

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 546**

51 Int. Cl.:
C12N 15/55 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08757088 .3**
96 Fecha de presentación: **12.05.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2158319**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2010**

54 Título: **Fosfatasa alcalina dirigida al hueso, kits y métodos de uso de la misma**

30 Prioridad:
11.05.2007 US 917589 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2012

73 Titular/es:
**Enobia Canada Limited Partnership
2901, Rachel Street East, Suite 23
Montreal, QC H1W 4A4 , CA**

72 Inventor/es:
**CRINE, Philippe;
BOILEAU, Guy;
LOISEL, Thomas, P.;
LEMIRE, Isabelle;
LEONARD, Pierre;
HEFT, Robert y
LANDY, Hal**

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 380 546 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

Fosfatasa alcalina dirigida al hueso, kits y métodos de uso de la misma

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a fosfatasa alcalina dirigida al hueso, a kits y métodos de uso de la misma.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La hipofosfatasa (HPP) es una forma rara heredable de raquitismo u osteomalacia (Whyte 2001), con una incidencia tan grande como 1 por 2.500 nacimientos en menores canadienses (Greenberg, 1993), y de 1 por 100.000 nacimientos en la población general para la forma más grave de la enfermedad. Son más prevalentes las formas más leves. Este "error congénito del metabolismo" está provocado por una mutación o mutaciones de pérdida de función en el gen (*ALPL*) que codifica la isozima no específica de tejidos de fosfatasa alcalina (TNALP; también conocida como ALP de tipo hepático/óseo/renal) (Weiss et al. 1988; Henthorn et al. 1992a; Henthorn et al. 1992b; Zurutuza et al. 1999; Millán 1995). La característica bioquímica distintiva es actividad subnormal de ALP en suero (hipofosfatemia), que conduce a niveles sanguíneos y/o de orina elevados de tres sustratos de fosfocompuestos: pirofosfato inorgánico (PP_i), fosfoetanolamina (PEA), y 5'-fosfato de piridoxal (PLP) (Whyte 1994).

La HPP presenta un intervalo notable de gravedad, que oscila desde (en orden desde la más grave hasta la más leve) formas perinatales, infantil, de la niñez, del adulto, y odontohipofosfatasa, clasificada históricamente según la edad en el momento del diagnóstico (Whyte 2001). Puede haber una ausencia casi completa de mineralización ósea *in útero* con alumbramiento de un mortinato, o fracturas espontáneas y enfermedad dental que aparece por primera vez en la vida adulta. La hipofosfatasa perinatal (letal) es expresada *in útero*, y puede ser la causa de alumbramiento de un mortinato. Algunos neonatos pueden sobrevivir varios días, pero sufren insuficiencia respiratoria aumentada, debido a la enfermedad hipoplásica y raquítica del pecho. En HPP infantil, diagnosticada antes de los 6 meses de edad, el desarrollo postnatal parece normal hasta el comienzo de una mala alimentación, una ganancia de peso inadecuada, y la aparición de raquitismo. Los rasgos radiológicos son característicos, y muestran mineralización esquelética alterada, algunas veces con desmineralización esquelética progresiva, conduciendo a fracturas de las costillas y deformidad del pecho. La hipofosfatasa de la niñez también tiene una expresión clínica muy variable. La pérdida prematura de dientes de leche resulta de aplasia, hipoplasia o displasia de cemento dental que conecta la raíz del diente con el ligamiento periodontal. El raquitismo provoca estatura corta, y las deformidades esqueléticas pueden incluir piernas arqueadas, alargamiento de las muñecas, rodillas y tobillos como resultado de metáfisis acampanada. La HPP del adulto se presenta habitualmente durante la edad intermedia, aunque frecuentemente hay una historia de raquitismo y/o pérdida prematura de dientes, seguido de una buena salud durante la adolescencia y la vida del adulto joven. Las fracturas recurrentes por estrés de metatarsianos son habituales, y la deposición de pirofosfato de calcio dihidratado provoca ataque de artritis y artropatía por pirofosfato. La odontohipofosfatasa se diagnostica cuando la única anomalía clínica es enfermedad dental, y los estudios radiológicos incluso biopsias óseas no revelan signos de raquitismo u osteomalacia.

Las formas clínicas más graves de hipofosfatasa se heredan habitualmente como rasgos recesivos autosómicos, mostrando los padres de tales pacientes niveles subnormales de actividad de AP sérica (Whyte 2001). Para las formas más leves de hipofosfatasa, es decir, de adulto y odontohipofosfatasa, también se ha documentado un patrón de herencia dominante autosómico (Whyte 2001).

En el esqueleto sano, TNALP es una ectoenzima presentada sobre la superficie de la membrana plasmática de osteoblastos y condrocitos, incluyendo en las membranas de sus vesículas de la matriz (MVs) desprendidas (Ali et al. 1970; Bernard 1978), en las que la enzima está particularmente enriquecida (Morris et al. 1992). La deposición de hidroxiapatita durante la mineralización ósea se inicia normalmente dentro de la luz de estas MVs (Anderson et al. 2005a). La microscopía electrónica ha demostrado que las MVs deficientes en TNALP de pacientes con HPP afectados gravemente y ratones *Akp2*^{-/-} (un modelo de ratón carente de TNALP; véase más abajo) contienen cristales de hidroxiapatita, pero que la propagación de cristales extravesiculares parece retardada (Anderson 1997; Anderson 2004). Este defecto se atribuye a la acumulación extracelular de PP_i, un potente inhibidor de la calcificación (Meyer 1984) debido a deficiencia de la actividad de TNALP (Hessle et al. 2002; Harmey et al. 2004; Harmey et al. 2006).

Cuando PP_i está presente a concentraciones casi fisiológicas, en el intervalo de 0,01-0,1 mM, PP_i tiene la capacidad para estimular la mineralización en fémures de polluelos cultivados en órganos (Anderson y Reynolds 1973) y también mediante MVs de rata aisladas (Anderson et al. 2005b), mientras que, a concentración por encima de 1 mM, PP_i inhibe la formación de fosfato cálcico mineral revistiendo los cristales de hidroxiapatita, evitando así el crecimiento de cristales minerales y la autonucleación proliferativa. De este modo, PP_i tiene un doble papel fisiológico; puede funcionar como un promotor de la mineralización a concentraciones bajas, pero como un inhibidor de la mineralización a concentraciones más altas. Se ha demostrado que TNALP hidroliza el inhibidor de la mineralización PP_i para facilitar la precipitación y crecimiento de mineral (Rezende et al. 1998). Estudios recientes usando los ratones *Akp2*^{-/-} han indicado que el papel principal de TNALP *in vivo* es restringir el tamaño del conjunto de PP_i extracelular para permitir la mineralización esquelética apropiada (Hessle et al. 2002; Harmey et al. 2004).

La gravedad de la hipofosfatasa es variable, y está modulada por la naturaleza de la mutación de TNALP. Se ha encontrado que las mutaciones sustitutivas en la vecindad de sitios activos de enzimas, la interfaz del homodímero, el dominio corona, el brazo aminoterminal y el sitio de unión de calcio afectan todos ellos a la actividad catalítica de TNALP (Zurutuza et al. 1999). Adicionalmente, se ha demostrado que otras mutaciones sustitutivas, sin sentido, de desplazamiento del marco y del sitio de empalme conducen a proteínas mutantes aberrantes o defectos de tráfico intracelulares que conducen a actividad subnormal en la superficie celular. La multitud de mutaciones y el hecho de que la heterocigosidad del compuesto sea un suceso habitual en hipofosfatasa también explican la variable expresividad e incompleta penetrancia observadas a menudo en esta enfermedad (Whyte 2001).

El progreso en la forma humana de la enfermedad se beneficia enormemente de la existencia de los ratones carentes de TNALP (Akp2^{-/-}) como modelo de animal. Estos ratones Akp2^{-/-} fenocopian notablemente bien HPP infantil, puesto que nacen con un esqueleto normalmente mineralizado, pero desarrollan raquitismo radiográficamente visible en alrededor de 6 días, y mueren entre los días 12 y 16 sufriendo una grave hipomineralización esquelética y episodios de apnea y ataques epilépticos atribuibles a alteraciones en el metabolismo de PLP (vitamina B₆) (Waymire et al. 1995; Narisawa et al. 1997; Fedde et al. 1999; Narisawa et al. 2001).

Se ha demostrado que algunas mutaciones de sitio activo de TNALP afectan a la capacidad de la enzima para metabolizar PPI o PLP de forma diferente (Di Mauro et al. 2002). Tanto PLP como PPI son sustratos naturales confirmados de TNALP, y las anomalías en el metabolismo de PLP explican los ataques epilépticos observados en ratones Akp2^{-/-} (Waymire et al. 1995; Narisawa et al. 2001), mientras que las anomalías en el metabolismo de PPI explican el fenotipo esquelético en este modelo de ratón de hipofosfatasa (Hessle et al. 2002; Anderson et al. 2004; Harmey et al. 2004; Harmey et al. 2006; Anderson et al. 2005a).

No hay ninguna terapia médica confirmada para HPP. Los informes de casos de terapia de sustitución enzimática (ERT) usando infusiones intravenosas (i.v.) de plasma rico en TNALP de pacientes con enfermedad ósea de Paget y ALP placentaria purificada han descrito la imposibilidad de salvar lactantes afectados (Whyte et al. 1982; Whyte et al. 1984). En otro estudio similar, Weninger et al. (Weninger et al. 1989) intentaron una ERT para un niño prematuro gravemente afectado con hipofosfatasa mediante infusiones de TNALP hepática humana purificada. El tratamiento (1,2 UI/kg/min.) comenzó a la edad de tres semanas y se repitió a intervalos semanales hasta la edad de diez semanas, cuando el niño murió. Las muestras de TNALP se diluyeron con 10 ml de disolución salina fisiológica, y se infundieron a lo largo de 30 minutos vía un catéter arterial umbilical. No se observaron efectos secundarios tóxicos o alérgicos. La actividad de TNALP sérica aumentó desde 3 UI/l antes del tratamiento hasta un nivel máximo de 195 UI/l, con una semivida entre 37 y 62 horas. Sin embargo, los estudios radiográficos secuenciales no mostraron mejora de la mineralización ósea (Weninger et al. 1989).

Parece que la actividad de ALP se debe aumentar no en la circulación, sino en el propio esqueleto. Esta hipótesis está apoyada por respuestas aparentemente beneficiosas de dos niñas con HPP de lactante tras el trasplante de células de médula, en el que se introdujeron células que contienen TNALP a través del esqueleto (Whyte et al. 2003). De este modo, parece que hay una necesidad de proporcionar TNALP activa al esqueleto de estos pacientes. Informes recientes han indicado que secuencias de poliaspartato confieren propiedades de ecotaxia del hueso a TNALP recombinante (documento 2005/103263 de Crine et al.; Nishioka et al. 2006). El documento WO 2005/103263 describe tratamientos que incluyen sALP fusionada a D10, y su uso en sustitución enzimática en HPP.

Un informe reciente mostró que la forma mutada de TNALP R450C (aunque Nasu et al. se refiere a una mutación R433C, su numeración se aplica a la proteína madura y no a aquella que comprende el péptido señal) produce una proteína que tiene una estructura dímera unida por un puente de disulfuro entre los restos de cisteína en la posición 450 de cada subunidad, que inhibió fuertemente su actividad de fosfatasa alcalina. Nasu et al. concluyeron que la pérdida de función resulta del puente de disulfuro entre cadenas, y es la base molecular para la hipofosfatasa letal asociada con R450C (Nasu et al. 2006).

La presente descripción se refiere a un número de documentos, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

SUMARIO DE LA INVENCION

Dadas las actuales limitaciones en el manejo y tratamiento clínicos de pacientes con HPP, se necesita un tratamiento alternativo y eficiente. En consecuencia, la presente invención proporciona una terapia de sustitución enzimática eficiente para el tratamiento de HPP.

Según el conocimiento del solicitante, y en oposición a los esfuerzos previos de la terapia de sustitución enzimática en ratones carentes de TNALP o lactantes con HPP, en la que TNALP u otras isozimas de ALP se suministraron intravenosamente, la presente invención señala la primera vez en la que se ha documentado que se produce una resolución casi completa de los cambios clínicos radiográficos y bioquímicos con la sustitución enzimática sola.

sALP dirigida al hueso

La composición de la presente invención dirigida al hueso comprende una proteína de fusión que incluye, en orden

desde el lado amino hasta el lado carboxílico, una sALP, un espaciador, y un péptido cargado negativamente dirigido al hueso, en la que el espaciador comprende una región de fragmento cristalizable (Fc), y el péptido es un poliaspartato o un poliglutamato Wn, en el que n = 10-16, y en la que la sA ALP consiste en los restos de aminoácidos 18-502 de Sec ID No. 8.

5 Hay cuatro isozimas conocidas de ALP, a saber, la fosfatasa alcalina no específica de tejidos, descrita posteriormente más abajo, la fosfatasa alcalina placentaria (PALP) (por ejemplo, [NP_112603], [NP_001623]), la fosfatasa alcalina de células germinales (GCALP) (por ejemplo, [P1D696]) y la fosfatasa alcalina intestinal (por ejemplo, [NP_001622]). Estas enzimas poseen una estructura tridimensional muy similar. Cada uno de sus sitios catalíticos contiene cuatro dominios de unión a metal para iones metálicos necesarios para la actividad enzimática, incluyendo dos Zn y un Mg. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de monoésteres de ácido fosfórico, y también catalizan una reacción de transfosforilación en presencia de concentraciones elevadas de aceptores de fosfato. Se ha demostrado en particular que PALP es fisiológicamente activa frente a fosfoetanolamina (PEA), pirofosfato inorgánico (PPI) y 5'-fosfato de piridoxal (PLP), siendo estos tres una sustancia natural conocida para TNALP (Whyte, 1995). En la Figura 30 se presenta un alineamiento entre estas isozimas.

15 TNALP

Como se indica anteriormente, TNALP es una proteína unida a membrana, anclada a través de un glucolípido a su C-terminal (Swiss-Prot, P05186). Este anclaje glucolipídico (GPI) se añade post-traduccionalmente después de la eliminación de un extremo C-terminal hidrófobo que sirve tanto como un anclaje de membrana temporal así como también como una señal para la adición del GPI. Por tanto, la TNALP humana soluble usada en todos los Ejemplos más abajo comprende una TNALP en la que el primer aminoácido de la secuencia C-terminal hidrófoba, a saber, alanina, está sustituido por un codón de parada. La TNALP soluble (denominada aquí sTNALP) así formada contiene todos los aminoácidos de la forma anclada nativa de TNALP necesarios para la formación del sitio catalítico, pero carece del anclaje de membrana GPI. La TNALP conocida incluye TNALP humana TNALP [NP-000469, AAI10910, AAH90861, AAH66116, AAH21289, AAI26166]; TNALP de mono [XP-001109717]; TNALP de rata [NP_037191]; TNALP de perro [AAF64516]; TNALP de cerdo [AAN64273], de ratón [NP_031457], bovina [NP_789828, NP_776412, AAI18209, AAC33858], y de gato [NP_001036028].

La composición descrita dirigida al hueso engloba secuencias que satisfacen una secuencia de consenso derivada del dominio extracelular de ALP de isozimas de ALP humana y de TNALPs funcionales conocidas (humana, de ratón, de rata, bovina, de gato y de perro). Como se usa aquí, la expresión "dominio extracelular" se refiere a cualquier porción extracelular funcional de la proteína nativa (es decir, sin la señal peptídica). Se ha demostrado que sTNALP recombinante que retiene los aminoácidos originales 1 a 501 (18 a 501 cuando se segrega) (véase Oda et al., J. Biochem 126: 694-699, 1999), los aminoácidos 1 a 504 (18 a 504 cuando se segrega) (patente US 6.905.689 de Bemd et al.) y los aminoácidos 1 a 505 (18-505 cuando se segrega) (documento US 2007/0081984 de Tomatsu et al.), son enzimáticamente activas. Los ejemplos presentados aquí también muestran que una sTNALP recombinante que retiene los aminoácidos 1 a 502 (18 a 502 cuando se segrega) (Figura 3) de la TNALP original es enzimáticamente activa. Esto indica que los restos de aminoácidos se pueden eliminar del extremo C-terminal de la proteína nativa sin afectar a su actividad enzimática. Según la presente invención, la fosfatasa alcalina dirigida al hueso comprende una sALP, en la que la sALP consiste en los restos de aminoácidos 18-502 de Sec ID No. 8.

La Tabla 1 más abajo proporciona una lista de 194 mutaciones que se sabe que provocan HPP. Se describe que en los polipéptidos de la presente invención dirigidos al hueso, la secuencia de ALP no incluye ninguna de estas mutaciones.

Por tanto, en las sALPs descritas, usando la numeración de una secuencia de consenso derivada de un alineamiento de diversas TNALPs y de isozimas de ALP humana, el aminoácido en la posición 22 no es un resto de fenilalanina; el aminoácido en la posición 33 (posición 11 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de cisteína; el aminoácido en la posición 38 (posición 16 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de valina; el aminoácido en la posición 42 (posición 20 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de prolina; el aminoácido en la posición 45 (posición 23 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de valina; el resto de aminoácido en la posición 56 (posición 34 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina o un resto de valina; el resto de aminoácido en la posición 67 (posición 45 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de leucina, un resto de isoleucina o un resto de valina; el resto de aminoácido en la posición 68 (posición 46 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de valina; el resto de aminoácido en la posición 73 (posición 51 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de metionina; el resto de aminoácido en la posición 76 (posición 54 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de cisteína, un resto de serina, un resto de prolina o un resto de histidina; el resto de aminoácido en la posición 77 (posición 55 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de treonina; el resto de aminoácido en la posición 80 (posición 58 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina; el resto de aminoácido en la posición 81 (posición 59 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de asparagina; el resto de aminoácido en la posición 105 (posición 83 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de metionina; el resto de aminoácido en la posición 113 (posición 89 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de leucina; el resto de aminoácido en la posición 116 (posición 94 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de treonina; el resto de aminoácido en la posición 117 (posición 95 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina; el resto de aminoácido en la posición 119 (posición 97 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de glicina; el

secuencia sin péptido señal) no es un resto de valina; el resto de aminoácido en la posición 384 (posición 362 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de valina; el resto de aminoácido en la posición 387 (posición 365 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de arginina; el resto de aminoácido en la posición 388 (posición 366 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de leucina; el resto de aminoácido en la posición 395 (posición 373 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de leucina; el resto de aminoácido en la posición 397 (posición 375 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de cisteína o un resto de histidina; el resto de aminoácido en la posición 398 (posición 376 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de alanina; el resto de aminoácido en la posición 401 (posición 379 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de treonina; el resto de aminoácido en la posición 405 (posición 383 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina o un resto de valina; el resto de aminoácido en la posición 406 (posición 384 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de leucina; el resto de aminoácido en la posición 412 (posición 390 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de glicina; el resto de aminoácido en la posición 416 (posición 394 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de leucina; el resto de aminoácido en la posición 417 (posición 395 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de alanina; el resto de aminoácido en la posición 420 (posición 398 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de metionina; el resto de aminoácido en la posición 423 (posición 401 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina; el resto de aminoácido en la posición 426 (posición 404 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina; el resto de aminoácido en la posición 429 (posición 407 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de alanina; el resto de aminoácido en la posición 430 (posición 408 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de metionina; el resto de aminoácido en la posición 432 (posición 410 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de cisteína o un resto de aspartato; el resto de aminoácido en la posición 434 (posición 412 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de prolina; el resto de aminoácido en la posición 435 (posición 413 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de lisina; el resto de aminoácido en la posición 442 (posición 420 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de histidina; el resto de aminoácido en la posición 451 (posición 429 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de prolina; el resto de aminoácido en la posición 456 (posición 434 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de histidina o un resto de cisteína; el resto de aminoácido en la posición 458 (posición 436 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de lisina; el resto de aminoácido en la posición 460 (posición 438 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de arginina; el resto de aminoácido en la posición 461 (posición 439 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina o un resto de aspartato; el resto de aminoácido en la posición 462 (posición 440 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de triptófano o un resto de arginina; el resto de aminoácido en la posición 465 (posición 443 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de metionina o un resto de leucina; el resto de aminoácido en la posición 472 (posición 450 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de leucina; el resto de aminoácido en la posición 473 (posición 451 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de treonina; el resto de aminoácido en la posición 474 (posición 452 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de treonina; el resto de aminoácido en la posición 479 (posición 457 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina; el resto de aminoácido en la posición 482 (posición 460 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de lisina o un resto de glicina; el resto de aminoácido en la posición 484 (posición 462 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de leucina; el resto de aminoácido en la posición 495 (posición 473 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina; el resto de aminoácido en la posición 496 (posición 474 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de fenilalanina; y el resto de aminoácido en la posición 497 (posición 475 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de arginina.

También se describe que, cuando una sTNALP se usa en las sALPs dirigidas al hueso de la presente invención, usando la numeración de la secuencia de TNALP humana, el aminoácido en la posición 17 no es un resto de fenilalanina; el aminoácido en la posición 28 (posición 11 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de cisteína; el aminoácido en la posición 33 (posición 16 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de valina; el aminoácido en la posición 37 (posición 20 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de prolina; el aminoácido en la posición 40 (posición 23 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de valina; el resto de aminoácido en la posición 51 (posición 34 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina o un resto de valina; el resto de aminoácido en la posición 62 (posición 45 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de leucina, un resto de isoleucina o un resto de valina; el resto de aminoácido en la posición 63 (posición 46 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de valina; el resto de aminoácido en la posición 68 (posición 51 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de metionina; el resto de aminoácido en la posición 71 (posición 54 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de cisteína, un resto de serina, un resto de prolina o un resto de histidina; el resto de aminoácido en la posición 72 (posición 55 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de treonina; el resto de aminoácido en la posición 75 (posición 58 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina; el resto de aminoácido en la posición 76 (posición 59 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de asparagina; el resto de aminoácido en la posición 100 (posición 83 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de metionina; el resto de aminoácido en la posición 108 (posición 89 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de leucina; el resto de aminoácido en la posición 111 (posición 94 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de treonina; el resto de aminoácido en la posición 112 (posición 95 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina; el resto de aminoácido en la posición 114 (posición 97 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de glicina; el resto de aminoácido en la posición 116 (posición 99 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina o un resto de treonina; el resto de aminoácido en la posición 120 (posición 103 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de arginina; el resto de aminoácido en la posición 123 (posición 106 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de aspartato; el resto de aminoácido en la posición 128 (posición 111 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de metionina; el resto de aminoácido en la posición 129 (posición 112 en la secuencia sin péptido señal) no

la secuencia sin péptido señal) no es un resto de cisteína o un resto de histidina; el resto de aminoácido en la posición 392 (posición 375 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de alanina; el resto de aminoácido en la posición 395 (posición 378 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de treonina; el resto de aminoácido en la posición 399 (posición 382 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina o de valina; el resto de aminoácido en la posición 400 (posición 383 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de leucina; el resto de aminoácido en la posición 406 (posición 389 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de glicina; el resto de aminoácido en la posición 410 (posición 393 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de leucina; el resto de aminoácido en la posición 411 (posición 394 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de alanina; el resto de aminoácido en la posición 414 (posición 397 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de metionina; el resto de aminoácido en la posición 417 (posición 400 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina; el resto de aminoácido en la posición 420 (posición 403 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina; el resto de aminoácido en la posición 423 (posición 406 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de alanina; el resto de aminoácido en la posición 424 (posición 407 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de metionina; el resto de aminoácido en la posición 426 (posición 409 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de cisteína o un resto de aspartato; el resto de aminoácido en la posición 428 (posición 411 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de prolina; el resto de aminoácido en la posición 429 (posición 412 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de lisina; el resto de aminoácido en la posición 436 (posición 419 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de histidina; el resto de aminoácido en la posición 445 (posición 428 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de prolina; el resto de aminoácido en la posición 450 (posición 433 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de histidina o un resto de cisteína; el resto de aminoácido en la posición 452 (posición 435 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de lisina; el resto de aminoácido en la posición 454 (posición 437 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de arginina; el resto de aminoácido en la posición 455 (posición 438 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina o un resto de aspartato; el resto de aminoácido en la posición 456 (posición 439 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de triptófano o un resto de arginina; el resto de aminoácido en la posición 459 (posición 442 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de metionina o un resto de leucina; el resto de aminoácido en la posición 466 (posición 449 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de leucina; el resto de aminoácido en la posición 467 (posición 450 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de treonina; el resto de aminoácido en la posición 468 (posición 451 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de treonina; el resto de aminoácido en la posición 473 (posición 456 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina; el resto de aminoácido en la posición 476 (posición 459 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de lisina o un resto de glicina; el resto de aminoácido en la posición 478 (posición 461 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de leucina; el resto de aminoácido en la posición 489 (posición 472 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de serina; el resto de aminoácido en la posición 490 (posición 473 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de fenilalanina; y el resto de aminoácido en la posición 491 (posición 474 en la secuencia sin péptido señal) no es un resto de arginina. También se describe que uno o más Xs se definen como cualquiera de los aminoácidos encontrados en esa posición en las secuencias del alineamiento, o un resto que constituye una sustitución conservada o semiconservada de cualquiera de estos aminoácidos. Se describe además que Xs se definen como cualquiera de los aminoácidos encontrados en esa posición en las secuencias del alineamiento. Por ejemplo, el resto de aminoácidos en la posición 51 (posición 34 en la secuencia sin péptido señal) es un resto de alanina o de valina; el resto de aminoácidos en la posición 177 (posición 160 en la secuencia sin péptido señal) es un resto de alanina o de serina; el resto de aminoácidos en la posición 212 (posición 195 en la secuencia sin péptido señal) es un resto de isoleucina o de valina; el resto de aminoácidos en la posición 291 (posición 274 en la secuencia sin péptido señal) es un resto de ácido glutámico o de ácido aspártico; y el resto de aminoácidos en la posición 374 (posición 357 en la secuencia sin péptido señal) es un resto de valina o de isoleucina.

