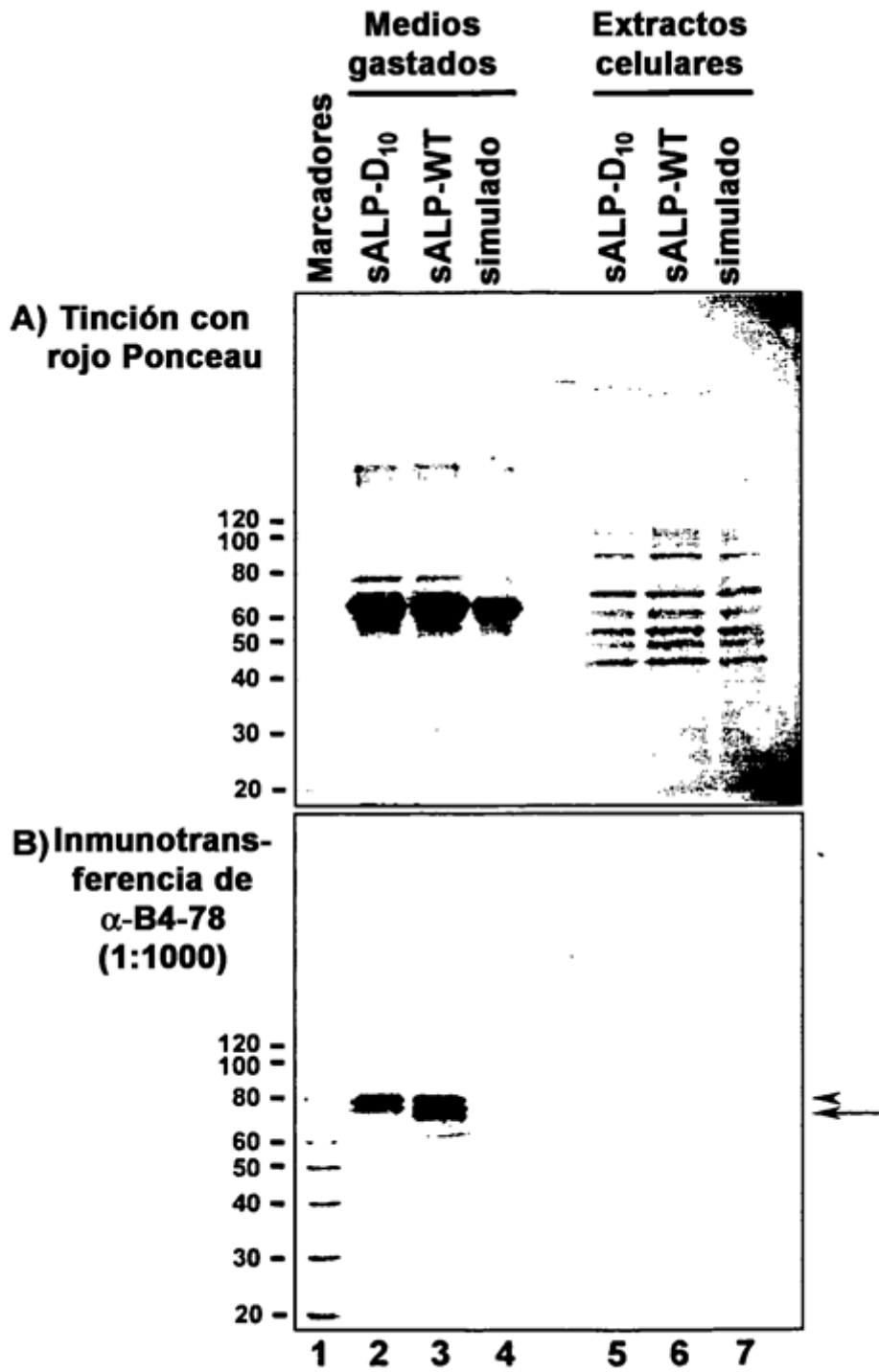


Figura 14

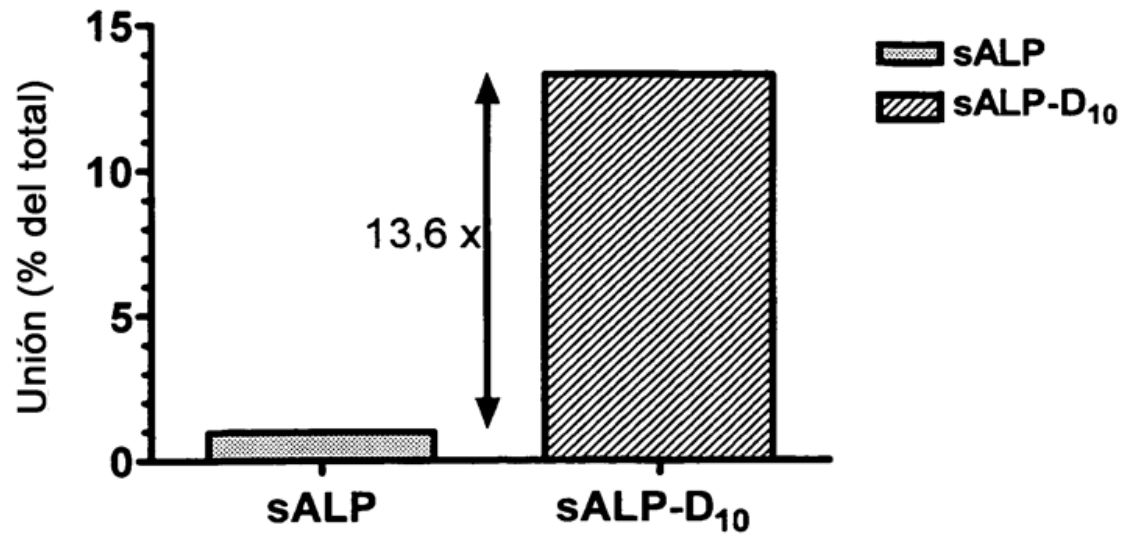


Figura 15

A

```

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

B

```

1   MISPFVLVLAI GTCLTNSLVP EKEKDPKYWR DQAQETLKYA LELQKLNTNV
51  AKNVIMFLGD  GMGVSTVTAA RILKQLHHN PGEETRLEMD KFPFVALSKT
101 YNTNAQVPDS  AGTATAYLCG VKANEGTVGV SAATERSRCN TTQGNVTSI
151 LRWAKDAGKS  VGIVTTTRVN HATPSAAYAH SADRWDYSDN EMPPEALSQG
201 CKDIAYQLMH  NIRDIDVIMG GGRKMYPKN KTDVEYESDE KARGTRLDGL
251 DLVDTWKSFK  PRYKXSHFIW NRTELLTLDP HNVVDYLLGLF EPGDMQYELN
301 RNNVTDPSLS  EMVVVAIQIL RKNPKGFFLL VEGGRIDHGH HEGKAKOALH
351 EAIVMDRAIG  QAGSLTSSSE TLTVVVTADHS HVFTFGGYTP RGNSIFGLAP
401 MLSDTDKKPF  TAILYNGPG  YKVVGEREN VSMVDYAHNN YQAQSAVPLR
451 HETHGGEDVA  VFSKGPMAHL LHGVHEQNYV PHVMAYAACI GANLGHCAPA
501 SS
    