Se describe además que el fragmento de sALP en la proteína de fusión dirigida al hueso consiste en uno cualquiera de los fragmentos de una secuencia de consenso derivada de un alineamiento de las isozimas de ALP humana y las TNALPs procedentes de diversas especies de mamíferos que corresponden a los restos de aminoácidos 18-498, 18-499, 18-500, 18-501, 18-502, 18-503, 18-504, ó 18 a 505 de TNALP humana. Estos fragmentos de consenso son restos de aminoácidos 23 a 508, 23 a 509, 23 a 510, 23 a 511, 23 a 512, 23 a 513, 23 a 514 y 23 a 515 de SEC ID NO: 15, respectivamente. En estos fragmentos de consenso, X es cualquier aminoácido, excepto un aminoácido que corresponde a una mutación patológica en esa posición de TNALP humana como se da en la Tabla 1. Se describe además que estos fragmentos de consenso son restos de aminoácidos 23 a 508, 23 a 509, 23 a 510, 23 a 511, 23 a 512, 23 a 513, 23 a 514 y 23 a 515 de SEC ID NO: 18, respectivamente. En estos fragmentos de consenso, X es cualquier aminoácido encontrado en esa posición en la ALP de una de las especies de isozimas de ALP humana del alineamiento del que deriva el consenso, pero no es un aminoácido que corresponde a una mutación patológica en esa posición de TNALP humana como se da en la Tabla 1 (véase la Figura 30).

Se describe además que el fragmento de sALP en la proteína de fusión dirigida al hueso de la presente invención consiste en cualquiera de los fragmentos de una secuencia de consenso derivada de un alineamiento de TNALPs procedentes de diversas especies de mamíferos que corresponden a los restos de aminoácidos 18-498, 18-499, 18-500, 18-501, 18-502, 18-503, 18-504, y 18 a 505 de TNALP humana. Estos fragmentos de consenso son restos de aminoácidos 18-498, 18-499, 18-500, 18-501, 18-502, 18-503, 18-504, y 18 a 505 de SEC ID NO: 16, respectivamente. En estos fragmentos de consenso, X es cualquier aminoácido excepto un aminoácido que corresponde a una mutación patológica en esa posición de TNALP humana como se da en la Tabla 1. Se describe

además que estos fragmentos de consenso son restos de aminoácidos 18-498, 18-499, 18-500, 18-501, 18-502, 18-503, 18-504, y 18 a 505 de SEC ID NO: 19, respectivamente. En estos fragmentos de consenso, X es cualquier aminoácido encontrado en esa posición en la TNALP de una de las especies del alineamiento del que deriva el consenso, pero no es un aminoácido que corresponde a una mutación patológica en esa posición de TNALP humana como se da a conocer en la Tabla 1 (véase la Figura 31).

5

Tabla 1: Mutaciones patológicas en TNALP humana

Exón	Cambio de base	Cambio de aminoácido		Referencia	Forma clínica en paciente	Genotipo del paciente	% WT	ref.	E.coli	
		Nomenclatura no estandarizada	Nomenclatura estandarizada							
1	c.-195C>T			Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y			na	Afecta al sitio de comienzo de la transcripción
2	c.17T>A	L-12X	p.L6X	Taillandier et al. 2000	niñez	L-12X?			na	Mutación sin sentido
2	c.50C>T	S-1F	p.S17F	Mornet et al. 1998	lactante	S-1F/G58S	19,0	1	na	
3	c.83A>G	Y11C	p.Y28C	Taillandier et al. 2001	lactante	Y11C/R119H	7,2	2	-	
3	c.98C>T	A16V	p.A33V	Henthorn et al. 1992	niñez	A16V/Y419H			-	
3	c.110T>C	L20P	p.L37P	Versailles lab oct. de 2003	perinatal	L20P/L20P			+	
3	c.119C>T	A23V	p.A40V	et al. 1998	perinatal	A23V/G456S	2,3	1	+	
3	c.132C>T	Q27X	p.Q44X	Mornet E, no publicado	perinatal	Q27X/c.662in sG			na	Mutación sin sentido
3	c.151G>T	A34S	p.A51S	Mumm et al. 2002	lactante	A34S/T117H			+	
3	c.152G>T	A34V	p.A51V	Taillandier et al. 2001	lactante	A34V/V442M			+	
4	c.184A>T	M45L	p.M62L	Taillandier et al. 1999	lactante	M45Jc.1172d eIC	27,4	1	+	
4	c.184A>G	M45V	p.M62V	Spentchian et al. 2003	lactante	M45V/M45V			+	
1	c.-195C>T			Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y			na	Afecta al sitio de comienzo de la transcripción

Número total de mutaciones 188

4	c.186G>C	M451	p.M62II	Taillandier et al. 2005	niñez	M45I/E174K	0	16	+	
4	c.187G>C	G46R	p.G63R	Spentchian et al. 2003	lactante	G46R/G46R			+	
4	c.188G>T	G46V	p.G63V	Lia-Baldini et al. 2001	lactante	G46V/N	0,8	3	+	
4	c.203C>T	T51M	p.T68M ((Orimo et al. 2002	niñez	T51M/A160T	5,2	4	+	
4	c.211C>T	R54C	p.R71C	et al. 1992	lactante	R54C/D277A	0	17	+	
4	c.211C>A	R54S	p.R71S	Orimo et al. 2002	niñez	R54S/?	2,9	4	+	
4	c.212G>C	R54P	p.R71P	Henthorn et al. 1992	perinatal	R54P/Q190P			+	
4	c.212G>A	R54H	p.R71H	Taillandier et al. 2001	perinatal	A23V/R54H			+	
4	c.219T>C	I55T	p.I72T	Versailles lab oct.	2004 odonto	I55T/N			-	
4	c.223G>A	G58S	p.G75S	Mornet et al. 1998	lactante	S-1F/G58S	3,5	1	+	
4	c.227A>G	Q59R	p.Q76R	Mornet et al. 2001	lactante	Q59R/T117N			-	
IVS4	c.298-2A>G			Taillandier et al. 2000	perinatal	c.298-2A>G/c. 997+3 A>C			na	Esta mutación afecta al empalme y no a la secuencia codificante
5	c.299C>T	T83M	p.T100M	Mornet et al. 2001	lactante	83M/E174K			+	
1	c.-195C>T			Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y			na	Afecta al sitio de comienzo de la transcripción
5	c.303_311 del	N85_N87del	p.N102_N104del	Versailles lab Jul. 2007	perinatal	c.303_311del/G474R			na	Supresión
5	c.323C>T	P91L	p.P108L	Herasseetal. et al. 2003	odonto	P91L/N	0,4	sin pub.	-	

5	c.331G>A	A94T	p.A111T	Gosekl-Sone et al. 1998	odonto	A94T/?			+	
5	c.334G>A	G95S	p.G112S	Witters et al. 2004	lactante	G95S/R374C			-	
5	c.340G>A	A97T	p.A114T	Mumm et al. 2001	lactante	A97T/D277A			+	
5	c.341C>G	A97G	p.A114G	Draquet et al. 2004	perinatal	A97G+c.348_349insACCGT C /G309R			+	
5	c.348_349insA CCGTC			Draquet et al. 2004 perinatal Draquet et al. 2004 perinatal	perinatal	A97G+c.348_349insACCGT C /G309R			na	Dos mutaciones sustitutivas e inserción
5	c.346G>T	A99S	p.A116S	Versailles lab jul. 2007	adulto	A99S/N400S			+	
5	c.346G>A	A99T	p.A116T	Hu et al. 2000	adulto	A99T/N	0,8	3	+	
5	c.358G>A	G103R	p.G120R	Mornet et al. 1998	perinatal	G103R/648+1 G>A			+	
5	c.368C>A	A106D	p.A123D	Spentchian et al. 2006	perinatal	A106D/S249_H250del			-	
5	c.382G>A	V111M	p.V128M	Mumm et al. 2002	perinatal	V111M/R206 W			-	
5	c.385G>A	G112R	p.G129R	Mornet et al. 1998	perinatal	G112R/G474 R			+	
1	c.-195C>T			Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y			na	Afecta al sitio de comienzo de la transcripción
5	c.388_391delG			Spentchian et al. 2003 Spentchian et al. 2003 TAA 91 delGTAA	perinatal	E294K1388_3 E294K/388_3			na	Mutación de desplazamiento del marco
5	c.389delT			Spentchian et al. 2003 Spentchian et al. 2003	perinatal	c.389delT/c.3 389delT/c.3			na	Mutación de desplazamiento del marco

5	c.392delG		Mumm et al. 2002	perinat/lactante	c.392delG/A3		na	Mutación de desplazamiento del marco
5	c.394G>A	A115T	Versailles lab Jul. 2006	adulto	A115T/E174K			
5	c.395C>T	A115V	Watanabe et al. 2001	adulto	A115V/?	16,9	14	-
5	c.400_401 AC>	T117H	Mumm et al. 2002	perinatal	T117H/F310del			-
5	c.401C>A	T117N	Taillandier et al. 2000	perinatal	T117N/T117N 20.5		5	-
5	c.406C>T	R119C	Versailles lab oct. de 2003	odonto	R119C/R119 H			-
5	c.407G>A	R119H	Taillandier et al. 1999	lactante	R119H/G145V	33,4	1	-
5	c.442A>G	T131A	Michigami et al. 2005	perinatal	T131A/?			-
5	c.443C>T	T1311	Spentchian et al. 2003	lactante	T1311/G145S			-
6	c.480delT		Versailles lab. Ene. 2008	perinatal	c.480delT/R2 06W			Supresión
1	c.-195C>T		Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y			Afecta al sitio de comienzo de la transcripción
6	c.484G>A	G145S	Spentchian et al. 2003	lactante	T1311/G145S			+
6	c.485G>T	G145V	Taillandier et al. 1999	lactante	119H/G145 V	1,3	1	+
6	c.500C>T	T150M	Versailles lab oct. de 2003	lactante	T150M/E174K	0		+
6	c.508A>G	N153D	Mornet et al. 1998	perinatal	N153D/N153 D	0	13	-

6	c.511C>T	H154Y	p.H171Y	Taillandier et al. 1999	lactante	H154Y/E174K	2,1	1	-	
6	c.512A>G	H154R	p.H171R	Mornet E, no publicado	adulto	H154R/E174K			-	
6	c.526G>A	A159T	p.A176T	Taillandier et al. 2000	niñez	A159T/R229S	45,4	5	+	
6	c.529G>A	A160T	p.A177T	Goseki-Sone et al. 1988	adulto	A160T/F310L	83,8	4	-	
6	c.535G>A	A162T	p.A179T	Weiss et al. 1988	perinatal	A162T/A162T	18	6	+	
6	c.542C>T	S164L	p.S181L	Lia-Baldini et al. 2001	lactante	S164L/del(ex1	1,3	3	-	
6	c.544delG			Taillandier et al. 1999	perinatal	G232V/544del			na	Mutación de desplazamiento del marco
6	c.550C>T	R167W	p.R184W	Mornet et al. 1998	perinatal	R167W/W253 R167W/W253	0,6	3	+	
6	c.567C>A	D172E	p.D189E	Spentchian et al. 2003	perinatal	D172E/D172E			-	
1	c.-195C>T			Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y			na	Afecta al sitio de comienzo de la transcripción
6	c568_570delA	N173del	p.N190del	Michigami et al. 2005 AC 173del	perinatal	c.1559delT/N			-	Supresión de 1 a.a.
6	c.571G>A	E174K	p.E191K	Henthorn et al. 1992	lactante	E174K/D361V	88,0	1	-	
6	c.572A>G	E174G	p.E191G 1998	Goseki-Sone et al.	odonto	E174G/C.1559 delT			-	
6	c.575T>C	M175T	p.M192T	Versailles lab Jul. de 2007	lactante	M175T/E294K			-	
6	c.577C>G	P176A	p.P193A	Mumm et al. 2002	adulto	A97T/P176A			+	
6	c.602G>A	C184Y	p.C201Y	Taillandier et al. 1999	c.-perinatal	195C>T/C184 Y			-	

6	c.609C>G	D186E	p.D203E	Versailles lab oct.	2004 perinatal	D186E/D186E	-	
6	c.620A>C	Q190P	p.Q207P	Henthorn et al. 1992	perinatal	R54P/Q190P	+	
6	c.631 A>G	N194D	p.N211D	Taillandier et al. 2001	lactante	A99T/N194D	+	
6	c.634A>T	I195F	p.I212F	Souka et al. 2002	perinatal	I195F/E337D	-	
IVS6	c.648+1 G>T			Brun-Heath et al. 2005	perinatal	c.648+1G>T/ D277A		Afecta al empalme
IVS6	c.648+1 G>A			Mornet et al. 1998	perinatal	G103R/C.648+ 1G>A	na	Afecta al empalme
IVS6	c.649-			Versailles lab jul. de 2006	perinatal	c.649-1_3delinsAA/c 1_3delinsAA		Mutación de desplazamiento del marco
1	c.-195C>T			Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y	na	Afecta al sitio de comienzo de la transcripción
7	c.653T>C	1201T	p.I218T	Utsch et al., 2005, contact	perinatal	I201T/R374C	-	Sin pub. 3,7
7	659G>T	G203V	p.G220V	Taillandier et al. 2001	odonto	E174K/G203V	+	
7	659G>C	G203A	p.G220A	Spentchian et al. 2003	perinatal	G203A/G203	+	
7	662insG			Mornet E, no publicado	perinatal	Q27X/662ins	na	Mutación de desplazamiento del marco
7	c.662delG			Spentchian et al. 2003	perinatal	R255L/c.662d	na	Mutación de desplazamiento del marco
7	c.662G>T	G204V	p.G221V	Versailles lab oct. de 2004	perinatal	G204V/M338 G204V/M338	+	
7	c.667C>T	R206W	p.R223W	Mornet et al. 1998	perinatal	R206W/?	-	2,8 3

7	c.668G>A	R206Q	p.R223Q	Mumm et al. 2002	perinatal	R206Q/deletion			-	
7	c.670A>G	K207E	p.K224E	Mochizuki et al. 2000	lactante	K207E/G409C	43	15	+	
7	c.677T>C	M209T	p.M226T	Baumgartner-Sigl et al. 2007	lactante	M209T/T354I			-	
7	c.704A>G	E218G	p.E235G	Taillandier et al. 2001	adulto	E218G/A382S	3,6	7	+	
7	c.738G>T	R229S	p.R246S	Taillandier et al. 2000	niñez	A159T/R229S	4,4	5	-	
7	c.746G>T	G232V	p.G249V	Fedde et al. 1996	perinatal	G232V/N	34,5	3	+	
7	c.971 A>G	K247R	p.K264R	Versailles lab Ene. de 2007	perinatal	K247R/D361V			-	
1	c.-195C>T			Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y			na	Afecta al sitio de comienzo de la transcripción
8	c.797_802del	S249_H250del	p.S266_H	Spentchian et al. 2006 267del	perinatal	A106D/S249_H250del				Supresión de 2 a.a.
8	c.809G>A	W253X	p.W270X	Mornet et al. 1998	perinatal	R167W/WV253			na	Mutación sustitutiva
8	C.814C>T	R255C	p.R272C	Spentchian et al. 2006	perinatal	R255C/T117H			-	
8	c.815G>T	R255L	p.R272L	Spentchian et al. 2003	perinatal	R255L/c.662d eIG			-	
8	c.815G>A	R255H	p.R272H	Brun-Heath et al. 2005	lactante	R255H/R255 H	6,8	16	-	
8	c.824T>C	L258P	p.L275P	Orimo et al. 2002	niñez	L258P/A160T	3,3	4	-	
8	c.853_854insG	Y268X	p.Y285X	Michigami et al. 2005	perinatal	c1559delT/Y2 68X			na	Mutación sustitutiva
IVS8	c.862+5G>A			Taillandier et al. 1999	lactante	c.862+5G>A/c 862+5G>A			na	Afecta al empalme

9	c.865C>T	L272F	p.L289F	Sugimoto et al. 1998	lactante	L272F/?	50	8	-	
9	c.871G>A	E274K	p.E291K	Mornet et al. 1998	lactante	E174K/E274K	8,3	1	-	
9	c.871G>T	E274X	p.E291X	Taillandier et al. 2000	perinatal	A94T/E274X			-	Mutación sustitutiva
9	c.874C>A	P275T	p.P292T	Brun-Heath et al. 2005	lactante	P275T/A16V	4,0	16	+	
9	c.876_881delA GGGA	G276_D277del		Spentchian et al. 2003	perinatal	e/c.962delG			na	
1	c.-195C>T			Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y			na	Afecta al sitio de comienzo de la transcripción
9	c.880G>T	D277Y	p.D294Y	Taillandier et al. 2001	lactante	A159T/D277Y			-	
9	c.881 A>C	D277A	p.D294A	Henthorn et al. 1992	lactante	R54C/D277A	0	17	-	
9	c.883A>G	M278V	p.M295V	Mornet et al. 2001	niñez	E174K/M278V			-	
9	c.884T>C	M278T	p.M295T	Brun-Heath et al. 2005	perinatal	M278T/R206	8,5	16	-	
9	c.885G>A	M278I	p.M295I	Michigami et al. 2005	perinatal	M278I/C.1559 delT			-	
9	c.889T>G	Y280D	p.Y297D	Brun-Heath et al. 2005	niñez	R119H/Y280D	1,3	16	-	
9	c.892G>A	E281K	p.E298K	Orimo et al. 1994	lactante	E281K/1559d			-	
9	c.896T>C	L282P	p.L299P	Versailles lab oct.	2003 lactante	L282P/L282P	9,7	15	-	
9	c.917A>T	D289V	p.D306V	Taillandier et al. 1999	lactante	D289V/D289V	0	12	-	
9	c.919C>T	P290S	p.P307S	Versailles lab oct.	2004 lactante	P290S/M450T			+	
9	c.920C>T	P290L	p.P307L	Versailles lab jul. 2006	niñez	P290L/S164L				

9	c.928_929delTC				Brun-Heath et al. 2005	perinatal	T394A/c.928_929delTC				Mutación de desplazamiento del marco
9	c.931G>A	E294K	p.E311K		Spentchian et al. 2003	perinatal	E294K/c.388_391delGTAA				
9	c.962delG				Spentchian et al. 2003	perinatal	G276_D277del/c.962delG			na	Mutación de desplazamiento del marco
1	c.-195C>T				Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y			na	Afecta al sitio de comienzo de la transcripción
9	c.976G>C	G309R	p.G326R		Litmanovitz et al. 2002	perinatal	G309R/E274K			+	
9	c.981_983delCTT	F310del	p.F327del		Orimo et al. 1997 delT	lactante	F310del/c.155	-10	15	+	Supresión de aminoácido
9	c.979T>G	F310C	p.F327C		Mornet et al. 2001	perinatal	((T117N)/F310C			+	
9	c.979_980TTGG	F310G	p.F327G		Taillandier et al. 2001	adulto	E174K/F310G			+	
9	c.979T>C	F310L	p.F327L		Ozono et al. 1996	lactante	F310/G439R	72	9	+	
9	c.982T>A	F311L	p.F328L		Michigami et al. 2005	perinatal no mortal	F311L/T83M	-10	15	+	
IVS9	c.997+2T>A				Taillandier et al. 2000	perinatal	c.997+2T>A/C 472S			na	Afecta al empalme
IVS9	c.997+2T>G				Brun-Heath et al. 2005	perinatal	c.997+2T>G/c c.997+2T>G/c 997+2T>G/c 997+2T>G				Afecta al empalme
IVS9	c.997+3A>C				Mornet et al. 1998	perinatal	c.997+3A>C/c 997+3A>C			na	Afecta al empalme
IVS9	c.998-1 G>T				Taillandier et al. 2001	perinatal	E174K/C.998-1 G>T			na	Afecta al empalme

10	c.1001G>A	G317D	p.G334D	Greenberg et al. 1993	perinatal	D317D/G317D	0	<u>10</u>	-	
10	c.1015G>A	G322R	p.G339R	Mumm et al. 2002	perinatal	G322R/A159T			-	
10	c.1016G>A	G322E	p.G339E	Versailles lab oct. de 2004	lactante	G322E/V111 M			-	
1	c.-195C>T			Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y			na	Afecta al sitio de comienzo de la transcripción
10	c.1042G>A	A331T	p.A348T	Taillandier et al. 2000	lactante	E174K/A331T	33,2	<u>5</u>	-	
10	c.1044_1055del	L332_A335del	p.L349_A352del	Spentchian et al. 2006	perinatal	L332_A335del/G474R				Supresión de 4 a.a.
10	c.1062G>C	E337D	p.E354D	Souka et al. 2002	perinatal	I195F/E337D			+	
10	c.1064A>C	M388T	p.M355T	Versailles lab oct. de 2004	perinatal	G204V/M388 T			-	
10	c.1065G>A	M388I	p.M355I	Versailles lab. Ene. de 2008	lactante	M388I/R374C			-	
10	c.1101_1103de ICTC	S351del	p.S368del	Versailles lab oct. de 2004	perinatal	c.1101_1103de ICTC/T372I				Supresión de 1 a.a.
10	C.1112C>T	T354I	p.T371I	gaumgartner-Sigl et al. 2007	lactante	M209T/T354I			-	
10	c.1120G>A	V357M	p.V374M	Versailles lab oct. de 2004	adulto	V357M/E281K			+	
10	c.1130C>T	A360V	p.A377V	Mornet et al. 2001	perinatal	A360V/A360V			+	
10	c.1133A>T	D361V	P.D378V	Henthorn et al. 1992	lactante	E174K/D361V	1,2	<u>3</u>	+	
10	c.1142A>G	H364R	p.H381 R	Taillandier et al. 2000	lactante	A23V/H364R			+	
10	c.1144G>A	V365I	p.V382I	Goseki-Sone et al. 1998	niñez	F310L/V365I	0	<u>11</u>	+	

10	c.1166C>T	T3721	p.T389I	Versailles lab oct. de 2004	perinatal	T372I/S351 del		-	
1	c.-195C>T			Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y		na	Afecta al sitio de comienzo de la transcripción
10	c.1171C>T	R374C	p.R391C	Zurutuza et al. 1999	niñez	E174K/R374C	10,3	1	
0	c.1172G>A	R374H	p.R391H	Orimo et al. 2002	niñez	R374H/?	3,7	4	
10	c.1172delC			Taillandier et al. 1999	lactante	M45L/C.1172delC			Mutación de desplazamiento del marco
10	c.1175G>C	G375A	p.G392A	Versailles lab. ene. de 2008	perinatal	G375A/R119 C		-	
10	c.1182T>C	I378T	p.I395T	Versailles lab jul. de 2008	2006 perinatal	I378T/E174K			
11	c.1195G>T	A382S	p.A399S	Taillandier et al. 2001	adulto	E218G/A382S		-	
11	c.1196C>T	A382V	p.A399V	Spentchian et al. 2006	adulto	A382V/A16V		-	
	11 c.1199C>T	P383L	p.P400L	Spentchian et al. 2006	lactante	P383L/P383L		+	
11	c.1214_1215deICA			Versailles lab Jul. 2006	adulto	c.1214_1215deICA/E 174K			Mutación de desplazamiento del marco
	11 c.1216			Brun-Heath et al.	2005 perinatal	c.1216 1219d			
	1219de								
	IGACA					e IGACA/?			
11	c.1217A>G	D389G	p.D406G	Taillandier et al. 2000	odonto.	D389G/R433 H	14.9	5	+
11	c.1228T>C	F393L	p.F410L	Versailles lab oct. de 2004	lactante	F393L/E174K			-

11	c.1231 A>G	T394A	p.T411A	Brun-Heath et al. 2005	perinatal	T394A/c.926_927delTC	0,3	<u>16</u>	-	
1	c.-195C>T			Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y			na	Afecta al sitio de comienzo de la transcripción
11	c.1240C>A	L397M	p.L414M	Mumm et al. 2002	perinatal	L397M/D277A			-	
11	c.1250A>G	N400S	p.N417S	Sergi et al. 2001	perinatal	N400S/C.648+ 1G>A3		Sin pub.	+	
11	c.1256delC			Taillandier et al. 2000	perinatal	c.1256delC/?			na	Mutación de desplazamiento del marco
11	c.1258G>A	G403S	p.G420S	Glaser et al. 2004	perinatal	G403/G403S	0,4	Sin pub.	-	
11	c.1268T>C	V406A	p.V423A	Taillandier et al. 2001	perinatal	A99T/V406A	15,7	<u>2</u>	-	
11	c.1270G>A	V407M	p.V424M	Versailles lab en. 2007	adulto	V407MN407M			-	
11	c.1276G>T	G409C	p.G426C	Mochizuki et al. 2000	lactante	K207A/G409C 18.5		<u>15</u>	-	
11	c.1277G>A	G409D	p.G426D	Mumm et al. 2002	niñez	G409D/E174K			-	
11	c.1282C>T	R411X	p.R428X	Taillandier et al. 1999	perinatal	R411X/R411X			na	Mutación sustitutiva
11	c.1283G>C	R411P	p.R428P	Spentchian et al. 2006	perinatal	R411P/C.997+ 2T>A			-	
11	c.1285G>A	E412K	p.E429K	Versailles lab jul. 2006	2006 odonto.	E412K/?				
11	c.1306T>C	Y419H	p.Y436H	Henthorn et al. 1992	niñez	A16V/Y419H			na	
12	c.1333T>C	S428P	p.S445P	Mornet et al. 1998	lactante	S428P/?	2,1	<u>1</u>	-	
12	c.1349G>A	R433H	p.R450H	Taillandier et al. 2000	odonto.	D389G/R433H			-	

1	c.-195C>T				Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y			na	Afecta al sitio de comienzo de la transcripción
12	c.1348C>T	R433C	p.R450C		Mornet et al. 1998	lactante	R433C/R433C	4,0	1	-	
12	c.1354G>A	E435K	p.E452K		Spentchian et al. 2003	perinatal	A94T/E435K			+	
12	c.1361A>G	H437R	p.H454R		Versailles lab oct. de 2003	niñez	E174K/H437R			+	
12	c.1363G>A	G438S	p.G455S		Draguet et al. 2004	adulto	G438S/G474 R			-	
12	c.1364G>A	G438D	p.G455D		Versailles lab en. 2007	perinatal	G438D/G438 D			-	
12	c.1366G>T	G439W	p.G456W		Versailles lab oct. de 2003	niñez	G439W/?			+	
12	c.1366G>A	G439R	p.G456R		Ozono et al. 1996	lactante	G439R/?	1,5	Sin pub.	+	
12	c.1375G>A	V442M	p.V459M		Taillandier et al. 2000	lactante	A34V/V442M			+	
12	c.1375G>T	V442L	p.V459L		Versailles lab oct. de 2004	perinatal	V442L/E435K			-	
12	c.1396C>T	P449L	p.P466L		Versailles lab oct. de 2003	perinatal	P449L/?			+	
12	c.1400T>C	M450T	p.M467T		Versailles lab oct. de 2004	lactante	M450T/P290S			-	
12	c.1402G>A	A451T	p.A468T		Spentchian et al. 2003	perinatal	A451T/A451T			+	
12	c.1417G>A	G456S	p.G473S		Mornet et al. 1998	perinatal	A23V/G456S			+	
12	c.1426G>A	E459K	p.E476K		Taillandier et al. 1999	perinatal	A94T/E459K			+	
1	c.-195C>T				Taillandier et al. 2000	perinatal	C.-195C>T/C184 Y			na	Afecta al sitio de comienzo de la transcripción

12	c.1427A>G	E459G	p.E476G	Mornet et al. 2001	perinatal	E459G/E459G			+	
12	c.1433A>T	N461I	p.N478I	Taillandier et al. 2000	niñez	N461I/N	1,1	<u>3</u>	-	
12	c.1444_1445insC			Brun-Heath et al. 2005	perinatal	c.1444_1445insC/G317D				Mutación de desplazamiento del marco
12	c.1456G>C	C472S	p.C489 S	Taillandier et al. 2000	perinatal	C472S/C.997+2T>A	9,4	<u>5</u>	-	
12	c.1468A>T	I473F	p.I490F	Lia-Baldini et al. 2001	adulto	I473F/?	37,1	<u>3</u>	-	
12	c.1471 G>A	G474R	p.G491 R	Mornet et al. 1998	perinatal	G112R/G474 R			-	
12	c.1471delG			Brun-Heath et al. 2005	odonto	c.1471delG/R 119H				Mutación de desplazamiento del marco
12	c.1559delT			Orimo et al. 1994	lactante	E281K/C.1559 delT	28	<u>18</u>	na	Mutación de desplazamiento del marco
Supresiones grandes										
Supresión de				Spentchian et al. 2006	perinatal	homocigoto				
exons 3-5										
Supresión del exón 12 (parte 3')			Spentchian et al. 2006	lactante	Compuesto heterocigoto con S164L					

Espaciador

5 Sin estar limitados a esta teoría, se cree que el fragmento de Fc usado en la proteína de fusión de sALP dirigida al hueso, presentada en los Ejemplos más abajo, actúa como un espaciador que permite que la proteína se pliegue más eficientemente, puesto que la expresión de sTNALP-Fc-D10 fue mayor que la de sTNALP-D10 (véase el Ejemplo 2 más abajo). Una posible explicación es que la introducción del fragmento de Fc alivia las fuerzas repulsivas provocadas por la presencia de la secuencia de D10 cargada muy negativamente añadida al término C de la secuencia de sALP ensayada.

10 Los espaciadores para la presente invención son polipéptidos que comprenden un Fc. Se describe que el espaciador alivia el impedimento estérico, evitando que dos dominios de sALP de dos monómeros de sALP interactúen entre sí para constituir la entidad catalíticamente activa mínima.

Fragmentos de la región del fragmento cristizable (Fc)

Los fragmentos de Fc útiles para la presente invención incluyen fragmentos de Fc de IgG que comprenden la bisagra, y los dominios CH2 y CH3. Por ejemplo, se pueden usar IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-3 e IgG-4.

Péptido cargado negativamente

15 El péptido cargado negativamente según la presente invención puede ser un poliaspartato o poliglutamato seleccionado del grupo que consiste en D10 a D16 o E10 a E16.

En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de sALP dirigidas al hueso de la presente invención se asocian para formar dímeros o tetrámeros.

20 Sin estar limitados a esta teoría particular, usando un polipéptido que comprende un Fc como espaciador, los dímeros están constituidos presumiblemente de dos monómeros de sALP dirigidos al hueso enlazados covalentemente a través de los dos enlaces de disulfuro localizados en la región bisagra de los dos fragmentos de Fc. En esta configuración dímera, el impedimento estérico impuesto por la formación de los enlaces de disulfuro entre cadenas evita presumiblemente la asociación de los dominios de sALP para que se asocien en la entidad catalíticamente activa mínima dímera presente en células normales.

25 Sin estar limitados a esta teoría particular, se cree que en su estructura tetrámera, la asociación de las proteínas de fusión implicaría un dominio de sALP de un dímero, y otro dominio de otro dímero. El impedimento estérico, que presumiblemente evita que dos dominios de sALP del mismo dímero unido mediante Fc interactúen entre sí para constituir la entidad catalíticamente activa mínima, se podría aliviar eventualmente insertando un espaciador más largo que el Fc, descrito en los Ejemplos presentados aquí, entre el fragmento de sALP y el fragmento de poliaspartato o poliglutamato.

30 La sALP dirigida al hueso puede comprender además opcionalmente uno o más aminoácidos adicionales 1) aguas abajo del poliaspartato o poliglutamato, y/o 2) entre el poliaspartato y el fragmento de Fc, y/o 3) entre el espaciador, tal como el fragmento de Fc, y el fragmento de sALP. Este es el caso, por ejemplo, cuando la estrategia de clonación usada para producir el conjugado dirigido al hueso introduce aminoácidos exógenos en estas localizaciones. Sin embargo, los aminoácidos exógenos se deberían de seleccionar para no proporcionar una señal de anclaje de GPI adicional. La probabilidad de que una secuencia diseñada sea escindida por la transamidasa de la célula hospedante se puede predecir como se describe mediante Ikezawa (Ikezawa 2002).

35 La presente invención también engloba la proteína de fusión según se modifica post-traduccionalmente, tal como mediante glucosilación, incluyendo las mencionadas expresamente aquí, acetilación, amidación, bloqueo, formilación, ácido gamma-carboxiglutámico, hidroxilación, metilación, fosforilación, ácido pirrolidonacarboxílico, y sulfatación.

40 La expresión "proteína recombinante" se usa aquí para referirse a una proteína codificada por un ácido nucleico manipulado genéticamente insertado en una célula hospedante procarionota o eucariota. El ácido nucleico se coloca generalmente en un vector, tal como un plásmido o virus, según sea apropiado para la célula hospedante. Aunque se han usado células de ovario de hámster chino (CHO) como hospedante para expresar los conjugados de la presente invención en los Ejemplos presentados aquí, una persona de pericia normal en la técnica entenderá que se puede usar un número de otros hospedantes para producir proteínas recombinantes según métodos que son habituales en la técnica. Los métodos representativos se describen en Maniatis, et al. Cold Springs Harbor Laboratory (1989). "Proteína escindible recombinante", como se usa aquí, se refiere a una proteína recombinante que se puede escindir por una enzima del hospedante para producir una proteína segregada/soluble. Sin estar limitados así, también se pueden usar células HEK293, PerC6, y células de riñón de bebé de hámster.

45 Como se usa aquí, la expresión "condiciones adecuadas para efectuar la expresión del polipéptido" se refiere a cualquier medio de cultivo que permitirá la producción de las proteínas de fusión de la presente invención. Sin estar limitados de esta manera, incluye medios preparados con un tampón, bicarbonato y/o HEPES, iones como cloruro, fosfato, calcio, sodio, potasio, magnesio, hierro, fuentes de carbono como azúcares simples, aminoácidos,

potencialmente lípidos, nucleótidos, vitaminas y factores de crecimiento como insulina; medios comercialmente disponibles normales como alfa-MEM, DMEM, F12 de Ham e IMDM suplementado con 2-4 mM de L-glutamina y 5% de suero fetal bovino; proteína animal comercialmente disponible normal, libre de medios, como Hyclone™ SFM4CHO, Sigma CHO DHFR-, Cambrex POWER™ CHO CD suplementada con 2-4 mM de L-glutamina. Estos medios se preparan de forma deseable sin timidina, hipoxantina ni L-glicina, para mantener la presión selectiva que permita la expresión estable del producto proteico.

Sin estar limitados de esta manera, las células hospedantes útiles para expresar la fusión de la presente invención incluyen células L, células C127, células 3T3, células CHO, células BHK, células COS-7, o células de ovario de hámster chino (CHO). Las células CHO particulares de interés para expresar la proteína de fusión de la presente invención incluyen CHO-DG44 y CHO/dhfr^r también denominada como CHO duk^r. Esta última línea celular está disponible en la American Type Culture Collection (ATCC número CRL-9096).

La expresión "tejido óseo" se usa aquí para referirse a tejido sintetizado mediante osteoblastos, compuesto de una matriz orgánica que contiene mayoritariamente colágeno, y mineralizado mediante la deposición de cristales de hidroxiapatita.

Las proteínas de fusión comprendidas en los conjugados de la presente invención para ser suministrados al hueso son útiles para el tratamiento terapéutico de afecciones defectuosas del hueso proporcionando una cantidad efectiva de la proteína de fusión al hueso. Las proteínas de fusión se proporcionan en forma de composiciones farmacéuticas en cualesquiera vehículos farmacéuticamente aceptables estándar, y se administran mediante cualquier procedimiento estándar, por ejemplo mediante inyección intravenosa.

Como se usa aquí, la expresión "fenotipo de HPP" se refiere a uno cualquiera de raquitismo (defecto en el cartílago de las placas de crecimiento), osteomalacia, niveles elevados de sangre y/u orina de pirofosfato inorgánico (PP_i), fosfoetanolamina (PEA) o 5'-fosfato de piridoxal (PLP), ataque, dolores de huesos, deposición de cristales de pirofosfato cálcico dihidratado (CPPD) en articulaciones, conduciendo a condrocalcinosis y muerte prematura. Sin estar limitados de esta manera, un fenotipo de HPP se puede documentar mediante retraso del crecimiento con una disminución de la longitud de huesos largos (tales como fémur, tibia, húmero, radio, cúbito), una disminución de la densidad media de hueso total y una disminución de la mineralización ósea en huesos tales como fémur, tibia, costillas y metatarsos, y falanges, una disminución en la mineralización de los dientes, una pérdida prematura de dientes de leche (por ejemplo, aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental). Sin estar limitados de esta manera, la corrección o prevención del defecto de mineralización ósea se puede observar mediante uno o más de los siguientes: un incremento de la longitud de huesos largos, un incremento de la mineralización en huesos y/o dientes, una corrección del arqueamiento de las piernas, una reducción del dolor de huesos y una reducción de la deposición de cristales de CPPD en las articulaciones.

Como se usa aquí, el término "corregir" en la expresión "corregir un fenotipo de hipofosfatasa" se refiere a cualquier reducción parcial o completa de un fenotipo de HPP preexistente. De forma similar, el término "prevenir" en la expresión "prevenir un fenotipo de hipofosfatasa" se refiere a cualquier retraso o ralentización en el desarrollo de un fenotipo de HPP, o cualquier evitación parcial o completa del desarrollo de un fenotipo de HPP.

Como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a cualquier mamífero, incluyendo humano, ratones, rata, perro, gato, cerdo, vaca, mono, caballo, etc. En una realización particular, se refiere a un ser humano.

Como se usa aquí, la expresión "sujeto que lo necesita", en un método de administración de un compuesto de la presente invención, se refiere a un sujeto que se beneficiaría de recibir un compuesto de la presente invención. En realizaciones específicas, se refiere a un sujeto que ya tiene al menos un fenotipo de HPP o un sujeto que probablemente desarrollará al menos un fenotipo de HPP o al menos algún fenotipo más de HPP. En otra realización, se refiere además a un sujeto que tiene aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental, o un sujeto que probablemente desarrollará aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental.

Como se usa aquí, "un sujeto que probablemente desarrollará al menos un fenotipo de HPP" es un sujeto que tiene al menos una mutación de pérdida de función en el gen (*ALPL*).

Como se usa aquí, "un sujeto que probablemente desarrollará aplasia, hipoplasia o displasia de cemento dental" es un sujeto que tiene HPP o una enfermedad periodontal debido a una infección bacteriana. La enfermedad periodontal debido a infección bacteriana puede inducir alteración del cemento, lo que puede conducir a la exfoliación de los dientes.

Vía de administración

Las sALPs dirigidas al hueso de la presente invención se pueden administrar mediante vías tales como oralmente, nasalmente, intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, sublingualmente, intratecalmente, o intradérmicamente. La vía de administración puede depender de una variedad de factores, tales como el entorno y los fines terapéuticos. Como se usa aquí, los sujetos se refieren a animales tales como seres humanos en los que es deseable la prevención o corrección del defecto de mineralización ósea que caracteriza a HPP o a otros fenotipos asociados con HPP, o la prevención o corrección del cemento defectuoso.

A título de ejemplo, la composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de un líquido, disolución, suspensión, píldora, cápsula, comprimido, cápsula de gel, polvo, gel, ungüento, crema, nebulización, neblina, vapor atomizado, aerosol, o fitosoma. Para administración oral, los comprimidos o cápsulas se pueden preparar por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes, o agentes humectantes. Los comprimidos se pueden revestir mediante métodos conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes, o suspensiones, o se pueden preparar como un producto seco para la constitución con disolución salina u otro vehículo líquido adecuado antes del uso. Los suplementos dietéticos de la invención también pueden contener aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos, conservantes, sales de tampón, agentes saborizantes, colorantes, y edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para la administración oral también se pueden formular adecuadamente para dar una liberación controlada de los ingredientes activos.

Los revestimientos entéricos se pueden usar además sobre comprimidos de la presente invención para resistir el contacto prolongado con el fluido gástrico fuertemente ácido pero se disuelven en el medio intestinal levemente ácido o neutro. Sin estar limitados de esta manera, se pueden usar acetato-ftalato de celulosa, Eudragit™ y ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP) en los revestimientos entéricos de composiciones farmacéuticas de la presente invención. Las concentraciones de acetato-ftalato de celulosa generalmente usadas son 0,5-9,0% del peso del núcleo. La adición de plastificantes mejora la resistencia al agua de este material de revestimiento, y las formulaciones que usan tales plastificantes son más efectivas que cuando se usa acetato-ftalato de celulosa solo. El acetato-ftalato de celulosa es compatible con muchos plastificantes, incluyendo monoglicérido acetilado; glucolato de butilo y ftalilbutilo; tartrato de dibutilo; ftalato de dietilo; ftalato de dimetilo; glucolato de etilo y ftaliletilo; glicerina; propilenglicol; triacetina, citrato de triacetina; y tripropionina. También se usa en combinación con otros agentes de revestimiento tales como etilcelulosa, en preparaciones de liberación controlada de fármacos.

Dosificación

Cualquier cantidad de una composición farmacéutica se puede administrar a un sujeto. Las dosis dependerán de muchos factores, incluyendo el modo de administración y la edad del sujeto. Típicamente, la cantidad de ALP dirigida al hueso de la invención contenida en una única dosis será una cantidad que evite, retrase o corrija efectivamente el defecto de mineralización ósea en HPP sin inducir toxicidad significativa. Como se usa aquí, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva para lograr el efecto terapéutico deseado, a la vez que se evitan efectos secundarios adversos. Típicamente, las sALPs dirigidas al hueso según la presente invención se pueden administrar a sujetos en dosis que oscilan de 0,001 a 500 mg/kg/día y, en una realización más específica, alrededor de 0,1 a alrededor de 100 mg/kg/día, y, en una realización más específica, alrededor de 0,2 a alrededor de 20 mg/kg/día. Para extrapolar la dosis desde ratones a seres humanos, se puede usar el método de escalado alométrico de Mahmood et al. (Mahmood et al. 2003). La dosis se adaptará por el médico según factores convencionales tales como el grado de la enfermedad y diferentes parámetros del paciente.

La cantidad terapéuticamente efectiva de la sALP dirigida al hueso también se puede medir directamente. La cantidad efectiva se puede dar diariamente o semanalmente, o fracciones de las mismas. Típicamente, una composición farmacéutica de la invención se puede administrar en una cantidad de alrededor de 0,001 mg hasta alrededor de 500 mg por kg de peso corporal por día (por ejemplo, 0,05, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 0,8, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 30 mg, 50 mg, 100 mg, o 250 mg). Las dosis se pueden proporcionar en regímenes de dosificación individual o múltiple. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cantidad efectiva es una dosis que oscila desde alrededor de 0,1 hasta alrededor de 100 mg/kg/día, desde alrededor de 0,2 mg hasta alrededor de 20 mg de la sALP dirigida al hueso por día, alrededor de 1 mg a alrededor de 10 mg de la sALP dirigida al hueso por día, desde alrededor de 0,07 mg hasta alrededor de 210 mg de la sALP dirigida al hueso por semana, 1,4 mg a alrededor de 140 mg de la sALP dirigida al hueso por semana, alrededor de 0,3 mg a alrededor de 300 mg de la sALP dirigida al hueso cada 3 días, alrededor de 0,4 mg a alrededor de 40 mg de la sALP dirigida al hueso en días alternos, y alrededor de 2 mg a alrededor de 20 mg de la sALP dirigida al hueso en días alternos.

Existen simplemente directrices, puesto que la dosis real se debe seleccionar y valorar cuidadosamente por el médico basándose en factores clínicos únicos para cada paciente, o por un nutricionista. La dosis diaria óptima se determinará por métodos conocidos en la técnica, y estará influida por factores tales como la edad del paciente como se indica anteriormente y otros factores clínicamente relevantes. Además, los pacientes pueden tomar medicaciones para otras enfermedades o afecciones. Las otras medicaciones se pueden continuar durante el tiempo en el que se administre una sALP dirigida al hueso, pero es particularmente aconsejable en tales casos comenzar con dosis bajas para determinar si se experimentan efectos secundarios adversos.

Soportes/vehículos

Las preparaciones que contienen una sALP dirigida al hueso se pueden proporcionar a pacientes en combinación con disolventes, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, aceite de pescado, y ésteres orgánicos inyectables. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones de agua-alcohol, incluyendo disolución salina y vehículos parenterales médicos tamponados, incluyendo disolución de cloruro

de sodio, disolución de dextrosa de Ringer, disolución de dextrosa más cloruro de sodio, disolución de Ringer que contiene lactosa, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos pueden incluir reponedores de fluidos y de nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer, y similares.

5 En aún otra realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden suministrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se pueden usar materiales poliméricos, incluyendo polímero láctico, poliortoésteres, copolímeros de bloques anfipáticos reticulados e hidrogeles, polímero hidroxibutírico y polidihidropiranos (véanse también Smolen y Ball, *Controlled Drug Bioavailability, Drug product design and performance*, 1984, John Wiley & Sons; Ranade y Hollinger, *Drug Delivery Systems, pharmacology and toxicology series*, 2003, 2ª edición, CRRP Press); en otra realización, se puede usar una bomba (Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574).

Las proteínas de fusión de la presente invención podrían estar en forma de un polvo liofilizado, usando como diluyentes disoluciones de excipientes apropiados (por ejemplo, sacarosa).

15 Además, los segmentos nucleotídicos o proteínas según la presente invención se pueden introducir en individuos de muchas maneras. Por ejemplo, los osteoblastos se pueden aislar del individuo afectado, se pueden transformar con un constructo nucleotídico según la invención, y se pueden reintroducir en el individuo afectado de muchas maneras, incluyendo la inyección intravenosa. Como alternativa, el constructo nucleotídico se puede administrar directamente al individuo afectado, por ejemplo mediante inyección. El constructo nucleotídico también se puede suministrar a través de un vehículo, tal como un liposoma, que se puede diseñar para ser dirigido hacia un tipo de célula específico, y se puede manipular mediante ingeniería para ser administrado a través de diferentes vías.

20 Las proteínas de fusión de la presente invención también se podrían suministrar ventajosamente a través de terapia génica. Los métodos de terapia génica útiles incluyen aquellos descritos en los documentos WO 6060641A2, US 7179903 y WO 0136620A2 de Genzyme, usando, por ejemplo, un vector adenovírico para la proteína terapéutica, y buscando como dianas a hepatocitos como células productoras de proteína.

25 Un "vehículo de suministro génico" se define como cualquier molécula que puede llevar polinucleótidos insertados a una célula hospedante. Los ejemplos de vehículos de suministro génico son liposomas, polímeros biocompatibles, incluyendo polímeros naturales y polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipéptidos; polisacáridos; lipopolisacáridos; cubiertas víricas artificiales; partículas metálicas; y bacterias o virus, tales como vectores baculovíricos, adenovíricos y retrovíricos, bacteriófagos, cosmídicos, plasmídicos, fúngicos, y otros vehículos de recombinación usados típicamente en la técnica que se han descrito para la expresión en una variedad de eucariotas y procariotas, y que se pueden usar para la terapia génica así como para la expresión proteica simple. "Suministro génico", "transferencia génica", y similares, como se usa aquí, son términos que se refieren a la introducción de un polinucleótido exógeno (algunas veces denominado como un "transgén") en una célula hospedante, independientemente del método usado para la introducción. Tales métodos incluyen una variedad de técnicas bien conocidas, tales como la transferencia génica mediada por vectores (por ejemplo, infección/transfección vírica, u otros diversos complejos de suministro génico a base de proteínas o a base de lípidos), así como técnicas que facilitan el suministro de polinucleótidos "desnudos" (tales como electroporación, suministro mediante "pistola génica", y otras diversas técnicas usadas para la introducción de polinucleótidos). El polinucleótido introducido se puede mantener estable o transitoriamente en la célula hospedante. El mantenimiento estable requiere típicamente que el polinucleótido introducido contenga un origen de replicación compatible con la célula hospedante, o se integre en un replicón de la célula hospedante, tal como un replicón extracromosómico (por ejemplo, un plásmido) o un cromosoma nuclear o mitocondrial. Se sabe que un número de vectores son capaces de mediar la transferencia de genes a células de mamíferos, como es sabido en la técnica y se describe aquí.

45 Un "vector vírico" se define como un virus o partícula vírica producido recombinantemente que comprende un polinucleótido a suministrar a una célula hospedante, ya sea in vivo, ex vivo, o in vitro. Los ejemplos de vectores víricos incluyen vectores retrovíricos, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados, tales como los descritos en el documento WO 06002203 A2, vectores alfavíricos, y similares. También se han desarrollado vectores alfavíricos, tales como los vectores a base del virus del bosque de Semliki y vectores a base del virus Sindbis, para uso en terapia génica e inmunoterapia.

50 En aspectos en los que la transferencia génica está mediada por un vector vírico de ADN, tal como un adenovirus (Ad) o un virus adenoasociado (MVs), un constructo vectorial se refiere al polinucleótido que comprende el genoma vírico o parte del mismo, y un transgén, los adenovirus (Ads) son un grupo de virus homogéneo, relativamente bien caracterizado, que incluye alrededor de 50 serotipos. Véase, por ejemplo, la Solicitud Internacional PCT nº WO 95/27071. Los Ads son fáciles de hacer crecer, y no requieren integración en el genoma de la célula hospedante. También se han construido vectores derivados de Ad recombinante, particularmente aquellos que reducen el potencial de recombinación y generación del virus de tipo salvaje. Véanse las Solicitudes Internacionales PCT nºs WO 95/00655 y WO95/11984. Los vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de clonación en el que se puede enlazar operativamente un polinucleótido son bien conocidos en la técnica. Tales vectores son capaces de transcribir ARN in vitro o in vivo, y están comercialmente disponibles de fuentes tales como Stratagene (La Jolla, CA) y Promega Biotech (Madison, WI). A fin de optimizar la expresión y/o la transcripción in vitro, puede ser necesario eliminar, añadir o alterar porciones no traducidas de 5' y/o 3' de los clones para eliminar codones de iniciación de la

traducción extras, potenciales, inapropiados, alternativos, u otras secuencias que puedan interferir con o reduzcan la expresión, ya sea a nivel de la transcripción o de la traducción.

La sALP dirigida al hueso de la presente invención también se puede usar en combinación con al menos algún otro ingrediente activo para corregir un defecto de mineralización ósea u otro síntoma perjudicial de HPP. También se puede usar en combinación con al menos algún otro ingrediente activo para corregir el defecto del cemento.