```

Figura 16

A

```

BamHI
-----
 1  GGATCCACCA TGATTTCACC ATTCTTAGTA CTGGCCATTG GCACCTGCCT TACTAACTCC TTAGTGCCAG
71  AGAAAGAGAA AGACCCCAAG TACTGGCGAG ACCAAGCGCA AGAGACACTG AAATATGCCC TGGAGCTTCA
141 GAAGCTCAAC ACCAACGTGG CTAAGAATGT CATCATGTTC CTGGGAGATG GGATGGGTGT CTCCACAGTG
211 ACGGCTGCCC GCATCCCAA GGGTCAGCTC CACCACAACC CTGGGGAGGA GACCAGGCTG GAGATGGACA
281 AGTTCCCTT CGTGGCCCTC TCCAAGACGT ACAACACCAA TGCCCAGGTC CCTGACAGCG CCGGCACCGC
351 CACCGCCTAC CTGTGTGGG TGAAGGCCAA TGAGGGCACC GTGGGGGTAA GCGCAGCCAC TGAGCGTTCC
421 CGGTGCAACA CCACCCAGGG GAACGAGGTC ACCTCCATCC TGGCTGGGC CAAGGACGCT GGGAAATCTG
491 TGGGCATTGT GACCACCACG AGAGTGAACC ATGCCACCCC CAGCGCCGCC TACGCCACT CGGCTGACCG
561 GGACTGGTAC TCAGACAACG AGATGCCCCC TGAGGCCTTG AGCCAGGGCT GTAAGGACAT CGCCTACCAG
631 CTCATGCATA ACATCAGGGA CATTGACGTG ATCATGGGGG GTGGCCGGAA ATACATGTAC CCCAAGAATA
701 AAATGATGT GGAGTATGAG AGTGACGAGA AAGCCAGGGG CACGAGGCTG GACGGCCTGG ACCTCGTTGA
771 CACCTGGAAG AGCTTCAAAC CGAGATACAA GCATCCCAC TTCATCTGGA ACCGCACGGA ACTCCTGACC
841 CTTGACCCCC ACAATGTGGA CTACCTATTG GGTCTCTTCG AGCCAGGGGA CATGCAGTAC GAGCTGAACA
911 GGAACAACGT GACGGACCCG TCACTCTCGG AGATGGTGGT GGTGGCCATC CAGATCCTGC GGAAGAACCC
981 CAAAGGCTTC TTCTTGCTGG TGGAAAGGAG CAGAATTGAC CACGGGCACC ATGAAGGAAA AGCCAAGCAG
1051 GCCCTGCATG AGGCGGTGGA GATGGACCGG GCCATCGGGC AGGCAGGCAG CTTGACCTCC TCGGAAGACA
1121 CTCTGACCGT GGTCACTGCG GACCATTCCC ACGTCTTCAC ATTTGGTGGA TACACCCCCC GTGGCAACTC
1191 TATCTTTGGT CTGGCCCCCA TGCTGAGTGA CACAGACAAG AAGCCCTTCA CTGACCCTCT GTATGGCAAT
1261 GGGCCTGGCT ACAAGGTGGT GGGCGGTGAA CGAGAGAATG TCTCCATGGT GGACTATGCT CACAACAAC
1331 ACCAGGCGCA GTCTGCTGTG CCCCTGCGCC ACGAGACCCA CGGCGGGGAG GACGTGGCCG TCTTCTCAA
1401 GGGCCCATG GCGCACCTGC TGCACGGCGT CCACGAGCAG AACTACGTCC CCCACGTGAT GGGGTATGCA
1471 GCCTGCATCG GGGCCAACCT CGGCCACTGT GTCCTGCCA GCTCGGATGA CGACGATGAT GACGATGAT

XbaI
-----
1541 ACGACTAGTC TAGA
    
```

B

```

 1  MISPFVLAI GTCLTNSLVP EKEKDPKYWR DQAQETLKYA LELQKLNTNV
51  AKNVIMFLGD GMGVSTVTAA RILKGQLHHN PGEETRLEMD KFPFVALSKT
101 YNTNAQVPDS AGTATAYLCG VKANEGTVGV SAATERSRCN TTQGNEVTSI
151 LRWAKDAGKS VGIVTTRVN HATPSAAYAH SADRWDYSDN EMPPEALSQG
201 CKDIAYQLMH NIRDIDVIMG GGRKYMYPKN KTDVEYESDE KARGTRLDGL
251 DLVDTWKSFK PRYKHSFIW NRTELLTLDP HNVLYLLGLF EPGDMQYELN
301 RNNVTDPSLS EMVVVAIQIL RKNPKGFLL VEGGRIDHGH HEGKAKQALH
351 EAVEMDRAIG QAGSLTSSD TLTVVADHS HVFTFGGYTP RGNISIFGLAP
401 MLSDTDKKPF TAILYGNPG YKVVGEREN VSMVDYAHNN YQAQSAVPLR
451 HETHGGEDVA VFSKGPMAHL LHGVHEQNYV PHVMAYAACI GANLGHCAPA
501 SSDDDDDDDD DD
    