La expresión "condiciones de restricción elevada" se refiere a condiciones que permiten que las secuencias se unan con una homología elevada. Sin estar limitados de esta manera, los ejemplos de tales condiciones se dan en el manual "Molecular Cloning, a laboratory manual, segunda edición de 1989 de Sambrook et al.: 6XSSC o 6XSSPE, reactivo de Denhardt o no, 0,5% de SDS, y la temperatura usada para obtener condiciones de restricción elevada es muy a menudo alrededor de 68°C (véanse las páginas 9.47 a 9.55 de Sambrook) para un ácido nucleico de 300 a 1500 nucleótidos. Aunque la temperatura óptima a usar para una sonda de ácido nucleico específica se puede calcular empíricamente, y aunque hay cabida para alternativas en las condiciones del tampón seleccionadas, dentro de estos intervalos de condiciones bien conocidos, el ácido nucleico capturado no variará significativamente. De hecho, Sambrook indica claramente que "la elección depende en gran medida de la preferencia personal" (véase la página 9.47). Sambrook especifica que la fórmula para calcular la temperatura óptima que varía según la fracción de guanina y citosina en la sonda de ácido nucleico y la longitud de la sonda (10 a 20°C menor que T_m , en el que $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 (\text{fracción de G} + \text{C}) - 0,63 (\% \text{ de formamida} - (600/\text{l}))$) (véanse las páginas 9.50 y 9.51 de Sambrook).

Kits

La presente invención también se refiere a un kit para corregir o evitar un fenotipo de HPP o un defecto de cemento, que comprende un ácido nucleico, una proteína o un ligando según la presente invención. Por ejemplo, puede comprender una composición dirigida al hueso de la presente invención o un vector que codifica la misma, e instrucciones para administrar dicha composición o vector a un sujeto para corregir o evitar un fenotipo de HPP. Tales kits pueden comprender además al menos algún otro agente activo capaz de evitar o corregir un fenotipo de HPP. Cuando el kit se usa para evitar o corregir un fenotipo de HPP en un sujeto con HPP; el kit también puede comprender además al menos algún otro agente activo capaz de evitar o corregir cualesquiera otros síntomas perjudiciales de HPP. Además, un kit compartimentalizado según la presente invención incluye cualquier kit en el que los reactivos están contenidos en recipientes separados. Tales recipientes incluyen recipientes de vidrio pequeños, recipientes de plástico o tiras de plástico o de papel. Tales recipientes permiten la transferencia eficiente de reactivos desde un compartimiento a otro compartimiento, de manera que las muestras y los reactivos no se contaminen de forma cruzada, y los agentes o disoluciones de cada recipiente se pueden añadir de manera cuantitativa desde un compartimiento a otro.

Más específicamente, según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una fosfatasa alcalina dirigida al sitio que comprende un polipéptido que tiene la estructura: Z-sALP-Y-espaciador-X-Wn-V, en la que sALP consiste en los restos de aminoácidos 18-502 de Sec ID No. 8; en la que V está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido; 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 Wn es un poliaspartato o un poliglutamato en el que $n = 10$ a 16, y el espaciador comprende una región de fragmento cristalizante (Fc).

Se describe que la sALP comprende restos de aminoácidos 23-508 de SEC ID NO: 15. También se describe que la sALP consiste en restos de aminoácidos 23-512 de SEC ID NO: 15. También se describe que la sALP comprende restos de aminoácidos 23-508 de SEC ID NO: 18. También se describe que la sALP consiste en restos de aminoácidos 23-512 de SEC ID NO: 18. También se describe que la sALP comprende restos de aminoácidos 18-498 de SEC ID NO: 16. También se describe que la sALP consiste en restos de aminoácidos 18-502 de SEC ID NO: 16. También se describe que la sALP comprende restos de aminoácidos 18-498 de SEC ID NO: 19. También se describe que la sALP consiste en restos de aminoácidos 18-502 de SEC ID NO: 19. También se describe que la sALP comprende restos de aminoácidos 18-498 de SEC ID NO: 19. También se describe que la sALP consiste en restos de aminoácidos 18-502 de SEC ID NO: 19. También se describe que la sALP comprende restos de aminoácidos 18-498 de SEC ID NO: 8. Según la presente invención, la sALP consiste en restos de aminoácidos 18-502 de SEC ID NO: 8.

Según la presente invención, el espaciador comprende una región de fragmento cristalizante (Fc). En una realización específica, el Fc comprende un dominio CH2, un dominio CH3 y una región de bisagra. En otra realización específica, el Fc es un dominio constante de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste en IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-3 e IgG-4. En otra realización específica, el Fc es un dominio constante de una inmunoglobulina IgG-1. En otra realización específica, el Fc es como se expone en SEC ID NO: 3. En otra realización específica, Wn es un poliaspartato. En otra realización específica, $n = 10$. En otra realización específica, Z está ausente. En otra realización específica, Y es un resto de dos aminoácidos. En otra realización específica, Y es leucina-lisina. En otra realización específica, X es un resto de 2 aminoácidos. En otra realización específica, X es aspartato-isoleucina. En otra realización específica, V está ausente. En otra realización específica, el polipéptido es como se expone en SEC ID NO: 4.

En otra realización específica, la fosfatasa alcalina dirigida al hueso comprende polipéptido en una forma que comprende un dímero. En otra realización específica, la fosfatasa alcalina dirigida al hueso comprende el polipéptido en forma de un tetrámero.

5 En otra realización específica, la fosfatasa alcalina dirigida al hueso está en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización específica, el vehículo farmacéuticamente aceptable es una disolución salina. En otra realización específica, la fosfatasa alcalina dirigida al hueso está en forma liofilizada. En otra realización específica, la fosfatasa alcalina dirigida al hueso está en una dosis diaria de alrededor de 0,2 a alrededor de 20 mg/kg. En otra realización específica, la fosfatasa alcalina dirigida al hueso está en una dosificación de alrededor de 0,6 a alrededor de 60 mg/kg para la administración cada tres días. En otra realización específica, la fosfatasa alcalina dirigida al hueso está en una dosificación semanal de alrededor de 1,4 a alrededor de 140 mg/kg. En otra realización específica, la fosfatasa alcalina dirigida al hueso está en una dosificación semanal de alrededor de 0,5 mg/kg.

Más específicamente, según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia que codifica el polipéptido de la presente invención.

15 Según otro de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico aislado que consiste en una secuencia que codifica el polipéptido de la presente invención. Más específicamente, según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia como se expone en SEC ID NO: 17.

20 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico de la presente invención. Más específicamente, según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un vector vírico adenoasociado recombinante que comprende el ácido nucleico de la presente invención. Más específicamente, según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una célula hospedante recombinante aislada, transformada o transfectada con el vector de la presente invención.

25 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir la fosfatasa alcalina dirigida al hueso de la presente invención, que comprende cultivar la célula hospedante de la presente invención, en condiciones adecuadas para efectuar la expresión de la fosfatasa alcalina dirigida al hueso, y recuperar del medio de cultivo la fosfatasa alcalina dirigida al hueso.

En una realización específica, la célula hospedante es una célula L, célula C127, célula 3T3, célula CHO, célula BHK, célula COS-7 o una célula de ovario de hámster chino (CHO). En otra realización específica, la célula hospedante es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En una realización específica, la célula hospedante es una célula CHO-DG44.

30 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit que comprende la fosfatasa alcalina dirigida al hueso de la presente invención, e instrucciones para administrar el polipéptido a un sujeto para corregir o evitar un fenotipo de hipofosfatasa (HPP).

35 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit que comprende la fosfatasa alcalina dirigida al hueso de la presente invención, e instrucciones para administrar el polipéptido a un sujeto para corregir o evitar aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para usar la fosfatasa alcalina dirigida al hueso de la presente invención para corregir o evitar al menos un fenotipo de hipofosfatasa (HPP), que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la fosfatasa alcalina dirigida al hueso a un sujeto que lo necesite, con lo que el al menos un fenotipo de HPP se corrige o se evita en el sujeto.

40 En una realización específica, el sujeto tiene al menos un fenotipo de HPP. En otra realización específica, es probable que el sujeto desarrolle al menos un fenotipo de HPP. En otra realización específica, el al menos un fenotipo de HPP comprende ataque relacionado con HPP. En otra realización específica, el al menos un fenotipo de HPP comprende pérdida prematura de dientes de leche. En otra realización específica, el al menos un fenotipo de HPP comprende mineralización ósea incompleta. En otra realización específica, la mineralización ósea incompleta es mineralización incompleta del hueso femoral. En otra realización específica, la mineralización ósea incompleta es mineralización incompleta del hueso tibial. En otra realización específica, la mineralización ósea incompleta es mineralización incompleta del hueso metatarsiano. En otra realización específica, la mineralización ósea incompleta es mineralización incompleta de los huesos de las costillas. En otra realización específica, el al menos un fenotipo de HPP comprende niveles elevados en sangre y/u orina de pirofosfato inorgánico (PPi). En otra realización específica, el al menos un fenotipo de HPP comprende niveles elevados en sangre y/u orina de fosfoetanolamina (PEA). En otra realización específica, el al menos un fenotipo de HPP comprende niveles elevados en sangre y/u orina de 5'-fosfato de piridoxal (PLP). En otra realización específica, el al menos un fenotipo de HPP comprende una ganancia de peso inadecuada. En otra realización específica, el al menos un fenotipo de HPP comprende raquitismo. En otra realización específica, el al menos un fenotipo de HPP comprende dolor óseo. En otra realización específica, el al menos un fenotipo de HPP comprende deposición de cristales de pirofosfato cálcico dihidratado. En otra realización específica, el al menos un fenotipo de HPP comprende aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental. En otra realización específica, el sujeto que lo necesite tiene HPP de lactante. En otra realización específica, el sujeto que lo necesite tiene HPP

perinatal. En otra realización específica, el sujeto que lo necesite tiene HPP del adulto. En otra realización específica, el sujeto que lo necesite tiene HPP de odontohipofosfatasa.

5 Se describe un método para usar la fosfatasa alcalina dirigida al hueso de la presente invención, para corregir o evitar aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la fosfatasa alcalina dirigida al hueso a un sujeto que lo necesite, con lo que se corrige o se evita la aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental en el sujeto.

10 En una realización específica, la administración comprende transfectar una célula en el sujeto con un ácido nucleico que codifica la fosfatasa alcalina. En otra realización específica, la transfección de la célula se lleva a cabo *in vitro*, de manera que la fosfatasa alcalina dirigida al hueso es expresada y segregada en forma activa, y es administrada al sujeto por dicha célula. En otra realización específica, la administración comprende la administración subcutánea de la fosfatasa alcalina dirigida al hueso al sujeto. En otra realización específica, la administración comprende la administración intravenosa de la fosfatasa alcalina dirigida al hueso al sujeto.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona la fosfatasa alcalina dirigida al hueso de la presente invención, para uso para corregir o evitar al menos un fenotipo de HPP.

15 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona la fosfatasa alcalina dirigida al hueso de la presente invención, para uso para corregir o evitar aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de la fosfatasa de la presente invención, para obtener un medicamento.

20 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un uso de la fosfatasa alcalina dirigida al hueso de la presente invención, para corregir o evitar al menos un fenotipo de HPP.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un uso de la fosfatasa alcalina dirigida al hueso de la presente invención, para corregir o evitar aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

En los dibujos anejos:

25 La Figura 1 presenta el diseño y estructura esquemática de la ALP dirigida al hueso de la presente invención ejemplificada mediante hTNALP-FcD10. El panel A presenta una representación esquemática del producto de traducción primario completo del gen de la fosfatasa alcalina no específico de tejido humano (TNALP) que incluye el péptido señal N-terminal y la señal anclada a membrana transitoria para la adición de GPI. El panel B representa el producto de la traducción primario de la proteína de fusión. El panel C presenta el producto de la traducción primario que carece del péptido señal de TNALP escindible;

la Figura 2 presenta la secuencia proteica para hTNALP-FcD10 ((SEC ID NO: 1), incluyendo la señal peptídica N-terminal -17 primeros aa), en la que la porción de hTNALP (SEC ID NO: 2) está en cursiva, incluyendo la porción de la señal peptídica mostrada en cursiva y subrayada, y el fragmento de Fc está subrayado (SEC ID NO: 3);

35 la Figura 3 presenta la secuencia proteica para la hTNALP-FcD10 usada en los Ejemplos presentados aquí (SEC ID NO: 4) (sin la señal peptídica N-terminal), en la que la porción de hTNALP (SEQ ID NO: 5) está en cursiva, y el fragmento de Fc está subrayado (SEC ID NO: 3). Los restos de asparagina (N) doblemente subrayados corresponden a sitios de N-glucosilación putativos, y los restos de aminoácidos en negrita (LK y DI) corresponden a los ligadores entre hTNALP y Fc, y Fc y los dominios de D10 respectivamente. Estos ligadores derivan de sitios de restricción de endonucleasas introducidos durante la manipulación del ADNc;

40 la Figura 4 presenta gráficamente la expresión comparativa de sTNALP-D10 y sTNALP-FcD10 en células CHO-DG44;

45 la Figura 5 presenta la purificación de sTNALP-FcD10 en cromatografía de tamiz molecular de proteína A-Sepharose en Sephacryl™ 3-300 así como el análisis de SDS-PAGE de sTNALP-FcD10 purificada en condiciones reductoras (DTT +) y no reductoras (DTT-). También se presenta una versión esquematizada de sTNALP-FcD10. La proteína purificada mediante cromatografía de afinidad de proteína A-Sepharose™ se analizó mediante SDS-PAGE, y las bandas se tiñeron con Sypro™ Ruby. Las especies principales de sTNALP-FcD10 migraron con una masa molecular aparente de 90.000 Da en condiciones reductoras, y 200.000 Da en condiciones no reductoras;

la Figura 6 presenta la posición del sitio de escisión de papaína en sTNALP-FcD10;

50 la Figura 7 presenta un análisis de SEC-HPLC no desnaturante de sTNALP-FcD10 en una columna de TSK-Gel G3000WXL. Curva normal: muestra digerida con papaína. Curva -X-: idéntica muestra incubada en las mismas condiciones sin papaína (control);

la Figura 8 presenta un análisis de SDS-PAGE de sTNALP-FcD10 incubada con o sin papaína que muestra qué

fragmento es responsable para qué banda en el gel. El análisis se llevó a cabo en condiciones reductoras (+ DTT) o no reductoras (- DTT);

5 la Figura 9 presenta un ensayo de unión *in vitro*. sTNALP-FcD10 y fosfatasa alcalina no específica de tejido de riñón se compararon en el ensayo de unión mineral reconstituido, como se describe en el Ejemplo 2. La actividad total es la suma de la actividad enzimática recuperada en las fracciones libres y unidas. Se encontró que la actividad total fue 84% y 96% de la cantidad inicial de la actividad enzimática introducida en cada conjunto de ensayos para las formas bobina y sTNALP-FcD10 de la enzima, respectivamente. Los resultados son la media de dos uniones;

10 la Figura 10 presenta los perfiles farmacocinéticos y de distribución de sTNALP-FcD10 en suero, tibia y músculo de ratones WT adultos. Las concentraciones de sTNALP-FcD10 en suero, tibia y músculo se expresan en $\mu\text{g/g}$ de tejido (peso húmedo) después de una única inyección intravenosa de bolo de 5 mg/kg en ratones WT adultos;

la Figura 11 presenta el perfil farmacocinético de la concentración sérica de sTNALP-FcD10 en ratones WT neonatos. Concentraciones séricas de sTNALP-FcD10 en función del tiempo después de una única inyección i.p. (panel A) o s.c. (panel B) de 3,7 mg/kg en ratones WT neonatos (1 día);

15 la Figura 12 presenta el perfil farmacocinético predicho de sTNALP-FcD10 en suero. Niveles de estado estacionario circulantes máximos (C_{max}) y mínimos (C_{min}) predichos de sTNALP-FcD10 después de inyecciones subcutáneas repetidas (cada 24 h) de 10 mg/kg en ratones neonatos;

20 la Figura 13 presenta el perfil farmacocinético ensayado experimentalmente de sTNALP-FcD10 en el suero de ratones neonatos. Niveles de estado estacionario circulantes mínimos (C_{min}) medidos de sTNALP-FcD10 24 h después de la última inyección subcutánea de 10 mg/kg en ratones neonatos. Homo: homocigoto, hetero: heterocigoto;

la Figura 14 presenta los resultados de eficacia de dosis baja (1 mg/kg), a corto plazo (15 días), en términos de concentraciones séricas de sTNALP-FcD10 en ratones $\text{Akp2}^{-/-}$ tratados. Concentraciones séricas de sTNALP-FcD10 en el día 16 de los ratones tratados durante 15 días con inyecciones diarias s.c. de 1 mg/kg de sTNALP-FcD10;

25 la Figura 15 presenta los resultados de eficacia a corto plazo (15 días), de dosis baja (1 mg/kg), en términos de concentraciones séricas de PPI en ratones $\text{Akp2}^{-/-}$ tratados. Medida de las concentraciones séricas de PPI. Fue suficiente una dosis baja de 1 mg/kg para normalizar los niveles de PPI en ratones tratados con ERT.

30 la Figura 16 presenta los resultados de eficacia a corto plazo (15 días), de dosis baja (1 mg/kg), en términos de la morfología fisaria en ratones $\text{Akp2}^{-/-}$ tratados. Tinción con tricromo de Goldner de placas de crecimiento de ratones WT, $\text{Akp2}^{-/-}$ sin tratar y tratados. Las placas de crecimiento tibiales proximales (fisis) mostraron un ensanchamiento excesivo de la zona hipertrófica en ratones $\text{Akp2}^{-/-}$ inyectados tanto con sTNALP-FcD10 como con vehículo, consistente con raquitismo prematuro. Sin embargo, la morfología fisaria pareció menos perturbada en los animales tratados con sTNALP-FcD10;

35 la Figura 17 presenta resultados de eficacia a corto plazo (15 días), de dosis baja (1 mg/kg), en términos del tamaño de área hipertrófica fisaria de ratones $\text{Akp2}^{-/-}$ tratados. El tamaño del área hipertrófica de la placa de crecimiento se expresa como un porcentaje del área de la placa de crecimiento total. Obsérvese la normalización del área hipertrófica en ratones tratados;

la Figura 18 presenta resultados de eficacia a corto plazo (15 días), de dosis alta (8,2 mg/kg), en términos de peso corporal en ratones $\text{Akp2}^{-/-}$ tratados. Efecto de sTNALP-FcD10 sobre el peso corporal;

40 la Figura 19 presenta los resultados de eficacia a corto plazo (15 días), de dosis alta (8,2 mg/kg), en términos de longitud de huesos largos en ratones $\text{Akp2}^{-/-}$ tratados. Efecto de sTNALP-FcD10 sobre la longitud del fémur y de la tibia (mediciones realizadas en el día 16);

la Figura 20 presenta resultados de eficacia a corto plazo (15 días), de dosis alta (8,2 mg/kg), en términos de concentración sérica de sTNALP-FcD10 en ratones $\text{Akp2}^{-/-}$ tratados. Concentraciones séricas de sTNALP-FcD10 en el día 16 de ratones tratados durante 15 días con inyecciones diarias s.c. de 8,2 mg/kg de sTNALP-FcD10;

45 la Figura 21 presenta los resultados de eficacia a corto plazo (15 días), de dosis alta (8,2 mg/kg), en términos de mineralización de huesos en ratones $\text{Akp2}^{-/-}$ tratados. Análisis de rayos X de pies, cajas torácicas y extremidades posteriores de ratones $\text{Akp2}^{-/-}$ (16 días) y una tabla de distribución de imágenes de Faxitron™. Los pies y las cajas torácicas se clasificaron como graves, moderadas o sanas para tener en cuenta el grado de los defectos de mineralización ósea. Las patas se clasificaron simplemente como anormales (al menos un defecto) o sanas (sin defecto visible);

50 la Figura 22 presenta los resultados de eficacia a corto plazo (15 días), de dosis alta (8,2 mg/kg), en términos de defectos en los dientes en ratones $\text{Akp2}^{-/-}$ tratados. Análisis histológico de los dientes de ratones $\text{Akp2}^{-/-}$ a los que se les inyectó vehículo o sTNALP-FcD10, y ratones de tipo salvaje. Se prepararon secciones delgadas y se tiñeron como se describe en Millan et al. PDL = ligamento periodontal;

la Figura 23 presenta los resultados de eficacia a largo plazo (52 días), de dosis alta (8,2 mg/kg), en términos de supervivencia en ratones Akp2^{-/-} tratados. Supervivencia a largo plazo de ratones Akp2^{-/-} tratados con sTNALP-FcD10 comparados con el fallecimiento temprano de Akp2^{-/-} tratados sólo con el vehículo de control;

5 la Figura 24 presenta los resultados de eficacia a largo plazo (52 días), de dosis alta (8,2 mg/kg), en términos de tamaño, movilidad y aspecto en ratones Akp2^{-/-} tratados. El tratamiento normaliza el tamaño, la movilidad y el aspecto de ratones Akp2^{-/-} tratados. Para comparación, se muestra un ratón no tratado de la misma camada;

la Figura 25 presenta los resultados de eficacia a largo plazo (52 días), de dosis alta (8,2 mg/kg), en términos de mineralización y longitud de huesos en ratones Akp2^{-/-} tratados. Imágenes de rayos X de los huesos metatarsianos de ratones Akp2^{-/-} tratados de 46 y 53 días en comparación con ratones WT;

10 la Figura 26 presenta los resultados de eficacia a largo plazo (52 días), de dosis alta (8,2 mg/kg), en términos de concentración sérica de sTNALP-FcD10 en ratones Akp2^{-/-} tratados. Concentración sérica de sTNALP-FcD10 en el día 53 de ratones tratados durante 52 días con inyecciones diarias s.c. de 8,2 mg/kg de sTNALP-FcD10;

15 la Figura 27 presenta A) curvas de supervivencia de ratones Akp2^{-/-} que reciben sTNALP-FcD10 a dosis de 4,3 mg/kg diariamente (Tx-1) o 15,2 mg/kg cada 3 días (Tx-3) o 15,2 mg/kg cada semana (Tx-7), y B) supervivencia media para cada uno de estos regímenes. La supervivencia de los ratones tratados se comparó con la supervivencia de los ratones a los que se les inyectó vehículo;

20 la Figura 28 presenta A) curvas de supervivencia de ratones Akp2^{-/-} que reciben sTNALP-FcD10 a dosis de 8,2 mg/kg diariamente (RTx) comenzando el día 15 después del nacimiento, y B) supervivencia media para ratones tratados e inyectados con vehículo. La supervivencia de los ratones tratados se comparó con la supervivencia de los ratones a los que se les inyectó el vehículo (RVehículo);

la Figura 29 presenta los efectos sobre el peso corporal de dosis diarias de 8,2 mg/kg de sTNALP-FcD10 inyectadas a ratones Akp2^{-/-} (RTx) comenzando en el día 15 después del nacimiento. Los pesos corporales diarios se compararon con los de los ratones Akp2^{-/-} inyectados con vehículo (RVehículo) o hermanos de camada de tipo salvaje (WT);

25 la Figura 30 presenta un alineamiento de diversas ALPs establecido mediante alineamiento de secuencias múltiples de CLUSTAL™ W (1.82), a saber, una secuencia de TNALP bovina (SEC ID NO: 6); una secuencia de TNALP de gato (SEC ID NO: 7); una secuencia de TNALP humana (SEC ID NO: 8); una secuencia de TNALP de ratón (SEC ID NO: 9); una secuencia de TNALP de rata (SEC ID NO: 10); y una secuencia de TNALP de perro parcial (SEC ID NO: 11), en la que la naturaleza de los primeros 22 restos de aminoácidos es desconocida; una IALP humana (SEC ID NO: 12) (nº de acceso: NP_001622), una GCALP humana (SEC ID NO: 13) (nº de acceso: P10696), y una PLALP humana (SEC ID NO: 14) (nº de acceso: NP_112603). "*" representa que los restos en esa columna son idénticos en todas las secuencias del alineamiento, ":" representa que se han observado sustituciones conservadas, y "." representa que se han observado sustituciones semiconservadas. También se presenta una secuencia de consenso derivada de este alineamiento (SEC ID NO: 15), en la que x es cualquier aminoácido;

35 la Figura 31 presenta un alineamiento de las TNALPs procedentes de diversas especies establecido mediante alineamiento de secuencias múltiples de CLUSTAL™ W (1.82), a saber, la secuencia bovina (SEC ID NO: 6); la secuencia de gato (SEC ID NO: 7); la secuencia humana (SEC ID NO: 8); la secuencia de ratón (SEC ID NO: 9); la secuencia de rata (SEC ID NO: 10); y una secuencia de perro parcial (SEC ID NO: 11), en la que la naturaleza de los primeros 22 restos de aminoácidos es desconocida. "*" representa que los restos en esa columna son idénticos en todas las secuencias del alineamiento, ":" representa que se han observado sustituciones conservadas, y "." representa que se han observado sustituciones semiconservadas. También se presenta una secuencia de consenso derivada de este alineamiento (SEC ID NO: 16), en la que x es cualquier aminoácido; y

la Figura 32 presenta la secuencia de ácido nucleico (SEC ID NO: 17) que codifica la secuencia polipeptídica descrita en la Figura 1.

45 DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

Los ejemplos proporcionados más abajo presentan el primer tratamiento con éxito de ratones con TNALP inactivada (Akp2^{-/-}) usando inyecciones subcutáneas de una forma recombinante de ALP. Los ratones Akp2^{-/-} recapitulan la forma grave, a menudo letal, de hipofosfatasa de lactantes.

50 Se usó el modelo murino sin TNSALP homocigoto bien descrito, que refleja muchas de las anomalías esqueléticas y bioquímicas asociadas con HPP de lactantes. Los ratones se trataron con una nueva forma recombinante soluble de TNSALP humana manipulada mediante ingeniería en su término carboxi para que contenga un espaciador en la forma de región de fragmento cristalino (Fc) de IgG-1 humana fusionado a una secuencia dirigida al hueso compuesta de diez restos de ácido aspártico secuenciales (D10). Se mostró que, con relación a TNSALP nativa purificada de riñón, la forma recombinante modificada de la enzima se une a hidroxapatita mucho más ávidamente, a la vez que retiene su actividad enzimática. El tratamiento con la TNSALP recombinante de la presente invención normalizó sorprendentemente los niveles plasmáticos de PPI, y mejoró la mineralización de los

pies, tórax, extremidades posteriores y dentición de ratones homocigotos con mutación anuladora cuando se compara con aquellos que recibieron el vehículo solo. El tratamiento también mostró que prolonga la supervivencia, con casi una normalización radiográfica del fenotipo esquelético.

Además de su efecto terapéutico *in vivo* beneficioso, se descubrió sorprendentemente que la forma activa recombinante de la enzima modificada que contiene un espaciador es expresada en niveles mayores que su contraparte recombinante que carece de tal espaciador. Además, se demostró que la enzima funciona como un tetrámero.

La presente invención se ilustra con más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

Expresión y purificación de sTNALP-FcD10 recombinante

A fin de facilitar la expresión y purificación de TNALP recombinante, se eliminó la secuencia C-terminal hidrófoba, que especifica la unión del anclaje de GPI en TNALP, para hacerla una enzima segregada soluble (Di Mauro et al. 2002). La secuencia codificante del ectodominio de TNALP también se extendió con la región de Fc de la IgG humana (forma γ^1 (IgG1), Swiss-Prot P01857). Esto permitió una purificación rápida de la enzima recombinante en cromatografía de Proteína A, y sorprendentemente su expresión incrementada. Además, para dirigir la TNALP recombinante al tejido óseo, se unió una secuencia de diez aspartatos (D10) al C-terminal de la región de Fc. Esta forma quimérica de TNALP, denominada sTNALP-FcD10, retiene una actividad enzimática completa tanto cuando se ensaya a pH 9,8 usando el sustrato artificial fosfato de p-nitrofenilo, como cuando se ensaya a pH 7,4 usando pirofosfato inorgánico (PPI), como el sustrato fisiológico. Como en la forma de origen natural de TNALP, el péptido señal N-terminal se separó por escisión durante la translocación cotraduccional de la proteína a través del retículo endoplásmico rugoso. Su diseño y estructura se ilustra esquemáticamente en la Figura 1. En la Figura 2 se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión (incluyendo el péptido señal). La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión tal como se segrega (es decir, sin el péptido señal) se muestra en la Figura 3.

El método que se usó para construir esta proteína de fusión es el siguiente. El ADNc que codifica la proteína de fusión (véase la Figura 32) se insertó en el vector pIRES (Clontech™) en el primer sitio de clonación múltiple situado en dirección 5' del IRES usando sitios de restricción de endonucleasas NheI y BamHI. Se insertó el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) en el segundo sitio de clonación múltiple localizado en dirección 3' del IRES usando sitios de restricción de endonucleasas SmaI y XbaI. El vector resultante se transfectó en células de ovario de hámster chino (CHO-DG44) que carecen de ambos alelos del gen de DHFR (Urlaub et al. 1983, obtenido de Dr. Lawrence A. Chasin, Columbia University) usando el kit de transfección de Lipofectamine™ (Invitrogen). Dos días después de la transfección, el medio se cambió, y las células se mantuvieron en un medio libre de nucleótidos (IMDM suplementado con 5% de FBS dializado) durante 15 días para aislar transfectantes estables para la clonación en placas.

Las células procedentes de los tres clones mejores o las cinco seleccionadas originalmente que crecen en el medio libre de nucleótidos se reunieron y se cultivaron adicionalmente en medio (IMDM + 5% de FBS dializado) que contiene una concentración creciente de metotrexato (MTX). Los cultivos resistentes a 50 nM de MTX se expandieron adicionalmente en Cellstacks™ (Corning) que contiene medio IMDM suplementado con 5% de FBS. Para alcanzar la confluencia, la capa celular se enjuagó con disolución salina tamponada con fosfato (PBS), y las células se incubaron durante tres días adicionales con IMDM que contiene 3,5 mM de butirato de sodio, para incrementar la expresión proteica. Al final del cultivo, la concentración de sTNALP-FcD10 en el medio gastado fue 3,5 mg/l, según se evalúa midiendo la actividad enzimática de TNALP.

Los niveles de sALP-FcD10 en el medio gastado se cuantificaron usando un ensayo colorimétrico para la actividad de ALP, en el que la absorbancia de p-nitrofenol liberado es proporcional a los productos de reacción. La reacción se produjo en 100 μ l de tampón de ALP (20 mM de Bis Tris Propano (HCl) pH 9, 50 mM de NaCl, 0,5 mM de MgCl₂, y 50 μ M de ZnCl₂) que contiene 10 μ l de medio gastado diluido y 1 mM de pNPP. Este último compuesto se añadió el último para iniciar la reacción. La absorbancia se registró a 405 nm cada 45 segundos durante 20 minutos, usando un lector de placas espectrofotométrico. La actividad catalítica de sTNALP-FcD10, expresada como una velocidad inicial, se evaluó ajustando la pendiente más inclinada para 8 valores secuenciales. Se prepararon patrones con concentraciones variables de sALP-FcD10, y la actividad de ALP se determinó como antes. La curva patrón se generó representando gráficamente el Log de la velocidad inicial en función del Log de las concentraciones patrón. La concentración de sTNALP-FcD10 en las diferentes muestras se leyó a partir de la curva patrón usando su absorbancia de ALP respectiva. Las medidas de actividad se transformaron en concentraciones de sALP-FcD10 usando una curva de calibración obtenida representando gráficamente la actividad de concentraciones conocidas de enzima recombinante purificada.

El sobrenadante del cultivo se concentró entonces y se dializó frente a PBS usando filtración de flujo tangencial, y se cargó en una columna MabSelect SuRe™ (GE Health Care) equilibrada con 150 mM de NaCl, 10 mM de fosfato de sodio PO₄. Las proteínas unidas se eluyeron con 50 mM de tampón de Tris pH 11, pH 11,0. Las fracciones recogidas se ajustaron a pH 8-9 con 200 mM de Tris-HCl pH 5,5. Las fracciones que contienen la mayoría del material eluido

se dializaron frente a tampón de 150 mM de NaCl, 25 mM de fosfato de sodio PO_4 pH 7,4 que contiene 0,1 mM de MgCl_2 , 20 μM de ZnCl_2 , y se filtraron en una membrana de 0,22 μm (Millipore, Millex-GP™) en condiciones estériles. El rendimiento global del procedimiento de purificación fue 50%, con una pureza por encima de 95% como se evalúa mediante SDS-PAGE teñido con Sypro™ ruby. La preparación purificada de sTNALP-FcD10 se almacenó a 4°C, y permaneció estable durante varios meses.

También se ensayó con éxito la siguiente técnica de purificación. El sobrenadante del cultivo se concentró y se dializó frente a PBS usando filtración de flujo tangencial, y se cargó en una columna de Proteína A-Sepharose™ (Hi-Trap™ 5 ml, GE Health Care) equilibrada con PBS. Las proteínas unidas se eluyeron con 100 mM de tampón de citrato pH 4,0. Las fracciones recogidas se ajustaron inmediatamente a pH 7,5 con 1 M de Tris pH 9,0. Las fracciones que contienen la mayoría del material eluido se dializaron frente a tampón de 150 mM de NaCl, 25 mM de fosfato de sodio PO_4 , pH 7,4, que contiene 0,1 mM de MgCl_2 , 20 μM de ZnCl_2 , y se filtraron en una membrana de 0,22 μm (Millipore, Millex-GP™) en condiciones estériles. El rendimiento global del procedimiento de purificación fue 50%, con una pureza por encima de 95% como se evalúa mediante SDS-PAGE teñido con Sypro™ ruby. La preparación purificada de sTNALP-FcD10 se almacenó a 4°C, y permaneció estable durante varios meses.

El número de copias del gen de sTNALP-FcD10 se incrementó cultivando células CHO-DG44194 transfectadas en presencia de concentración creciente de metotrexato. Los clones de células resistentes a 100 nM de metotrexato se aislaron y evaluaron para determinar su capacidad para producir sTNALP-FcD10 con rendimiento elevado. Los mejores productores se adaptaron a cultivo en suspensión en medio Hyclone™ SFM4CHO™ (nº de catálogo SH30549) en ausencia de suero fetal bovino. Los cultivos que mantuvieron un rendimiento de producción elevado en esas condiciones se transfirieron a bolsas de biorreactores desechables Wave™. El medio (25 l de volumen total) se sembró a una densidad de $0,4 \times 10^6$ células por ml. La temperatura del cultivo se mantuvo a 37°C hasta que la densidad celular alcanzó 2×10^6 células/ml. La temperatura se redujo entonces hasta 30°C, y el cultivo se suplementó con 125 ml de pienso genérico de CHO (Sigma, C1615). Se encontró que esas condiciones ralentizan la división celular e incrementan la secreción de producto en el medio de cultivo. Estas condiciones se mantuvieron durante 6 días antes de cosechar el sobrenadante del cultivo celular que contiene sTNALP-FcD10 segregada.

EJEMPLO 2

Expresión comparativa de sTNALP-D10 y sTNALP-FcD10

Los vectores plasmídicos que codifican sTNALP-FcD10 o sTNALP-D10 se transfectaron en células CHO-DG44 usando Lipofectamine™, y se hicieron crecer en medio selectivo (es decir, desprovisto de nucleótidos) diseñado para promover la supervivencia de células que expresan el gen de DHFR como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Los transfectantes estables se aislaron mediante clonación en placas, y se clasificaron según su nivel de expresión proteica usando el ensayo enzimático de fosfatasa alcalina descrito también en el Ejemplo 1 anterior. El cribado permitió la identificación de un clon solamente para sTNALP-D10 (0,120 pg/célula/día) y cinco clones para sTNALP-FcD10 (0,377, 0,258, 0,203, 0,099 y 0,088 pg/célula/día). La amplificación del gen de metotrexato (MTX) se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1 anterior (oscilando MTX desde 0 hasta 100 mM), y se permitió un incremento de la expresión de 8 veces para sTNALP-FcD10, mientras que no se observó amplificación con los cultivos de sTNALP-D10 (véase la Figura 4). Usando un procedimiento similar para el desarrollo de la estirpe celular, se encontró inesperadamente que la proteína sTNALP-FcD10 fue más fácil de expresar en comparación con sTNALP-D10 (véase la Figura 4).

EJEMPLO 3

Caracterización de sTNALP-FcD10

sTNALP-FcD10 se purificó en primer lugar en Proteína-A Sepharose™, y se analizó en SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras.

En condiciones reductoras, migró como una banda amplia con una masa molecular aparente de ~90.000 Da (DTT+ en la Figura 5). La digestión con el péptido N-glucosidasa F (PNGasa F) redujo la masa molecular aparente de la proteína hasta alrededor de 80.000, que se aproxima mucho a la masa calculada de 80.500 Da para el monómero de sTNALP-FcD10 no glucosilado mostrado en la Figura 1. TNALP soluble en suero, como TNALP presente como una proteína anclada a GPI en la superficie exterior de osteoblastos, es una proteína muy glucosilada, comprendiendo los hidratos de carbono $\leq 20\%$ de la masa total de la enzima (Farley y Magnusson 2005). Aunque no se han identificado las estructuras de hidratos de carbono específicas en TNALP, estudios de secuencias indican que la enzima posee cinco sitios putativos para la glucosilación enlazada a N, y estudios bioquímicos han mostrado pruebas de hidratos de carbono enlazados tanto a N como a O (Nosjean et al. 1997). De acuerdo con estas observaciones previas, la migración electroforética de sTNALP-FcD10 y su sensibilidad a PNGasa F sugiere que también es una proteína tremendamente N-glucosilada. TNALP soluble en suero, como TNALP presente como una proteína anclada a GPI en la superficie exterior de osteoblastos, es una proteína muy glucosilada, comprendiendo los hidratos de carbono $\leq 20\%$ de la masa total de la enzima (Farley y Magnusson 2005).

Cuando se repitió SDS-PAGE en condiciones no reductoras, se encontró que la masa molecular aparente de

sTNALP-FcD10 fue 200.000 (DTT- en la Figura 5), consistente con la de un homodímero como en TNALP sin alterar nativa (Millán 2006). Este homodímero resulta probablemente de la formación de dos enlaces de disulfuro entre dos regiones de Fc monómeras (panel derecho superior, Figura 5).

5 La masa molecular de sTNALP-FcD10 purificada en condiciones nativas se evaluó después usando cromatografía de FPLC de exclusión molecular en una columna de Sephacryl™ S-300 (GE Health Care) equilibrada en tampón de 150 mM de NaCl, 20 mM de Tris pH 7,5. La columna se calibró previamente con un kit de proteína estándar (kit de calibración de HMW, GE Health Care) (panel izquierdo inferior, Figura 5).

10 Las fracciones de la cromatografía recogidas se ensayaron para determinar la actividad enzimática de fosfatasa alcalina y el material en cada pico. Sorprendentemente, el 78% del material eluyó en una posición que corresponde a proteínas de 370 kDa (panel izquierdo inferior, Figura 5), sugiriendo una forma tetramera para la enzima recombinante de sTNALP-FcD10 nativa producida en células CHO. Cuando las fracciones de la columna de Sephacryl S-300 se ensayaron para determinar la actividad, toda la actividad enzimática estaba asociada con la fracción de 370 kDa. El material que queda fue de un peso molecular mucho mayor, indicando la formación de algunos agregados de sTNALP-FcD10. Tanto las formas tetrameras, que pueden no ser observadas en la SDS-PAGE debido a que esta última destruye la unión covalente, manteniendo al tetramero junto, como las formas agregadas se resolvieron como monómeros de sTNALP-FcD10 con un peso molecular aparente de 90.000 mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (DTT+, panel derecho inferior en la Figura 5), y como dímeros con un peso molecular aparente de 200.000 en condiciones no reductoras (DTT-, panel derecho inferior en la Figura 5). Parece que sTNALP-FcD10 recombinante consiste principalmente en homotetrameros enzimáticamente funcionales formados mediante asociación no covalente de dos dímeros de sTNALP-FcD10 enlazados mediante disulfuro.

20 La estructura tetramera de sTNALP-FcD10 se ensayó adicionalmente mediante digestión limitada con papaína (Figuras 6-8). Se sabe que esta proteasa escinde cadenas pesadas de IgG próximas a la región bisagra y en los lados N-terminales de los enlaces de disulfuro, generando de ese modo fragmentos de Fab monómeros completos y dímeros de Fc enlazados por disulfuro diméricos. La digestión de sTNALP-FcD10 debería liberar de este modo dímeros de sTNALP enzimáticamente activos a partir de los dominios de Fc intactos (véase la Figura 6).

25 Alícuotas que contienen 400 µg de sTNALP-FcD10 se digirieron con 208 mU de papaína-agarosa (Sigma) en un tampón de fosfato 20 mM (pH 7,0) que contiene 250 µM de ditiotritol. La digestión se dejó transcurrir a 37°C durante 1 h con agitación suave. La reacción se detuvo eliminando las perlas de papaína-agarosa mediante centrifugación. En esas condiciones, no hubo pérdida significativa de actividad enzimática de sTNALP-FcD10 durante las primeras 4 h de incubación. A continuación se analizó sTNALP-FcD10 incubada durante una hora en presencia o ausencia de papaína-agarosa mediante SEC-HPLC en una TSK-Gel G3000WXL (Tosoh Bioscience) en condiciones no desnaturizantes.

30 La Figura 7 muestra que el producto principal que eluye con un Mr aparente de 370 kDa ya no se observó más después de una digestión durante 1 h con papaína. En esas condiciones, la digestión con papaína genera dos fragmentos principales de 135 kDa y 62 kDa, respectivamente. También se observó un pico minoritario con Mr de 35 kDa.

35 Al reducir las condiciones de SDS-PAGE (DTT+, Figura 8), el producto de la muestra no tratada con papaína se resolvió en una banda principal (102 kDa) (DTT+, papaína-), que se demostró previamente que corresponde a sTNALP-FcD10 monómera. En transferencias Western, esta banda se puede teñir de hecho con anticuerpos tanto para TNALP como para el dominio de Fc de la molécula de IgG₁ (no mostrado). Después de la digestión con papaína, esta banda se escindió en dos fragmentos principales: 1) la banda de 32 kDa, que se une al anticuerpo anti-Fc pero no al anticuerpo anti-TNALP, y se propone que corresponde al fragmento de FcD10; y 2) la banda de proteína amplia y difusa (66-90 kDa) que se puede teñir con el anticuerpo anti-ALP pero no con el anticuerpo anti-Fc, y de este modo se piensa que corresponde a monómeros del ectodominio de TNALP. La heterogeneidad de este material es debida presumiblemente a su glucosilación, puesto que puede ser reducida mediante digestión con péptido-N-glucosidasa F, que también disminuye su masa molecular aparente hasta 52 kDa (resultados no mostrados).

40 En condiciones no reductoras (DTT-, Figura 8), se encontró que sTNALP-FcD10 incubada sin papaína migra en SDS-PAGE como una proteína de 216 kDa (DTT-, papaína-, Figura 8). La transferencia Western también demuestra que esta proteína contiene epítopos tanto para los restos de TNALP como de Fc (resultados no mostrados). Se propuso previamente que esta especie molecular consiste en dímeros de sTNALP-FcD10 enlazados mediante disulfuro. Al igual que en condiciones reductoras, la escisión con papaína en condiciones no reductoras (DTT-, papaína +) genera dos fragmentos principales. En transferencias Western, el fragmento de 55 kDa se puede teñir con el anticuerpo anti-Fc, pero no con el anticuerpo anti-TNALP. Este fragmento es muy probablemente idéntico a la especie de 62 kDa observada en SEC-HPLC en condiciones nativas, y se propone que corresponde a dímeros de Fc enlazados mediante disulfuro. La otra especie principal comigra con la banda de proteína principal (66-90 kDa) observada en condiciones reductoras. Esto es consistente con estar compuesta de monómeros de ectodominio de TNALP. Cuando se analizan mediante HPLC en condiciones no desnaturizantes, estos monómeros no están asociados covalentemente en los dímeros de TNALP enzimáticamente activos que eluyen de la columna de SEC como la especie de 135 kDa.

EJEMPLO 4

Afinidad comparada por hidroxiapatita de la proteína sTNALP-FcD10 y sALP de riñón bovino

La afinidad por hidroxiapatita de la proteína sTNALP-FcD10 purificada también se comparó con la de fosfatasa alcalina soluble (no específica de tejidos) de riñón bovino (Calzyme) usando el siguiente procedimiento. Se usó TNALP de riñón bovino en lugar de TNALP de hueso humano debido a que estaba comercialmente disponible. Se solubilizaron en primer lugar perlas cerámicas de hidroxiapatita (Biorad) en HCl 1 M, y el mineral se precipitó llevando nuevamente la disolución hasta pH 7,4 con NaOH 10 N. La unión a este mineral reconstituido se llevó a cabo incubando alícuotas de la suspensión mineral que contiene 750 µg de mineral con 5 µg de proteína en 100 µl de tampón de 150 mM de NaCl, 80 mM de fosfato de sodio pH 7,4. Las muestras se mantuvieron a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 minutos en una rueda giratoria. El mineral se hizo centrifugar mediante centrifugación de baja velocidad, y se midió la actividad enzimática recuperada tanto en el pelete mineral como en el sobrenadante. La Figura 9 muestra claramente que sTNALP-FcD10 se une más eficientemente al mineral de hidroxiapatita reconstituido que TNALP de riñón bovino. Además, la mayoría de la proteína sTNALP-FcD10 recombinante introducida en el ensayo se recuperó sumando la actividad enzimática registrada en las regiones tanto unida como no unida. Esto indica que la unión de la proteína recombinante a la fase de mineral reconstituido no altera significativamente su actividad enzimática.

EJEMPLO 5

Modelo de ratón

Los ratones $Akp2^{-/-}$ se crearon mediante inserción del casete de Neo en el exón VI del gen de TNALP de ratón ($Akp2$) vía recombinación homóloga (Narisawa et al. 1997; Fedde et al. 1999). Esta mutación provocó la inactivación funcional del gen de $Akp2$, y no se puede detectar ARNm o proteína de TNALP en estos ratones (Narisawa et al. 1997). Fenotípicamente, los ratones $Akp2^{-/-}$ imitan HPP grave de lactantes. Estos ratones no tienen fenotipo de hipofosfatasa obvio en el nacimiento, apareciendo los defectos esqueléticos habitualmente en el día 6 o alrededores, y empeorando después. Tienen un crecimiento canijo con raquitismo, desarrollan ataques epilépticos y apnea, y se dio a conocer que mueren entre los días 12-16 después del nacimiento. Al igual que los pacientes con HPP, los ratones $Akp2^{-/-}$ presentan hipofosfatemia debido a deficiencia global de la actividad de TNALP, acumulación endógena de los sustratos de ALP, PPi, PLP y PEA, y sufren una mineralización de la matriz esquelética alterada, conduciendo a raquitismo u osteomalacia (Fedde et al. 1999).

Para entender cómo los defectos en la fosfatasa alcalina pueden conducir a manifestaciones neurológicas de la enfermedad tanto en seres humanos como en ratones, se ha de repasar el papel y metabolismo de la vitamina B6 en el SNC. La vitamina B6 es un nutriente importante que sirve como un cofactor para al menos 110 enzimas, incluyendo aquellas implicadas en la biosíntesis de los neurotransmisores ácido γ -aminobutírico (GABA), dopamina y serotonina. La vitamina B6 se puede encontrar en tres formas libres (o vitámeros), es decir, piridoxal (PL), piridoxamina (PM), y piridoxina (PN), todas las cuales se pueden fosforilar en los derivados 5'-fosforilados correspondientes, PLP, PMP y PNP (Jansonius 1998). La eliminación del grupo fosfato es una función de ALP, y principalmente la de la isoenzima de TNALP (Whyte 2001). Puesto que sólo los vitámeros desfosforilados pueden ser transportados a las células, una actividad reducida de TNALP en la hipofosfatasa da como resultado aumentos notables en PLP plasmático (Whyte et al. 1985; Whyte 2001) y deficiencia intracelular de PLP en tejidos periféricos y el sistema nervioso central, en el que conduce a niveles cerebrales reducidos de GABA. También se ha teorizado que los ataques epilépticos observados en estos ratones resultan de la disfunción de la ácido glutámico descarboxilasa, debido a escasez de PLP (Waymire et al. 1995).

La suplementación de piridoxina suprime los ataques epilépticos de ratones $Akp2^{-/-}$, pero prolonga su duración de vida sólo unos pocos días, hasta los días 18-22 después del nacimiento (Narisawa et al. 2001). Por lo tanto, a todos los animales en el estudio (criadores, madres lactantes, crías y animales destetados) se les dio acceso libre a una dieta 5001 modificada para roedores de laboratorio, con mayores niveles (325 ppm) de piridoxina.

Los ratones $Akp2^{-/-}$ (híbridos 12,5% de C57BL/6 – 87,5% de 129J) se mantuvieron mediante reproducción heterocigota. Los animales, parejas criadoras o madres lactantes con sus crías, se enjaularon en una jaula de plástico de fondo sólido ventilada, equipada con un sistema de suministro de agua automático. Todos los animales tuvieron acceso libre a una dieta 5001 modificada para roedores de laboratorio con 325 ppm de piridoxina (#48057, TestDiet™). Los fabricantes aseguraron las concentraciones máximas permisibles de contaminantes en la dieta (por ejemplo metales pesados, aflatoxina, organofosfato, hidrocarburos clorados, PCBs). No había contaminantes conocidos en el material dietético para influir en la toxicidad del artículo de ensayo.

EJEMPLO 6

Farmacocinética y distribución tisular de sTNALP-FcD10 inyectada en ratones WT

Recogida de muestras de sangre

Las muestras de sangre se recogieron en un tubo de litio con heparina (VWR, #CBD365958), colocado en hielo durante un máximo de 20 minutos antes de la centrifugación a 2500 g durante 10 min. a temperatura ambiente. Al

menos se transfirieron 15 µl de plasma al tubo de 0,5 ml (Sarstedt, #72.699), se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su ensayo. Si está disponible, se transfirieron otros ≤ 50 µl de plasma en un tubo de 0,5 ml, se inactivaron a 65°C durante 10 minutos, se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su ensayo. Cualquier plasma que queda se reunió con la alícuota de 15 µl, se congeló en nitrógeno líquido, y se mantuvo a -80°C hasta su ensayo.

Determinación de sTNALP-FcD10 plasmática

La presencia de sTNALP-FcD10 en las muestras de plasma se evaluó al terminar el tratamiento usando un ensayo enzimático colorimétrico. La actividad enzimática se determinó usando un sustrato cromógeno en el que un incremento de la absorbancia es proporcional a la conversión del sustrato en productos. La reacción se llevó a cabo en 100 µl de tampón de 50 mM de NaCl, 20 mM de Bis Tris Propano (HCl) pH 9, que contiene 0,5 mM de MgCl₂ y 50 µM de ZnCl₂, a los que se añadieron 10 µl de muestra de plasma diluida. El sustrato de ALP p-nitrofenilo se añadió el último, a una concentración final de 1 mM, para iniciar la reacción. La absorbancia se registró a 405 nm cada 45 segundos durante un período de veinte minutos usando un lector de placas Spectramax™ 190 (Molecular devices). La actividad enzimática de sTNALP-FcD10, expresada como una velocidad inicial de reacción, se evaluó ajustando la pendiente más inclinada a lo largo de 8 valores de lectura adyacentes. Se prepararon patrones con concentraciones variables del artículo de ensayo, y la actividad enzimática se determinó como se describe anteriormente en el Ejemplo 1. La curva patrón se generó representando gráficamente Log de la velocidad inicial en función del Log de las cantidades estándar. La concentración de sTNALP-FcD10 de las diferentes muestras plasmáticas se leyó directamente de la curva patrón usando su actividad enzimática respectiva.