```

Figura 17

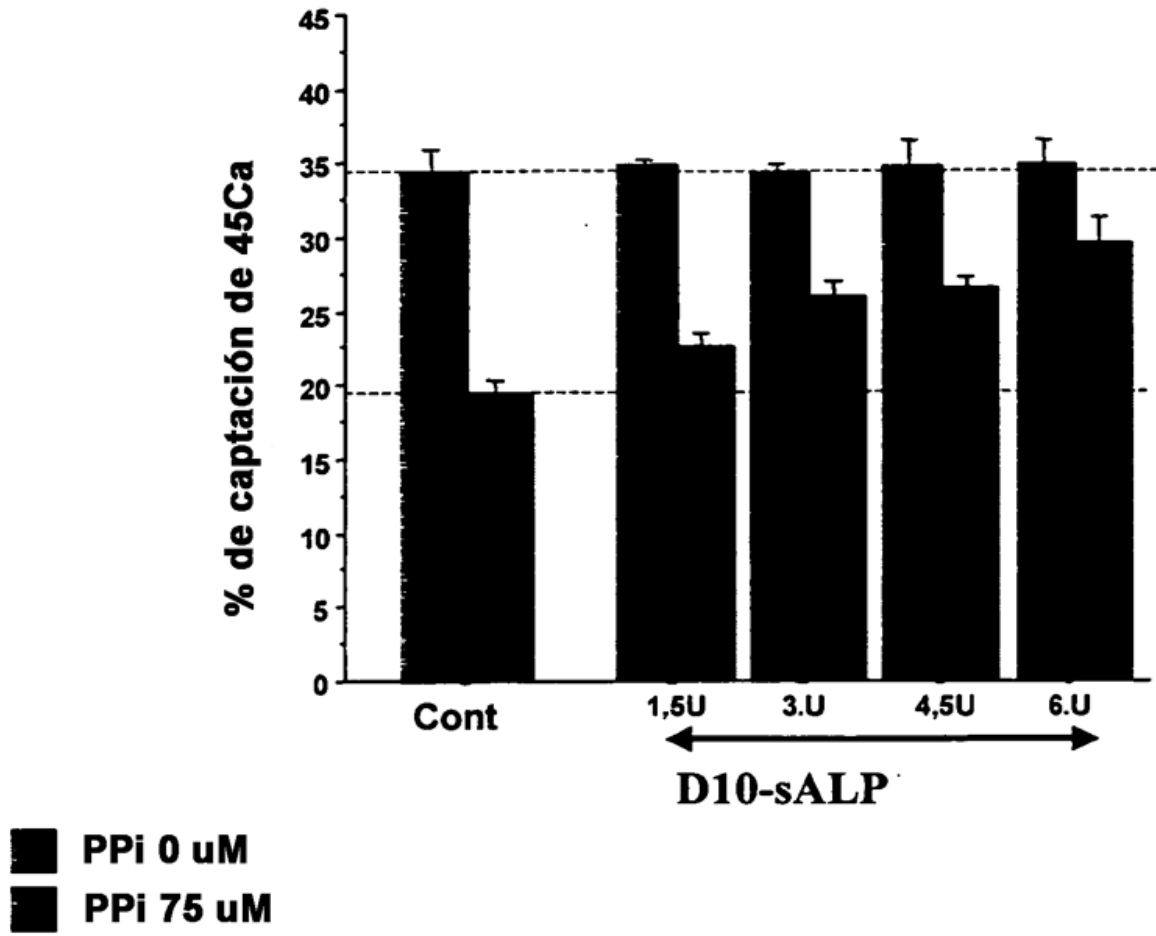


Figura 18