Determinación de PPi plasmático

Los niveles circulantes de PPi se midieron en suero obtenido de punción cardíaca usando adsorción diferencial sobre carbón activado de UDP-D-[6-³H]glucosa (Amersham Pharmacia) del producto de reacción de 6-fosfo[6-³H]gluconato, como se describe previamente (Johnson et al. 1999).

Semivida y distribución tisular de sTNALP-FcD10

Se determinó la semivida y la distribución tisular de sTNALP-FcD10 inyectado en los ratones en ratones WT adultos. La Figura 10 resume su farmacocinética y distribución tisular después de una única inyección intravenosa de bolo de 5 mg/kg en ratones WT adultos.

La semivida fue 34 h en sangre, con una acumulación de la sTNALP-FcD10 marcada con [¹²⁵I] en hueso de hasta 1 µg/g de hueso (peso húmedo). Esta semivida es comparable a la observada previamente en ensayos clínicos dados a conocer no exitosos. Los niveles de material dirigido al hueso parecieron ser bastante estables, puesto que no se observó durante el experimento ninguna disminución significativa en sTNALP-FcD10 radiomarcada. No se observó acumulación de sTNALP-FcD10 en el músculo, puesto que la cantidad de enzima radiomarcada en ese tejido disminuyó en paralelo con la de la actividad enzimática de sTNALP-FcD10 en sangre.

En ratones neonatos. Debido a que los ratones Akp2^{-/-} mueren entre los días 12-16 y la inyección i.p. no es factible en tales ratones jóvenes, se repitió el análisis farmacocinético de sTNALP-FcD10 en suero usando las vías i.p. y s.c. en ratones neonatos WT, usando una dosis de 3,7 mg/kg. Se encontró que la vía i.p. fue inadecuada debido a la elevada presión en la cavidad abdominal, que conduce a pérdidas impredecibles a través del sitio de inyección (Figura 11A). La vía s.c. fue más reproducible en ratones neonatos, como se puede ver en el experimento de PK de la Figura 11B. En la Tabla 2 a continuación se dan a conocer los parámetros farmacocinéticos de sTNALP-FcD10 en ratones neonatos y adultos.

Tabla 2: Parámetros farmacocinéticos de sTNALP-FcD10 en ratones WT neonatos.

Parámetro	Neonato	
	s.c.	i.p.
T1/2 (h)	31	19
Tmax (h)	6	6
Cmax (mg/L)	5	3
AUCinf (mg/L/h)	257	92

Estos datos de PK, analizados mediante software WinNonlin™ (Pharsight Corporation, Mountain View, CA), se usaron para predecir los niveles sanguíneos circulantes de sTNALP-FcD10 logrados tras inyecciones s.c. diarias repetidas. sTNALP-FcD10 circulante alcanzó concentraciones séricas de estado estacionario que oscilan entre los

valores Cmin y Cmax de 26,4 y 36,6 µg/ml, respectivamente (Figura 12). El estado estacionario se logró después de 5 a 6 dosis diarias de 10 mg/kg.

La validez de la predicción se ensayó experimentalmente después de 5 inyecciones diarias de 10 mg/kg de sTNALP-FcD10. En el día de la inyección, el genotipo de los ratones no se pudo distinguir. Se determinó más tarde quienes eran, entre los ratones ensayados, heterocigotos u homocigotos. No hubo ninguna diferencia en el comportamiento de todos los genotipos diferentes. Cuando la actividad de ALP circulante se midió 24 h después de la última inyección, a saber, en el día 6, (Cmin), se observó una buena concordancia entre las concentraciones experimental y predicha (Figura 13). En estos animales de 5 días no tratados, los niveles de TNALP séricos fueron 0,58 µg/ml. Estos niveles disminuirán con la edad. De este modo, se calculó que el régimen de inyecciones permitió llegar hasta concentraciones séricas de estado estacionario de sTNALP-FcD10 aproximadamente 50 veces mayores que las concentraciones de TNALP normales.

EJEMPLO 7

Concentración de sTNALP-FcD10 en huesos de ratones WT adultos después de la administración intravenosa de bolo

Se administró una dosis de sTNALP-FcD10 de 5 mg/kg i.v. en ratones WT adultos 129J. La concentración de sTNALP-FcD10 en el hueso a T = 25 horas fue la siguiente: 0,64 µg/g en la bóveda craneal; 1,33 µg/g en las tibias; y 1,37 µg/g en los fémures, para una concentración media de 1,11 µg/g. En la rata, los tejidos óseos representan 16,3% de la masa total. Se espera que este porcentaje también se encuentre en los ratones. El peso corporal de los ratones usados para este experimento fue 18,4 g. El peso calculado del tejido óseo de estos ratones fue así alrededor de 18,4 g x 0,163 = 3,00 g. La cantidad calculada de sTNALP-FcD10 en tejidos óseos fue 3,33 µg. De este modo, el porcentaje de la dosis inyectada en tejidos óseos fue de $(3,33 \mu\text{g}/(5 \mu\text{g/g} * 18,4 \text{ g})) * 100 = 4\%$.

La concentración de sTNALP-FcD10 en hueso a T = 96 horas fue la siguiente: 0,83 µg/g en la bóveda craneal; 1,33 µg/g en las tibias; y 1,63 µg/g en los fémures, para una concentración media de 11,26 µg/g. El peso corporal de los ratones usados para este experimento fue 17,8 g. El peso calculado del tejido óseo de estos ratones fue así alrededor de 17,8 g x 0,163 = 2,90 g. La cantidad de sTNALP-FcD10 en tejidos óseos de ratones fue así alrededor de 3,66 µg. De este modo, el porcentaje de la dosis inyectada en tejidos óseos fue de $(3,66 \mu\text{g}/(5 \mu\text{g/g} * 17,8 \text{ g})) * 100 = 4\%$.

EJEMPLO 8

Concentración de sTNALP-FcD10 en huesos de ratones WT neonatos después de inyección subcutánea de bolo durante 15 días

Se administró subcutáneamente una dosis de sTNALP-FcD10 de 4,3 mg/kg en ratones WT neonatos 129J cada día durante 15 días para una cantidad administrada total de 65 mg/kg. La concentración de sTNALP-FcD10 en el hueso a T = 24 horas fue la siguiente: 6,45 µg/g en la bóveda craneal; 3,05 µg/g en las tibias; y 3,71 µg/g en los fémures, para una concentración media de 4,40 µg/g. El peso corporal de los ratones usados para este experimento fue 9,83 g. El peso calculado del tejido óseo de estos ratones fue así alrededor de 9,83 g x 0,163 = 1,60 g. La cantidad de sTNALP-FcD10 en tejidos óseos de ratones en ese momento fue así alrededor de 7,04 µg. De este modo, el porcentaje de la dosis inyectada en tejidos óseos fue de $(7,04 \mu\text{g}/(65 \mu\text{g/g} * 9,83 \text{ g})) * 100 = 1\%$.

La concentración de sTNALP-FcD10 en el hueso a T = 168 horas fue la siguiente: 5,33 µg/g en la bóveda craneal; 1,37 µg/g en las tibias; y 1,88 µg/g en los fémures, para una concentración media de 2,86 µg/g. El peso corporal de los ratones usados para este experimento fue 14,0 g. De este modo, el peso calculado del tejido óseo de estos ratones fue alrededor de 14,0 g x 0,163 = 2,28 g. La cantidad de sTNALP-FcD10 en tejidos óseos de ratones en ese momento fue así alrededor de 6,52 µg. De este modo, el porcentaje de la dosis inyectada en tejidos óseos fue de $(6,52 \mu\text{g}/(65 \mu\text{g/g} * 14 \text{ g})) * 100 = 0,7\%$. La Tabla 3 más abajo resume los resultados de los Ejemplos 7 y 8.

Tabla 3: Concentración media de sTNALP-FcD10 y porcentaje de dosis inyectada en huesos

Experimento	Régimen de inyección	Concentración media en huesos (µg/g de tejido húmedo)		% de dosis inyectada en huesos	
		T = 25 h ⁽¹⁾	T = 96 h ⁽¹⁾	T = 25 h ⁽¹⁾	T = 96 h ⁽¹⁾
Bolo IV	1 x 5 mg/kg (bolo)	1,11	1,26	4%	4%
Bolo sc durante 15 días	15 x 4,3 mg/kg (diariamente)	T = 24 h ⁽¹⁾	T = 168 h ⁽¹⁾	T = 24 h ⁽¹⁾	T = 168 h ⁽¹⁾
		4,40	2,86	1%	0,7%

¹⁾ Los tiempos indicados son a partir de la última inyección.

EJEMPLO 9

Eficacia a corto plazo (15 días) de dosis baja (1 mg/kg) de sTNALP-FcD10 para HPP en ratones Akp2^{-/-}

5 Se llevaron a cabo inyecciones s.c. diarias de sTNALP-FcD10 durante 15 días en ratones Akp2^{-/-} usando 1 mg/kg. Los grupos de tratamiento estaban constituidos de 19 camadas. Los ratones Akp2^{-/-} recibieron vehículo (N = 13) o sTNALP-FcD10 (N = 12). Los controles consistieron en 15 ratones WT (uno por camada). Los controles no se sometieron a inyecciones. Se extrajo sangre 24 h después de la última inyección como se describe en el Ejemplo 6.

10 La Figura 14 muestra que las actividades enzimáticas en suero en el día 16 estaban escasamente por encima del nivel de detección. A pesar de los valores séricos bajos para sTNALP-FcD10, se corrigieron los niveles séricos de PPI (Figura 15). Los ratones Akp2^{-/-} sin tratar tuvieron concentraciones séricas de PPI de $1,90 \pm 0,64$ μ moles/ml, mientras que los ratones Akp2^{-/-} tratados tuvieron niveles de $1,41 \pm 0,30$ μ moles/ml, comparables a aquellos de los ratones WT ($1,52 \pm 0,35$ μ moles/ml).

15 Las placas de crecimiento tibiales proximales mostraron cierto ensanchamiento de la zona hipertrófica en animales Akp2^{-/-}, en comparación con animales WT (compárese el vehículo con tipo salvaje en la Figura 16). La misma observación realizada mucho antes en esta raza de ratones Akp2^{-/-} (Hessle et al. 2002) es consistente con raquitismo. Se observó una tendencia a la normalización de la morfología fisaria en animales tratados con sTNALP-FcD10 durante 15 días (Figura 17) en comparación con el vehículo (sin tratar).

EJEMPLO 10

Eficacia a corto plazo (15 días) de dosis altas (8,2 mg/kg) de sTNALP-FcD10 para HPP en ratones Akp2^{-/-}

20 Para evaluar 15 días de inyecciones diarias s.c. usando una dosis significativamente mayor de sTNALP-FcD10 (8,2 mg/kg) sobre el crecimiento y la mineralización ósea, se usaron ratones de 20 camadas (141 ratones en total). Se distribuyeron en dos grupos: 1) ratones Akp2^{-/-} a los que se les dio vehículo (N = 19); 2) ratones Akp2^{-/-} tratados con sTNALP-FcD10 (N = 20); adicionalmente, hubo un ratón WT por camada, no tratado (N = 18).

Peso corporal

25 Los ratones Akp2^{-/-} crecieron más lentamente que los ratones WT. En el día 1, no se observó ninguna diferencia estadística en los pesos corporales entre los animales del vehículo, tratados con sTNALP-FcD10, y WT. Sin embargo, los pesos corporales medios diarios divergieron en el día 6 (Figura 18). La diferencia entre WT ($4,2 \pm 0,6$ g) y el vehículo ($3,7 \pm 0,7$ g) logró una significancia estadística ($p = 0,0217$) en el día 6; pero la diferencia entre el vehículo ($5,0 \pm 1,0$ g) y los valores tratados con sTNALP-FcD10 ($6,7 \pm 1,0$ g) lograron una significancia estadística en el día 11 ($p = 0,04$), siendo el grupo tratado paradójicamente más pesado que WT. En el día 16, el peso corporal medio de los animales tratados ($8,2 \pm 1,1$ g) y WT ($8,4 \pm 0,8$ g) no fue estadísticamente diferente. Los animales tratados con sTNALP-FcD10 tuvieron pesos corporales estadísticamente mayores ($p = 0,026$) que aquellos tratados con vehículo ($6,6 \pm 1,4$ g). No se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos de ERT y WT para el peso corporal en cualquier punto de tiempo.

Longitud ósea

30 Al final de este experimento (día 16), la longitud de la tibia proporcionó una medida adicional del beneficio esquelético para ratones Akp2^{-/-}. La longitud de la tibia con ERT fue $12,6 \pm 0,7$ mm y más larga ($p = 0,0135$) en comparación con los animales a los que se les administró el vehículo ($11,7 \pm 1,1$ mm) (Figura 19). También se obtuvo una diferencia estadística ($p = 0,0267$) cuando se comparó la longitud del fémur entre los grupos tratados con sTNALP-FcD10 ($9,2 \pm 0,4$ mm) y el vehículo ($8,6 \pm 0,8$ mm). No se observó diferencia estadística para la longitud de la tibia o del fémur de los ratones de ERT en comparación con ratones WT. Se observó una conservación parcial (es decir, prevención parcial de la reducción en el crecimiento óseo, que se hace manifiesto a alrededor de dos semanas) del crecimiento de la tibia y del fémur por medidas de longitud en la necropsia (Figura 19).

45 En todos los 5 animales, en el día 16 se encontraron niveles detectables, pero muy variables, de sTNALP-FcD10 en el plasma de ratones Akp2^{-/-} tratados (Figura 20). Con fines comparativos, se dan las concentraciones de TNALP circulante en animales normales.

Mineralización ósea

50 Evaluaciones enmascaradas de imágenes Faxitron™ de los pies y cajas torácicas distinguieron dos grados de gravedad de defectos de mineralización en los ratones Akp2^{-/-} (Figura 21). Los ratones gravemente afectados (Graves) tuvieron una ausencia de huesos digitales (falanges) y centros de osificación secundarios. Los ratones afectados de forma moderada (Moderados) tuvieron centros de osificación secundarios anormales, pero estaban presentes todos los huesos digitales. Los ratones WT (Sanos) tuvieron todas las estructuras óseas, con arquitectura

normal. Las imágenes radiográficas de las extremidades posteriores se clasificaron similarmente como anormales si había signos de fracturas agudas o crónicas, o sanas en ausencia de cualesquiera hallazgos anormales (Figura 21). ERT minimizó los defectos de mineralización en los pies, documentado por el número de ratones Akp2^{-/-} con defectos graves, que consiste en 5 en el grupo no tratado pero 0 en el grupo de ERT (Tabla en la Figura 21). Chi cuadrado fue significativa ($p \leq 0,05$), indicando que ERT disminuyó la gravedad de los defectos óseos adquiridos. Debido a que los pacientes afectados con HPP de lactante mueren a menudo de costillas submineralizadas y fracturadas incapaces de soportar la respiración, también se examinaron con atención los tórax. ERT también redujo la incidencia de cajas torácicas gravemente dismórficas (Tabla en la Figura 21). El análisis de Chi cuadrado fue significativo a $p \leq 0,025$. De forma similar, las extremidades posteriores parecieron sanas en todos los animales tratados (Tabla en la Figura 21). El análisis de Chi cuadrado fue significativo a $p \leq 0,025$.

Defectos dentales

Las mandíbulas de ratones de 16 días se fijaron por inmersión toda la noche en disolución de aldehído tamponada con cacodilato sódico, y se cortaron en segmentos que contienen el primer molar, el incisivo subyacente, y el hueso alveolar circundante. Las muestras se deshidrataron mediante series de etanol graduado y se infiltraron con resina acrílica (LR White) o epoxídica (Epon 812), seguido de la polimerización de los bloques de resina que contienen el tejido a 55°C durante 2 días. Se cortaron secciones delgadas (1 μm) en un ultramicrotomo usando un cuchillo de diamante, y las secciones montadas sobre portaobjetos de vidrio se tiñeron para mineral usando nitrato de plata al 1% (tinción de von Kossa, negra) y se contratiñeron con azul de toluidina al 1%. Para análisis histológicos comparativos, secciones frontales mediante las mandíbulas (al mismo nivel de la raíz más mesial del primer molar) proporcionaron un molar longitudinalmente seccionado y un incisivo seccionado de forma cruzada.

El examen histológico de los dientes de ratones Akp2^{-/-} muestra un tejido de dentina pobremente mineralizado y muy poco cemento entre el ligamiento periodontal y la dentina en comparación con los animales de tipo salvaje (Figura 22, compárense Akp2^{-/-} vehículo y WT normal). En la Figura 22 también se muestra la mineralización restaurada de la dentina y la formación del cemento Akp2^{-/-} tratado frente a WT normal).

EJEMPLO 11

Eficacia a largo plazo (52 días) de dosis altas (8,2 mg/kg) de sTNALP-FcD10 para HPP en ratones Akp2^{-/-}

Finalmente, para evaluar la supervivencia a largo plazo y la mineralización ósea en ratones Akp2^{-/-}, se administró sTNALP-FcD10 (8,2 mg/kg) o vehículo diariamente durante 52 días (inyecciones s.c.).

Supervivencia, actividad y aspecto de los ratones

Los ratones no tratados tuvieron una supervivencia media de 18,5 días (Figura 23), mientras que la supervivencia aumentó drásticamente con ERT, y este tratamiento también conservó la actividad normal y el aspecto sano (Figura 24) de los ratones tratados.

Mineralización ósea

Las radiografías de los pies de ratones Akp2^{-/-} de 16 días mostraron defectos de osificación secundarios que son una característica distintiva de la enfermedad (véase la Figura 25). Estos defectos se evitaron en todos los ratones tratados mediante dosis diarias de sTNALP-FcD10 durante 46 ó 53 días (Figura 25).

Actividad de ALP

Los niveles plasmáticos de la actividad de ALP se midieron después de 53 días en ratones Akp2^{-/-} tratados. La Figura 26 muestra que la mayoría de los valores estaban entre 1 y 4 $\mu\text{g/ml}$ de actividad de ALP. Sin embargo, tres animales tuvieron niveles de ALP indetectables.

De forma interesante, a diferencia de los ratones WT en los que se logró una concentración sérica de estado estacionario de sTNALP-FcD10, en los ratones Akp2^{-/-} tratados se midió una gran variabilidad en los niveles séricos de ALP.

EJEMPLO 12

Eficacia a largo plazo de diferentes intervalos de dosificación de sTNALP-FcD10 en ratones Akp2^{-/-}

Se inyectaron a ratones Akp2^{-/-} neonatos con 4,3 mg/kg diariamente (Tx-1), 15,2 mg/kg cada 3 días (Tx-3) o 15,2 mg/kg cada 7 días (Tx-7) de sTNALP-FcD10. El tratamiento se continuó durante 43 días, y los ratones se sacrificaron en el día 44, a saber, 24 horas después de la última inyección. Se monitorizaron para evaluar cualquier mejora de su supervivencia y mineralización esquelética.

Supervivencia de los ratones

La supervivencia de ratones tratados se incrementó en comparación con los ratones a los que se les inyectó el

vehículo (Figura 27). Este incremento fue estadísticamente significativo ($p < 0,0001$). No hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa cuando las curvas de supervivencia de los grupos tratados se compararon entre ellas.

Mineralización ósea

5 A) Para cada tratamiento, se analizaron las radiografías de los pies y se distribuyeron entre normales y anormales. En la Tabla 4 más abajo aparecen los números y porcentajes (en paréntesis). Los defectos de la mineralización ósea se evaluaron en el día 23 y al final del estudio (día 23-45).

B) Tabla 4: Distribución de radiografías de pies

Estudio central (D23)		
Grupo	Anormal (%)	Normal (%)
Tx-1 (N=18)	6 (33)	12 (67)
Tx-3 (N=19)	4 (21)	15 (79)
Tx-7 (N=20)	10 (50)	10 (50)
WT (N=32)	0 (0)	32 (100)
B)		
D23-45		
Grupo	Anormal (%)	Normal (%)
Tx-1 (N=18)	3 (17)	15 (83)
Tx-3 (N=19)	0 (0)	19 (100)
Tx-7 (N=20)	3 (15)	17 (85)
WT (N=31)	0 (0)	31 (100)

10 A la mitad del estudio, sTNALP-FcD10 administrada a 15,2 mg/kg cada 3 días normalizó los defectos de la mineralización ósea en 79% de los ratones. Esta tasa de normalización se aproximó a la significación estadística cuando se compara con la tasa de 50% de normalización evaluada en los ratones tratados con 15,2 mg/kg cada 7 días (Chi cuadrado; $p = 0,0596$). Ninguna de las otras comparaciones entre tratamientos fueron estadísticamente significativas ni se aproximaron a la significación.

15 Al final del estudio, el porcentaje de normalización mejoró en todos los grupos tratados en comparación con el porcentaje de normalización evaluado en el día 23. La prueba de Chi cuadrado, que compara la distribución entre todos los tratamientos de sTNALP-FcD10, no fue significativo ($p = 0,1844$). La tasa de 100% de normalización observada en los ratones tratados cada 3 días se aproximó a la significación estadística cuando se comparó con la tasa en ratones tratados diariamente (83%, $p = 0,0634$) o cada 7 días (85%, $p = 0,0789$).

20 Sin embargo, en todos los grupos de tratamiento, una proporción significativa de los animales clasificados como anormales en el día 23 mejoró y se hizo normal al final del estudio. En el grupo de tratamiento diario, 3 de 6 animales se normalizaron; en los ratones tratados cada 3 días, 4 de 4 mejoraron, y finalmente en el grupo del tratamiento semanal, 7 de 10 se hicieron normales. Aunque los intervalos de dosificación proporcionan resultados satisfactorios, los mejores resultados se obtuvieron cuando la cantidad diaria resultante administrada fue la más elevada.

25 EJEMPLO 13

Eficacia a largo plazo de dosis altas (8,2 mg/kg) de sTNALP-FcD10 en ratones $Akp2^{-/-}$ de 15 días

30 Se llevaron a cabo estudios de eficacia como se describen en el Ejemplo 11 en ratones de 15 días que habían comenzado a manifestar defectos esqueléticos según se observa en imágenes de rayos X de los pies (véase el Ejemplo 11, Figura 25). sTNALP-FcD10 se administró hasta el final del estudio. Los animales se monitorizaron para evaluar cualquier mejora de su supervivencia, peso corporal y mineralización esquelética.

Supervivencia de los ratones

Las inyecciones diarias, empezando en el día 15, de 8,2 mg/kg de sTNALP-FcD10 a ratones Akp2^{-/-} aumentaron su supervivencia, en comparación con los ratones a los que se les inyectó vehículo (Figura 28). Este incremento fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

Peso corporal

5 Al comienzo del estudio, no se observó diferencia significativa en el peso corporal entre grupos (Figura 29). Al comienzo del tratamiento (día 15), el peso corporal de los ratones Akp2^{-/-} fue más pequeño que el de los animales de tipo salvaje. Aunque el peso corporal de los animales a los que se les inyectó vehículo continuó disminuyendo, los ratones Akp2^{-/-} tratados con sTNALP-FcD10 comenzaron a ganar peso 4 a 5 días después del inicio del tratamiento, y siguieron ganando peso hasta el final del estudio, sin alcanzar sin embargo los valores de los animales de tipo salvaje. Esta ganancia de peso sugiere una mejora en el bienestar de los animales tratados con sTNALP-FcD10.

Mineralización ósea

Para cada tratamiento, se analizaron las radiografías de los pies, y se distribuyeron entre normales y anormales. En la Tabla 5 aparecen los números y porcentajes (en paréntesis). Las radiografías se hicieron en la necropsia.

15 El tratamiento de ratones Akp2^{-/-} con 8,2 mg/kg de sTNALP-FcD10 diariamente, comenzando en el día 15 después del nacimiento, mejoró la mineralización, como se puede observar a partir de la radiografía de los pies realizada en la necropsia. El grupo tratado con sTNALP-FcD10 mostró 41% de animales normales en comparación con 12% en el grupo de ratones Akp2^{-/-} inyectados con vehículo. Esta diferencia casi alcanzó la significación estadística ($p = 0,0645$ en la prueba de Chi cuadrado).

Tabla 5: Distribución de radiografías de los pies

Grupo	Anormal	Normal
RVehículo (N=16)	14 (88)	2 (12)
RTx-1 (N=17)	10 (59)	7 (41)
WT (N=30)	0 (0)	30 (100)

20

EJEMPLO 14

Eficacia a largo plazo de diferentes intervalos de dosificación de sTNALP-FcD10 en el rescate de ratones Akp2^{-/-}

25 Los ratones se iniciaron en el tratamiento en el día 12, y se les inyectó s.c. con vehículo (RV), 8,2 mg/kg diariamente hasta 46/47 (RTx-1), o se les inyectó con 8,2 mg/kg diariamente durante 7 días, seguido de 24,6 mg/kg cada 3 días (RTx-3) o seguido de 57,4 mg/kg cada 7 días (RTx-7). La supervivencia media fue 19,5 días para los ratones de RV, 21,0 días para los ratones de RTx-7, 30,5 días para los ratones de RTx-3, y 37,5 días para los ratones de RTx-1. En todos los casos, la supervivencia aumentó estadísticamente cuando se compara con la del grupo tratado con vehículo. Existe un beneficio claro de ERT en ratones Akp2^{-/-} con hipofosfatasa bien consolidada. La dosificación menos frecuentemente que la diaria también parece incrementar estadísticamente la supervivencia.

30 EJEMPLO 15

Un estudio de toxicidad por inyección intravenosa de dosis tolerada máxima en ratas Sprague-Dawley jóvenes

El objetivo de este estudio fue determinar la dosis tolerada máxima (MTD) y la toxicidad del artículo de ensayo, sTNALP-FcD10, tras la administración repetida a ratas Sprague-Dawley jóvenes mediante inyección intravenosa. En los Ejemplos 15 a 18, la sTNALP-FcD10 usada es aquella descrita específicamente en la Figura 3.

35 Se administró sTNALP-FcD10 a ratas Sprague-Dawley jóvenes (con una edad al comienzo entre 22 y 24 días) una vez a la semana durante cuatro semanas mediante inyección intravenosa como se describe en la Tabla 6 a continuación:

Tabla 6: Diseño del estudio

Números de los grupos	Tratamiento	Nivel de dosis (mg/kg/ocasión)	Concentración de la dosis (mg/ml)	Número de animales	
				Macho	Hembra
1	Dosis 1	10	2,0	3	3
2	Dosis 2	30	6,0	3	3

3	Dosis 3	90	18,0	3	3
4	Dosis 4	180	36,0	3	3

A lo largo del estudio, los animales se monitorizaron para la mortalidad, peso corporal, y estado clínico. En todos los animales se llevaron a cabo evaluaciones de hematología, coagulación y química clínica. Terminalmente, las ratas se eutanasiaron y se sometieron a necropsia. Para cada animal, se retuvieron muestras de tejidos seleccionados, y se sometieron a procesamiento histológico y examen microscópico.

No hubo ninguna mortalidad en este estudio, y no hubo cambios relacionados con el artículo de ensayo en los parámetros de coagulación o pesos de los órganos. Los pesos corporales de los machos de Dosis Alta, en particular, fueron alrededor de 10% menores que los de Dosis Baja, sugiriendo un efecto relacionado con el tratamiento.

No se observaron signos clínicos en los animales de los Grupos 1 y 2 en la primera ocasión de dosificación. Sin embargo, en los animales de los Grupos 3 y 4, los animales parecieron débiles inmediatamente después de la dosificación, y algunos de los animales del Grupo 4 mostraron una disminución leve a moderada en la actividad. También se observó en los dos grupos un leve hinchamiento de las extremidades, oreja y hocico, con decoloración de la piel (de aspecto rojo o azul). Otros signos clínicos observados en los animales del Grupo 4 incluyeron rascado excesivo, piloerección e hiperpnea.

Los signos clínicos registrados para los animales de los Grupos 1 y 2 en la segunda ocasión de dosificación (Día 8) fueron hinchamiento de las extremidades, oreja y hocico, con decoloración de la piel (de aspecto rojo o azul) en las extremidades. También se registraron signos clínicos similares de hinchamiento de la piel en la tercera y cuarta ocasión de dosificación (Días 15 y 22) para los mismos grupos de animales. En la cuarta ocasión de dosificación (Día 22), se observó una ligera hiperactividad en las hembras del Grupo 1, mientras que se observó hipoactividad en los machos del Grupo 2. Para los animales de los Grupos 3 y 4, los signos clínicos de actividad motora reducida, piloerección, hiperpnea e hinchamiento de las extremidades, oreja y hocico, con coloración de la piel, se hicieron más evidentes a medida que la dosificación progresó desde la primera ocasión de la dosificación hasta la cuarta. Se considera que estos signos clínicos estaban relacionados con el tratamiento. En los Días 16 a 19 y en el Día 23, se observó un ligero hinchamiento y una coloración de la piel de la oreja (de aspecto rojo) en un animal (Grupo 1). Se observaron signos clínicos similares en otro animal (Grupo 2) en el Día 23.

Los signos clínicos fueron agudos, y la gravedad aumentó a medida que la dosificación progresó, pero fueron transitorios. Todos los signos clínicos aparecieron en los 50 minutos después de la administración del artículo de ensayo, sTNALP-FcD10, recuperándose algunos animales en, por ejemplo, treinta minutos a 2 horas. Para los otros animales, la recuperación fue completa a la mañana siguiente (el siguiente tiempo de observación programado).

Hubo una disminución relacionada con el tratamiento en los recuentos plaquetarios (PLT) para machos y hembras de todos los grupos de tratamiento, medido después de la última dosis, en comparación con los valores antecedentes. Hubo un incremento en predominantemente el porcentaje, pero también de reticulocitos absolutos, que se observó generalmente en animales tratados en los tres niveles de dosis más elevadas.

Los niveles de fosfatasa alcalina en suero fueron mayores que los que se pudieron cuantificar mediante el instrumento analítico, incluso después de la dilución. Los resultados que estuvieron disponibles para las hembras de Dosis Baja fueron drásticamente mayores que el intervalo antecedente. Esto era de esperar puesto que el artículo de ensayo es una ALP modificada activa.

Macroscópicamente, se observaron focos/áreas oscuras y/o áreas deprimidas del estómago glandular en 3 de 6 animales del Grupo 3 (2 machos/1 hembra) y 4 de 6 animales del Grupo 4 (2 machos/2 hembras).

Microscópicamente, se observó una erosión/úlceras mínima a leve del estómago glandular, ocasionalmente asociada con edema submucosal, en 3 de 6 animales del Grupo 3 (2 machos/1 hembra) y 4 de 6 animales del Grupo 4 (2 machos/2 hembras), que se correlaciona con los hallazgos visibles.

En conclusión, la inyección intravenosa de sTNALP-FcD10 a ratas Sprague-Dawley jóvenes, una vez a la semana durante 4 semanas, no provocó muerte en ninguno de los niveles de dosis ensayados, pero provocó signos clínicos adversos, cambios hematológicos menores, y erosión/ulceración del estómago glandular, ocasionalmente asociado con edema submucosal, a los niveles de dosis de 90 y 180 mg/kg.

Los cambios relacionados con la administración del artículo de ensayo en los dos niveles de dosis más bajos ensayados (10 y 30 mg/kg) se limitaron a signos clínicos transitorios, manifiestos sólo en el día de la dosificación. Los signos clínicos fueron más graves en el nivel de dosis de 90 mg/kg, pero también fueron transitorios. Los signos clínicos observados en los animales tratados con 180 mg/kg no fueron tan graves como para evitar que se use este nivel de dosis en estudios futuros. Consiguientemente, el nivel de dosis recomendado más alto para estudios subsiguientes a más largo plazo es 90 mg/kg.

EJEMPLO 16

Un estudio de toxicidad de dosis tolerada máxima mediante inyección intravenosa e infusión en macacos cangrejeros jóvenes

5 El propósito de este estudio fue determinar la dosis tolerada máxima para sTNALP-FcD10 cuando se administra una vez mediante inyección intravenosa o infusión a macacos cangrejeros jóvenes. Las formulaciones de dosificación del artículo de ensayo se administraron una vez de manera por incrementos, como se indica en la Tabla 7 más abajo.

Tabla 7: Diseño del estudio

* Sólo a los animales del Estudio Principal se les dosificó en el Día 46.

Día del estudio	Tratamiento	Nivel de la dosis (mg/kg)	Volumen de la dosis (ml/kg)	Tasa de la dosis (ml/kg/h)	Conc. de la dosis (mg/ml)	Número de animales			
						Estudio principal		Toxicocinética	
						Machos	Hembras	Machos	Hembras
1	Inyección IV	5	4	N/A	1,25	2	2	1	1
8	Inyección IV	15	4	N/A	3,75				
15	Infusión IV	45	4	80	11,25				
22	Infusión IV	90	4	40	22,5				
29	Infusión IV	180	4	20	45				
46	Inyección IV	45	4	N/A	11,25				

10 Después del último tratamiento, los animales se liberaron del estudio. Los parámetros monitorizados durante el estudio fueron la mortalidad, observaciones clínicas, pesos corporales, apetito, toxicocinética, hematología y química clínica.

Durante el estudio no se observó mortalidad, signos clínicos adversos o efecto sobre los pesos corporales.

15 Se observó un notable incremento proporcional a la dosis en la fosfatasa alcalina en todos los animales durante el estudio. Puesto que el artículo de ensayo fue una fosfatasa alcalina sintética, este incremento fue debido principalmente a la presencia del fármaco en el torrente sanguíneo de los animales después de cada dosificación.

Se observaron incrementos en la aminotransferasa de alanina y aminotransferasa de aspartato en tres animales durante el estudio, pero, en ausencia de una necropsia, la significación toxicológica de este hallazgo es incierta.

20 La farmacocinética de sTNALP-FcD10 se caracterizó bien tras una única administración IV de 5, 15, 45, 90 y 180 mg/kg a los monos. Para las inyecciones IV, los valores medios de AUC ∞ oscilaron desde 797 hasta 2950 mg·h/l, y los valores medios de Cmax oscilaron desde 65 hasta 396 mg/l durante el intervalo de dosis estudiado. Para las infusiones, AUC ∞ media osciló desde 9410 hasta 48400 mg·h/l, y Cmax osciló desde 1230 hasta 7720 mg/l durante el intervalo de dosis estudiado.

25 Los valores medios de t1/2 de sTNALP-FcD10 parecieron disminuir al aumentar los niveles de dosis de sTNALP-FcD10. Aunque el aclaramiento sistémico de sTNALP-FcD10 fue relativamente consistente a lo largo de los niveles de dosis, el grupo de dosis de 90 mg/kg parece ser un valor farmacocinético atípico, con un aclaramiento sustancialmente menor cuando se compara con los otros niveles de dosis (aproximadamente cinco veces). No se observaron tendencias obvias relacionadas con el género.

30 En resumen, aunque se observaron algunos cambios reversibles en la bioquímica de la sangre durante el estudio, la inyección/infusión intravenosa de sTNALP-FcD10 hasta 180 mg/kg fue bien tolerada por los macacos cangrejeros jóvenes. Por lo tanto, en las condiciones de este estudio, la Dosis Tolerada Máxima se considera que es al menos 180 mg/kg.

EJEMPLO 17

Un estudio de toxicidad de inyección intravenosa durante 4 semanas (una vez a la semana) de sTNALP-FcD10 en ratas albinas jóvenes, seguido de un período de recuperación de 28 días

35 El objetivo de este estudio fue investigar la toxicidad potencial de sTNALP-FcD10 administrada una vez a la semana mediante inyección intravenosa a la rata joven durante un mínimo de 4 semanas consecutivas (total de 4 dosis),

seguido de 28 días de recuperación. Los animales se dosificaron en los días 1, 8, 15 y 22 del estudio, y el período de recuperación comenzó en el día 29 del estudio.

En la Tabla 8 a continuación se detalla el diseño del estudio.

Tabla 8: Diseño del estudio

Grupos	Nivel de dosis diana (mg/kg/dosis)	Nivel de dosis real (mg/kg/dosis)	Concentración diana (mg/ml)	Principal	Estudio principal		Estudio de recuperación	
				Concentración real (mg/ml)	Machos	Hembras	Machos	Hembras
1- Vehículo Control	0	0	0	0	10	10	5	5
2- Dosis baja	3	2,5	0,6	0,5	10	10	5	5
3- Dosis media	30	26	6	5,1	10	10	5	5
4- Dosis alta	90	77	18	15,3	10	10	5	5

5

Se evaluó lo siguiente: signos clínicos (dos veces al día), peso corporal (una vez durante el período de aclimatación, y semanalmente, comenzando en el Día 21 después del parto), consumo de alimento (semanalmente), oftalmología (final del tratamiento y final del período de recuperación), hematología (en la necropsia), química sérica (en la necropsia), análisis de orina (día 29 y al final del período de recuperación), marcadores bioquímicos del recambio óseo: osteocalcina (marcador de formación ósea) y telopéptido C (marcador de resorción ósea) (la mañana antes de la necropsia programada), evaluación de anticuerpos (Día -1 y en la necropsia), evaluación de la concentración sanguínea del artículo de ensayo (Día 16 y Día 23), densitometría ósea (mediante DXA *in vivo* Día -1, 28 para animales del estudio principal y de recuperación, y Día 14 y 56 para los animales del estudio de recuperación, y pQCT *ex vivo*), radiografía y observaciones macroscópicas en la necropsia, pesos de los órganos, e histopatología.

10

Un macho al que se le administró 90 mg/kg/dosis se encontró muerto en el Día 25 del estudio. Puesto que no se hicieron observaciones histológicas importantes (hemorragias pulmonar y tímica graduadas como ligeras y mínimas, respectivamente) para esta rata, la causa de su muerte fue indeterminada basándose en investigaciones patológicas. En el Día 23, este animal se sangró para la evaluación de la concentración sanguínea del artículo de ensayo, y este procedimiento puede haber contribuido a su muerte, puesto que no hay signos de toxicidad en el Día 22. No hubo mortalidad relacionada con sTNALP-FcD10 ni efectos sobre oftalmología, análisis de orina, marcador de formación ósea (osteocalcina), pesos de los órganos, patología visible, radiología o examen al microscopio.

15

20

Se considera que los signos clínicos relacionados con sTNALP-FcD10, observados en los grupos de 3, 30 y/o 90 mg/kg/dosis, son una reacción aguda a la infusión. Estos incluyeron ojos parcialmente cerrados, tono muscular disminuido, descanso sobre el lado, postura encorvada, frialdad al tacto, movimientos descoordinados, reducción de la actividad, andares anormales y/o triste, patas traseras y/o patas delanteras hinchadas rojas y/o firmes durante las observaciones por el lado de la caja a los 5, 15, 30 y/o 60 minutos después de la dosis. Estas observaciones fueron transitorias y no aparecieron en los días sin dosificación, o durante el período de recuperación.

25

Generalmente, se observó una tendencia del peso corporal y de la ganancia del peso corporal a disminuir ligeramente para machos en los grupos de 3, 30 y/o 90 mg/kg/dosis, durante el período de recuperación. El efecto sobre el tamaño óseo en dos huesos de esqueleto apendicular (fémur y en tibia) se correlacionó con la reducción de los pesos corporales. La disminución en el consumo de alimentos fue generalmente consistente con los pesos corporales reducidos.

30

Los pesos corporales fueron comparables a los controles para hembras tratadas con sTNALP-FcD10.

sTNALP-FcD10 administrada a 90 mg/kg/dosis se asoció generalmente con reducciones ligeras en neutrófilos, monocitos y/o eosinófilos absolutos, en comparación con el grupo de control. Adicionalmente, se observaron ligeros incrementos en linfocitos, plaquetas y reticulocitos absolutos, en comparación con el grupo de control. Al final del período de recuperación, estos pequeños cambios todavía eran manifiestos en los animales tratados con 90 mg/kg.

35

sTNALP-FcD10 se asoció generalmente con incrementos estadísticamente significativos relacionados con la dosis en fosfatasa alcalina en todos los grupos tratados, en comparación con los controles. Considerando la naturaleza del

artículo de ensayo (fosfatasa alcalina), la ausencia de cualesquiera cambios en otras enzimas hepáticas, y la ausencia de correlaciones histopatológicas, estos incrementos se atribuyen probablemente a niveles circulantes de sTNALP-FcD10. Se observaron ligeros incrementos estadísticamente significativos en el fósforo en machos tratados con sTNALP-FcD10 a 90 mg/kg/dosis durante la Semana 4, asociados con un incremento no significativo en el calcio total sérico. Al final de la recuperación, estos cambios, incluyendo aquellos estadísticamente significativos, volvieron a los valores del control.

No hubo cambios macroscópicos o microscópicos, radiológicos, de peso de los órganos, que se relacionaron con sTNALP-FcD10 en ratas jóvenes tratadas intravenosamente una vez a la semana con hasta 90 mg/kg/dosis durante 4 semanas consecutivas. No hubo efectos retrasados identificados en un subconjunto de estos animales a los que se les permitió una recuperación de 28 días después de terminar el tratamiento.

Se observaron valores medios de CTx ligeramente menores para hembras tratadas en comparación con los controles (logrando una significación estadística a 90 mg/kg/dosis). Estos menores valores no fueron consistentes con el análisis de la densidad ósea ni tampoco con los resultados obtenidos para machos; por lo tanto, no se puede excluir la naturaleza accidental de estas disminuciones.

La elevada variabilidad en los parámetros de densitometría ósea y geometría ósea observada entre grupos se atribuyó a la fase de crecimiento rápido. Al final de la recuperación, el área y BMC (que se evaluó mediante DXA y pQCT) fueron generalmente menores para machos tratados, sugiriendo huesos más pequeños para estos animales. El efecto sobre el tamaño óseo se observó en dos huesos de esqueleto apendicular (fémur y en la tibia) mediante dos técnicas diferentes; sin embargo, no se observó ningún efecto consistente para el esqueleto axial (sugiriendo la falta de efecto sobre la longitud de la coronilla a la rabadilla). Aunque el área y el BMC disminuyeron, los valores medios de BMD fueron generalmente comparables a los controles, sugiriendo que el efecto sobre BMC y sobre el área fue secundario frente al efecto sobre el crecimiento. Los menores pesos corporales y menor consumo de alimentos para machos tratados con relación a los controles son consistentes con estos datos. Sin embargo, el pequeño tamaño del grupo en la recuperación, la falta de consistencia con respecto al género, así como la variabilidad, confundieron estos resultados; por lo tanto, no se puede excluir completamente una naturaleza accidental para estas disminuciones.

En conclusión, la inyección intravenosa una vez por semana a la rata joven durante un mínimo de 4 semanas consecutivas, seguido de 28 días de recuperación, a dosis de 3, 30 y 90 mg/kg/dosis, dio como resultado signos clínicos asociados con efectos transitorios relacionados con la inyección, incluyendo actividad descoordinada y reducida e hinchamiento de la pata, observados hasta 60 minutos después de la dosis. Los machos tratados a 90 mg/kg/dosis mostraron pequeñas disminuciones en el peso corporal y en el consumo de alimentos, que se correlaciona con tibias y fémures ligeramente más pequeños, evaluados mediante técnicas de densitometría. Para las hembras, se obtuvieron valores medios ligeramente menores para los niveles del telopéptido C, en comparación con los controles. Los niveles séricos de fósforo aumentaron ligeramente, aunque de forma significativa, en el grupo de 90 mg/kg/dosis. Los niveles séricos elevados de fosfatasa alcalina se atribuyeron igualmente a niveles circulantes de sTNALP-FcD10. sTNALP-FcD10 no tuvo efectos significativos o consistentes sobre la densitometría ósea y la geometría ósea para hembras durante el período de tratamiento y el de recuperación. Para los machos, no se observaron efectos biológicamente significativos sobre la densitometría ósea o sobre la geometría ósea durante el período de tratamiento. En general, se observaron para machos pequeñas disminuciones en los parámetros de densitometría ósea (contenido mineral óseo y/o área evaluados mediante DXA y pQCT) y de geometría ósea con un peso corporal medio inferior correspondiente con relación a controles, en el final del período de recuperación. Todos los hallazgos se resolvieron después de un período de 28 días libre de tratamiento, con la excepción de los efectos sobre el peso corporal y el tamaño óseo para machos con dosis altas, que persistieron. No hay pruebas de calcificación ectópica al final del tratamiento o al final del período de recuperación. No hay hallazgos radiológicos, macroscópicos o microscópicos así como ningún cambio del peso de los órganos asociados con el tratamiento de sTNALP-FcD10 a ningún nivel de dosis. Debido a que la reacción a la inyección fue transitoria y no dio como resultado ningún efecto sobre cualesquiera parámetros para evaluar la toxicidad en los grupos de 3 y 30 mg/kg/dosis, no se consideró que era adversa. En el grupo de 90 mg/kg/dosis, esta reacción fue más grave, y estuvo acompañada por reducciones en la ganancia del peso corporal, consumo reducido de alimentos, y potencialmente disminución en el crecimiento óseo, y por lo tanto los efectos en este grupo se consideraron adversos. En consecuencia, se consideró que el nivel de efecto adverso no observable (NOAEL) es 30 mg/kg/dosis en este estudio.

EJEMPLO 18

Un estudio de toxicidad de inyección intravenosa durante 4 semanas en macacos cangrejeros jóvenes, seguido de un período de recuperación de 28 días

El propósito de este estudio fue determinar la toxicidad y toxicocinética de sTNALP-FcD10 en macacos cangrejeros jóvenes, cuando se administra una vez a la semana mediante inyección intravenosa de bolo durante 4 semanas, y evaluar la reversibilidad de cualesquiera cambios después de un período de recuperación de 28 días.

Las formulaciones de dosificación de control y del artículo de ensayo se administraron a macacos cangrejeros

jóvenes mediante inyección intravenosa lenta de bolo una vez a la semana durante 4 semanas, seguido de un período de recuperación de 28 días, como se indica en la Tabla 9 más abajo:

Tabla 9: Diseño del estudio

Grupo	Nivel de dosis (mg/kg)	Volumen de la dosis (ml/kg)	Conc. de la dosis (mg/ml)	Número de animales			
				Estudio principal		Recuperación	
				Machos	Hembras	Machos	Hembras
1 Control*	0	4	0	3	3	2	2
2 Dosis baja	5	4	1,25	3	3	2	2
3 Dosis media	15	4	3,75	3	3	2	2
4 Dosis alta	45	4	11,25	3	3	2	2

* Los animales del Grupo 1 recibieron el artículo de vehículo/control, 25 mM de fosfato de sodio pH 7,4, 150 mM de NaCl.

5 Después del último tratamiento (Día 22), los animales del Estudio Principal se eutanasiaron en el Día 29, mientras que los animales restantes de la Recuperación se observaron durante 28 días adicionales, después de lo cual se eutanasiaron en el Día 57. Todos los animales del Principal y de la Recuperación se sometieron a un examen de necropsia.

10 Las evaluaciones realizadas durante el estudio o a su terminación incluyeron mortalidad, estado clínico, peso corporal, apetito, medidas corporales, evaluaciones radiográficas del desarrollo óseo, oftalmología, electrocardiografía, toxicocinética, inmunogenicidad, hematología, coagulación, bioquímica, análisis de orina, biomarcadores de recambio óseo, pesos de los órganos, análisis de la densidad mineral ósea ex vivo, y grueso e histopatología.

Durante el estudio no se observó mortalidad ni observaciones clínicas adversas relacionadas con el tratamiento.

15 Basándose en las medidas corporales registradas al final del período de tratamiento y de recuperación, no hubo diferencias dignas de mención entre grupos para la circunferencia craneal, o longitudes del húmero, antebrazo, tibia o miembros pélvicos.

20 No hubo cambios en el peso corporal o en el consumo de alimentos relacionados con el tratamiento con el artículo de ensayo a ningún nivel de dosis. No hubo hallazgos oftalmológicos o electrocardiográficos relacionados con el artículo de ensayo a ningún nivel de dosis. No hubo cambios hematológicos, morfológicos de los glóbulos rojos, de coagulación o de análisis de orina relacionados con el tratamiento con el artículo de ensayo a ningún nivel de dosis. No hubo cambios toxicológicamente significativos entre los parámetros de bioquímica clínica durante los períodos de tratamiento o de recuperación. Se observó un incremento ligero a pronunciado, relacionado con la dosis, en la fosfatasa alcalina en todos los animales tratados con el artículo de ensayo en la mayoría de las ocasiones de evaluación durante el período de tratamiento. Los niveles de fosfatasa alcalina fueron generalmente más comparables con los valores de control hacia el final del período de recuperación. Puesto que el artículo de ensayo es una fosfatasa alcalina sintética, este incremento fue debido principalmente a la presencia del fármaco en el torrente sanguíneo de los animales después de cada dosis, y de este modo se considera que los incrementos son no adversos.

30 Al final de los períodos de tratamiento y recuperación, no hubo diferencias dignas de mención entre grupos en los pesos absolutos o relativos de los órganos, ni hubo hallazgos macroscópicos o microscópicos relacionados con el artículo de ensayo. Los cambios histológicos observados se consideraron hallazgos accidentales, hallazgos comunes de los antecedentes en esta especie, o hallazgos relacionados en cierto aspecto con la manipulación experimental. Los órganos reproductores estaban generalmente inmaduros, pero se consideraron normales para esta edad en el mono.

35 En conclusión, la inyección intravenosa semanal de sTNALP-FcD10 a macacos cangrejeros machos y hembras durante 4 semanas, a niveles de dosis de 0, 5, 15 y 45 mg/kg, y seguido de un período de recuperación de 4 semanas, no mostró signos de toxicidad a ningún nivel de dosis. Por lo tanto, en este estudio, se consideró que el nivel de dosis alta, 45 mg/kg, es el Nivel de Efecto Adverso No Observado (NOAEL).

40 EJEMPLO 19

Determinación de la dosis de partida recomendada máxima para ser humano

La dosis de partida recomendada máxima (MRSD) para ser humano se calcula estableciendo el Nivel de Efecto Adverso No Observado (NOAEL, véase Guidance for Industry and Reviewers. Diciembre de 2002). Se han ensayado en ratones, ratas y monos, diversas concentraciones de la formulación descrita anteriormente, incluyendo 1 mg/kg, 5 mg/kg, y 8,2 mg/kg diariamente de forma subcutánea; 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg, 45 mg/kg, 90 mg/kg y 180 mg/kg. El NOAEL para la especie más sensible, a saber, para la rata, fue 30 mg/kg.

Esta dosis se aumentó en escala hasta una dosis equivalente humana (HED) usando tablas de conversión publicadas que proporcionan un factor de conversión desde la rata al ser humano de 6. Un NOAEL de 30 mg/kg para esa especie es equivalente a 5 mg/kg en ser humano.

Este valor (5 mg/kg) se dividió entre un factor de seguridad de diez. La MRSD calculada es de este modo 0,5 mg/kg. De este modo, para un ser humano medio que pese 60 kg, se podría inyectar una dosis semanal de 30 mg o una dosis diaria de 4,28 mg, diariamente, para comenzar los ensayos clínicos.

REFERENCIAS

1. Ali, S.Y., Sajdera, S.W. y Anderson, H.C. Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67, 1513-20 (1970).

2. Anderson, HC, Hsu, H.H., Morris, D.C., Fedde, K.N. y Whyte, M.P. 1997 Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals. *Am J Pathol* 151 1555-61.

3. Anderson HC, Garimella R y Tague SE 2005a The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Frontiers in Bioscience* 10 822-837.

4. Anderson HC, Harmey D, Camacho NP, Garimella R, Sipe JB, Tague S, Bi XH, Johnson K, Terkeltaub R y Millan JL 2005b Sustained osteomalacia of long bones despite major improvement in other hypophosphatasia-related mineral deficits in tissue nonspecific alkaline phosphatase/nucleotidic pyrophosphatase phosphodiesterase 1 double-deficient mice. *American Journal of Pathology* 166 1711-1720.

5. Anderson HC y Reynolds JJ 1973 Pyrophosphate stimulation of calcium uptake into cultured embryonic bones. Fine structure of matrix vesicles and their role in calcification. *Developmental Biology* 34 211-227.

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

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

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

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

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

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

12. Harmey D, Johnson KA, Zelken J, Camacho NP, Hoylaerts MF, Noda M, Terkeltaub R y Millan JL 2006 Elevated skeletal osteopontin levels contribute to the hypophosphatasia phenotype in Akp2(-/-) mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 21 1377-1386.

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

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

15. Henthorn, P.S., Raducha, M., Fedde, K.N., Lafferty, M.A. y Whyte, M.P. 1992a Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9924-8.
- 5 16. Henthorn, P.S. y Whyte, M.P. 1992b Missense mutations of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in hypophosphatasia. *Clin Chem* 38, 2501-5.
17. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, Terkeltaub R y Millan JL 2002 Tissue- nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of boneminerlization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 9445-9449.
- 10 18. Ikezawa H 2002 Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored Proteins. *Biol Pharm. Bull.* 25(4) 409-417.
19. Jansonius JN 1998 Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Current Opinion in Structural Biology* 8 759-769.
- 15 20. Johnson K, Moffa A, Chen Y, Pritzker K, Goding J y Terkeltaub R 1999 Matrix vesicle plasma cell membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 14 883-892.
21. Mahmood I, Green MD, y Fisher JE 2003 Selection of the First-Time Dose in Humans: Comparison of Different Approaches Based on Interspecies Scaling of Clearance. *J. Clin. Pharmacol.*, 43 (7), 692-7.
22. Meyer, J.L. 1984 Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch Biochem Biophys* 231 1-8.
- 20 23. Millan, J.L. 2006 *Mammalian Alkaline Phosphatases. From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology*, Wiley-VCH Verlag GmbH y Co., Weinheim, Germany 1-322.
24. Morris, D.C., Masuhara, K., Takaoka, K., Ono, K. y Anderson, H.C. 1992 Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone. *Bone Miner* 19 287-98.
- 25 25. Murshed M, Harmey D, Millan JL, McKee MD y Karsenty G 2005 Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes and Development* 19 1093-1104.
26. Nasu M, Ito M, Ishida Y, Numa N, Komaru K, Nomura S and Oda K 2006 Aberrant interchain disulfide bridge of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with an Arg433 . Cys substitution associated with severe hypophosphatasia *FEBS Journal* 273 5612-5624.
- 30 27. Narisawa S, Frohlander N y Millan JL 1997 Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Developmental Dynamics* 208 432-446.
28. Narisawa S, Wennberg C y Millan JL 2001 Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knockout mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *Journal of Pathology* 193 125-133.
- 35 29. Nishioka T, Tomatsu S, Gutierrez MA, Miyamoto K, Trandafirescu GG, Lopez PLC, Grubb JH, Kanai R, Kobayashi H, Yamaguchi S, Gottesman GS, Cahill R, Noguchi A y Sly WS 2006 Enhancement of drug delivery to bone: Characterization of human tissue-nonspecific alkaline phosphatase tagged with an acidic oligopeptide. *Molecular Genetics and Metabolism* 88 244-255.
- 40 30. Nosjean O, Koyama I, Goseki M, Roux B y Komoda T 1997 Human tissue non-specific alkaline phosphatases: Sugar-moiety-induced enzymic and antigenic modulations and genetic aspects. *Biochemical Journal* 321 297-303.
31. Oda *et al.* 1999 *J. Biochem* 126: 694-699.
32. Rezende LA, Ciancaglini P, Pizauro JM y Leone FA 1998 Inorganic pyrophosphate-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. *Cellular and Molecular Biology* 44 293-302.
- 45 33. Urlaub G, Kas E, Carothers AM y Chasin LA 1983 Deletion of the Diploid Dihydrofolate-Reductase Locus from Cultured Mammalian-Cells. *Cell* 33 405-412.
34. Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP y MacGregor GR 1995 Mice Lacking Tissue Nonspecific Alkaline-Phosphatase Die from Seizures Due to Defective Metabolism of Vitamin-B-6. *Nature Genetics* 11 45-51.
- 50 35. Weiss, M.J. *et al.* 1988 A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 7666-9.

36. Weninger M, Stinson RA, Plenk H, Bock P y Pollak A 1989 Biochemical and Morphological Effects of Human Hepatic Alkaline-Phosphatase in A Neonate with Hypophosphatasia. *Acta Paediatrica Scandinavica* 154-160.
37. Whyte MP 1994 Hypophosphatasia and the Role of Alkaline-Phosphatase in Skeletal Mineralization. *Endocrine Reviews* 15 439-461.
- 5 38. Whyte M.P. 1995 Alkaline Phosphatase: Placental and Tissue-nonspecific Isoenzymes hydrolyze Phosphoeth- anolamine, Inorganic Pyrophosphate, and Pyridoxal 5'-phosphate *J. Clin. Invest.* 95:1440-1445.
39. Whyte MP 2001 Hypophosphatasia. En *The Metabolic and Molecular Bases of Disease*, 8ª ed., p. 5313-5329. Eds CL Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle y B Vogelstein. New York: McGraw-Hill Book Company.
- 10 40. Whyte MP 2002 Hypophosphatasia. Nature's window on alkaline phosphatase function in man. In *Principle of Bone Biology*, segunda ed., p 1229-1248. Eds JP Bilezikian, LG Raisz y GA Rodan. London: Academic Press.
41. Whyte MP, Kurtzberg J, McAlisterWH, Mumm S, Podgornik MN, Coburn SP, Ryan LM, Miller CR, Gottesman GS, Smith AK, Douville J, Waters P, Armstrong RD y Martin PL 2003 Marrow cell transplantation for infantile hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* 18 624-636.
- 15 42. Whyte MP, Mahuren JD, Vrabel LA y Coburn SP 1985 Markedly Increased Circulating Pyridoxal-5'-Phosphate Levels in Hypophosphatasia-Alkaline- Phosphatase Acts in Vitamin-B6 Metabolism. *Journal of Clinical Investigation* 76 752-756.
43. Whyte MP, McAlisterWH, Patton LS, Magill HL, Fallon MD, LorentzWB y Herrod HG 1984 Enzyme replacement therapy for infantile hypophosphatasia attempted by intravenous infusions of alkaline phosphatase-rich Paget plasma: results in three additional patients. *J Pediatr* 105 926-933.
- 20 44. Whyte MP, Valdes R, Ryan LM y 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.
45. Zurutuza L, Muller F, Gibrat JF, Taillandier A, Simon-Bouy B, Serre JL y Mornet E 1999 Correlations of genotype and phenotype in hypophosphatasia. *Human Molecular Genetics* 8 1039-1046.
- 25 46. Beertsen W., Van den Bos T, Everts V, 1999, Root development in mice lacking functional tissue non-specific alkaline phosphatase gene: Inhibition of acellular cementum formation. *J. Dent. Res.* 78:1221-1229.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ENOBIA PHARMA INC.
- Crine, Philippe
- 30 Boileau, Guy
- Loisel Thomas P.
- Lemire, Isabelle
- Leonard, Pierre
- Heft, Robert
- 35 Landy, Hal
- <120> FOSFATASA ALCALINA DIRIGIDA AL HUESO, KITS Y MÉTODOS DE USO DE LA MISMA
- <130> 765/12987,80
- <150> US 60/917.589
- <151> 11-05-2007
- 40 <160> 19
- <170> Patent In version 3.3
- <210> 1
- <211>743

ES 2 380 546 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> hTNALP-Fc-d10 con señal peptídica

5

<400> 1

```

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

					325					330						335	
Asp	His	Gly	His	His	Glu	Gly	Lys	Ala	Lys	Gln	Ala	Leu	His	Glu	Ala		
			340					345					350				
Val	Glu	Met	Asp	Arg	Ala	Ile	Gly	Gln	Ala	Gly	Ser	Leu	Thr	Ser	Ser		
		355					360					365					
Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Val	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ser	His	Val	Phe	Thr		
	370						375				380						
Phe	Gly	Gly	Tyr	Thr	Pro	Arg	Gly	Asn	Ser	Ile	Phe	Gly	Leu	Ala	Pro		
385					390					395					400		
Met	Leu	Ser	Asp	Thr	Asp	Lys	Lys	Pro	Phe	Thr	Ala	Ile	Leu	Tyr	Gly		
				405					410						415		
Asn	Gly	Pro	Gly	Tyr	Lys	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Arg	Glu	Asn	Val	Ser		
			420					425					430				
Met	Val	Asp	Tyr	Ala	His	Asn	Asn	Tyr	Gln	Ala	Gln	Ser	Ala	Val	Pro		
		435					440					445					
Leu	Arg	His	Glu	Thr	His	Gly	Gly	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Phe	Ser	Lys		
	450					455					460						
Gly	Pro	Met	Ala	His	Leu	Leu	His	Gly	Val	His	Glu	Gln	Asn	Tyr	Val		
465					470					475					480		
Pro	His	Val	Met	Ala	Tyr	Ala	Ala	Cys	Ile	Gly	Ala	Asn	Leu	Gly	His		
				485					490					495			
Cys	Ala	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Lys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro		
			500					505					510				
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro		
		515					520					525					
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr		
	530					535					540						
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn		
545					550					555					560		

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
740

- <210>2
- <211>502
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> hTNALP 1-502
- <400> 2

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

Cys Ala Pro Ala Ser Ser
 500

<210>3

<211>227

<212> PRT

5

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento Fc de IgG-1

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 225

<210>4

<211>726

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> hsTNALP-Fc-d10 sin peptide señal

<400> 4

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Asp Asp Asp Asp Asp
725

<210>5

<211>485

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> hsTNALP (18-502)

ES 2 380 546 T3

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu Lys
 210 215 220

Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp Lys
 225 230 235 240

Ser Phe Lys Pro Arg Tyr Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg Thr
 245 250 255

Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val Asp Tyr Leu Leu Gly Leu
 260 265 270

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

Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val Ala Ile Gln Ile Leu Arg
 290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

Ala Pro Ala Ser Ser
 485

- <210>6
- <211> 524
- <212> PRT
- <213> bos taurus
- <400> 6

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

Met Tyr Asn Ile Lys Asp Ile Glu Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- <210>7
- <211> 524
- <212> PRT
- <213> felis catus
- <400> 7

5

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

<210>8

<211> 524

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

				165					170							175
Ala	Tyr	Ala	His	Ser	Ala	Asp	Arg	Asp	Trp	Tyr	Ser	Asp	Asn	Glu	Met	
			180					185					190			
Pro	Pro	Glu	Ala	Leu	Ser	Gln	Gly	Cys	Lys	Asp	Ile	Ala	Tyr	Gln	Leu	
		195					200					205				
Met	His	Asn	Ile	Arg	Asp	Ile	Asp	Val	Ile	Met	Gly	Gly	Gly	Arg	Lys	
	210					215					220					
Tyr	Met	Tyr	Pro	Lys	Asn	Lys	Thr	Asp	Val	Glu	Tyr	Glu	Ser	Asp	Glu	
225					230					235					240	
Lys	Ala	Arg	Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Gly	Leu	Asp	Leu	Val	Asp	Thr	Trp	
				245					250					255		
Lys	Ser	Phe	Lys	Pro	Arg	Tyr	Lys	His	Ser	His	Phe	Ile	Trp	Asn	Arg	
			260					265					270			
Thr	Glu	Leu	Leu	Thr	Leu	Asp	Pro	His	Asn	Val	Asp	Tyr	Leu	Leu	Gly	
		275					280					285				
Leu	Phe	Glu	Pro	Gly	Asp	Met	Gln	Tyr	Glu	Leu	Asn	Arg	Asn	Asn	Val	
	290					295					300					
Thr	Asp	Pro	Ser	Leu	Ser	Glu	Met	Val	Val	Val	Ala	Ile	Gln	Ile	Leu	
305					310					315					320	
Arg	Lys	Asn	Pro	Lys	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Val	Glu	Gly	Gly	Arg	Ile	
				325					330					335		
Asp	His	Gly	His	His	Glu	Gly	Lys	Ala	Lys	Gln	Ala	Leu	His	Glu	Ala	
			340					345					350			
Val	Glu	Met	Asp	Arg	Ala	Ile	Gly	Gln	Ala	Gly	Ser	Leu	Thr	Ser	Ser	
		355					360					365				
Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Val	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ser	His	Val	Phe	Thr	
	370					375					380					
Phe	Gly	Gly	Tyr	Thr	Pro	Arg	Gly	Asn	Ser	Ile	Phe	Gly	Leu	Ala	Pro	
385					390					395					400	

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210>9
 <211> 524
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 <400> 9

5

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

ES 2 380 546 T3

<211> 524

<212> PRT

<213> rattus norvegicus

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Asp Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser

ES 2 380 546 T3

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

<210> 11

<211>502

<212> PRT

5 <213> Canis familiaris

<400> 11

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Val Gly Ile Leu Phe
 500

<210> 12

<211> 528

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 12

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

<210> 13

<211> 532

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Thr Ala Pro
 530

<210> 14

<211>535

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 14

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

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

ES 2 380 546 T3

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

Leu Glu Thr Ala Thr Ala Pro
 530 535

<210> 15

<211> 541

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> ALP de consenso: TNALP procedente de diversas especies de mamíferos e isozimas de ALP humana PLAP, GCALP, IALP (con péptido señal y dominio de anclaje de GPI)

<220>

10 <221> característica diversa

<222> (1)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (5)..(9)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente

<220>

<221> característica diversa

<222> (10)..(21)

20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto fenilalanina

25 <220>

<221> característica diversa

<222> (23)..(27)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

- <220>
 <221> característica diversa
 <222> (29)..(30)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 5 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto cisteína
- <220>
 <221> característica diversa
 15 <222> (35)..(37)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
 <221> característica diversa
 <222> (39)..(41)
 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
 <221> característica diversa
 <222> (43)..(44)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 25 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (46)..(47)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
 30 <221> característica diversa
 <222> (50)..(53)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> (54)..(54)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
- <220>

- <221> característica diversa
<222> (55)..(55)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 5 <221> VARIANTE
<222> (56)..(56)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto serina o valina
<220>
- <221> característica diversa
10 <222> (59)..(59)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (61)..(61)
15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> VARIANTE
<222> (67)..(67)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto leucina, isoleucina o valina
20 <220>
- <221> característica diversa
<222> (70)..(70)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 25 <221> característica diversa
<222> (75)..(75)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
30 <222> (B2)..(86)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (88)..(88)
35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa

- <222> (90)..(91)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 5 <222> (93)..(93)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 10 <222> (96)..(96)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- <222> (99)..(100)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>
<221> característica diversa
<222> (107)..(111)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 20 <221> VARIANTE
<222> (116)..(116)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto treonina
<220>
<221> VARIANTE
- 25 <222> (117)..(117)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto serina
<220>
<221> VARIANTE
- <222> (128)..(128)
- 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto aspartato
<220>
<221> característica diversa
<222> (130)..(131)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (133)..(133)

- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto metionina
<220>
<221> característica diversa
<222> (135)..(135)
- 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> VARIANTE
<222> (139)..(139)
- 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto histidina o asparagina
<220>
<221> característica diversa
<222> (140)..(140)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 15 <221> VARIANTE
<222> (141)..(141)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto histidina
<220>
<221> característica diversa
- 20 <222> (142)..(143)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (148)..(148)
- 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> VARIANTE
<222> (153)..(153)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto alanina o isoleucina
- 30 <220>
<221> característica diversa
<222> (155)..(158)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 35 <221> característica diversa
<222> (161)..(162)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

- <220>
<221> característica diversa
<222> (168)..(168)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (175)..(175)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto aspartato
- <220>
10 <221> característica diversa
<222> (178)..(178)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> característica diversa
15 <222> (180)..(180)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> VARIANTE
<222> (181)..(181)
20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto treonina
- <220>
<221> VARIANTE
<222> (182)..(182)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto treonina
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (186)..(186)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto leucina
- <220>
30 <221> característica diversa
<222> (187)..(188)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> característica diversa
35 <222> (190)..(190)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>

- <221> característica diversa
<222> (195)..(195)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 5 <221> VARIANTE
<222> (196)..(196)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto lisina o glicina
<220>
- <221> VARIANTE
10 <222> (197)..(197)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto treonina
<220>
- <221> característica diversa
<222> (199)..(200)
15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (202)..(204)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
20 <220>
- <221> característica diversa
<222> (207)..(207)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 25 <221> característica diversa
<222> (211)..(211)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
30 <222> (214)..(215)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> VARIANTE
<222> (217)..(217)
35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto fenilalanina
<220>
- <221> VARIANTE

- <222> (218)..(218)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
<220>
<221> característica diversa
- 5 <222> (221)..(221)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 10 <222> (224)..(224)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- <222> (232)..(237)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>
<221> característica diversa
- <222> (239)..(239)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 20 <221> VARIANTE
<222> (240)..(240)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto glicina
<220>
<221> característica diversa
- 25 <222> (242)..(243)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- <222> (245)..(248)
- 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- <222> (250)..(250)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 35 <220>
<221> característica diversa
<222> (255)..(256)

- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (258)..(260)
- 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (262)..(262)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (263)..(265)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
<220>
- 15 <221> característica diversa
<222> (266)..(268)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> VARIANTE
- 20 <222> (269)..(269)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto arginina
<220>
<221> característica diversa
<222> (270)..(274)
- 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (279)..(279)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 30 <220>
<221> característica diversa
<222> (281)..(286)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 35 <221> VARIANTE
<222> (287)..(287)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente

- <220>
<221> característica diversa
<222> (288)..(288)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 5 <220>
<221> característica diversa
<222> (290)..(291)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 10 <220>
<221> característica diversa
<222> (293)..(293)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (297)..(297)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto lisina
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (301)..(301)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto valina, treonina o isoleucina
- 25 <220>
<221> característica diversa
<222> (302)..(302)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (305)..(305)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto prolina
- 35 <220>
<221> característica diversa
<222> (306)..(306)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> característica diversa
<222> (308)..(311)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>

- <221> característica diversa
<222> (316)..(316)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 5 <221> característica diversa
<222> (319)..(321)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 10 <221> característica diversa
<222> (323)..(325)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (327)..(331)
- 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> VARIANTE
<222> (334)..(334)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto leucina
- 20 <220>
- <221> característica diversa
<222> (336)..(336)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 25 <221> característica diversa
<222> (349)..(350)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
- 30 <222> (352)..(353)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (356)..(356)
- 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa

- <222> (358)..(359)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> VARIANTE
- 5 <222> (360)..(360)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto aspartato
<220>
<221> VARIANTE
<222> (361)..(361)
- 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto treonina o isoleucina
<220>
<221> característica diversa
<222> (363)..(363)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>
<221> característica diversa
<222> (366)..(367)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 20 <221> característica diversa
<222> (370)..(371)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 25 <222> (374)..(375)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (379)..(379)
- 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> VARIANTE
<222> (380)..(380)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto metionina
- 35 <220>
<221> característica diversa
<222> (390)..(390)

- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> VARIANTE
<222> (395)..(395)
- 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto leucina
<220>
<221> característica diversa
<222> (396)..(396)
- 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (399)..(399)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 15 <221> característica diversa
<222> (407)..(410)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> VARIANTE
- 20 <222> (411)..(411)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
<220>
<221> característica diversa
<222> (413)..(413)
- 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (415)..(415)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 30 <221> VARIANTE
<222> (416)..(416)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto leucina
<220>
- 35 <221> característica diversa
<222> (418)..(419)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

- <220>
<221> característica diversa
<222> (428)..(428)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (429)..(429)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto alanina
- <220>
10 <221> VARIANTE
<222> (430)..(430)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto metionina
- <220>
<221> característica diversa
15 <222> (431)..(431)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> característica diversa
<222> (433)..(433)
20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> VARIANTE
<222> (435)..(435)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto lisina
- 25 <220>
<221> característica diversa
<222> (436)..(436)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
30 <221> característica diversa
<222> (438)..(441)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> VARIANTE
35 <222> (442)..(442)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto histidina
- <220>

- <221> característica diversa
<222> (443)..(446)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 5 <221> característica diversa
<222> (448)..(449)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> VARIANTE
- 10 <222> (451)..(451)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto prolina
<220>
- <221> VARIANTE
<222> (456)..(456)
- 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto histidina o cisteína
<220>
- <221> característica diversa
<222> (457)..(457)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
<222> (461)..(461)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto serina o aspartato
<220>
- 25 <221> característica diversa
<222> (469)..(470)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> VARIANTE
- 30 <222> (473)..(473)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto treonina
<220>
- <221> característica diversa
<222> (477)..(477)
- 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa

- <222> (481)..(481)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> VARIANTE
- 5 <222> (484)..(484)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto leucina
<220>
<221> característica diversa
- 10 <222> (485)..(487)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- <222> (492)..(492)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>
<221> característica diversa
- <222> (494)..(494)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 20 <221> VARIANTE
<222> (496)..(496)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto fenilalanina
<220>
- <221> VARIANTE
- 25 <222> (497)..(497)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto arginina
<220>
- <221> VARIANTE
- <222> (498)..(501)
- 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
<220>
- <221> característica diversa
- <222> (502)..(507)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 35 <220>
<221> característica diversa
- <222> (509)..(516)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (517)..(520)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (521)..(524)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 10 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (526)..(532)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 15 <221> característica diversa
 <222> (534)..(534)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> VARIANTE
 20 <222> (535)..(541)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
 <400> 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Pro Xaa
 20 25 30

Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Leu
 35 40 45

ES 2 380 546 T3

Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Asn Xaa Ile Xaa Phe Leu Gly
50 55 60

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

Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Glu Xaa Xaa Leu Xaa Met Asp Xaa
85 90 95

Phe Pro Xaa Xaa Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val
100 105 110

Pro Asp Ser Xaa Xaa Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Xaa
115 120 125

Asn Xaa Xaa Thr Xaa Gly Xaa Ser Ala Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
130 135 140

Asn Thr Thr Xaa Gly Asn Glu Val Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Lys
145 150 155 160

Xaa Xaa Gly Lys Ser Val Gly Xaa Val Thr Thr Thr Arg Val Xaa His
165 170 175

Ala Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Tyr Ala His Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Trp Tyr
180 185 190

Ser Asp Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Gly Cys Xaa Asp
195 200 205

Ile Ala Xaa Gln Leu Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Asp Ile Xaa Val Ile Xaa
210 215 220

Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Glu
225 230 235 240

Tyr Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Arg Leu Asp Gly Xaa Xaa
245 250 255

Leu Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
260 265 270

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

500

505

510

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 515 520 525

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 530 535 540

<210> 16

<211> 524

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> TNALP de consenso procedente de diversas especies de mamíferos (con péptido señal y dominio de anclaje de GPI)

<220>

10 <221> característica diversa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

15 <222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (14)..(16)

20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (18)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25 <220>

<221> característica diversa

<222> (24)..(24)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

30 <221> característica diversa

<222> (27)..(27)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

- <220>
 <221> característica diversa
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 5 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 10 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (42)..(42)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 20 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (51)..(51)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto serina o valina
- 30 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (54)..(54)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 35 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (70)..(70)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 40 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (80)..(81)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 45 <220>

- <221> característica diversa
<222> (86)..(86)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 5 <221> característica diversa
<222> (94)..(94)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 10 <221> característica diversa
<222> (135)..(135)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (137)..(138)
- 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (157)..(157)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
<222> (177)..(177)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto treonina
<220>
- 25 <221> característica diversa
<222> (210)..(210)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> VARIANTE
- 30 <222> (212)..(212)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto fenilalanina
<220>
- <221> característica diversa
<222> (213)..(213)
- 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa

- <222> (216)..(216)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 5 <222> (227)..(227)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 10 <222> (231)..(231)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- <222> (238)..(238)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>
<221> característica diversa
- <222> (242)..(243)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 20 <221> característica diversa
<222> (245)..(245)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 25 <222> (251)..(251)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- <222> (253)..(255)
- 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- <222> (258)..(258)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 35 <220>
<221> característica diversa
- <222> (262)..(263)

- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (268)..(269)
- 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (274)..(274)
- 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (277)..(277)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 15 <221> característica diversa
<222> (281)..(282)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> VARIANTE
- 20 <222> (291)..(291)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto lisina
<220>
<221> característica diversa
<222> (303)..(304)
- 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (314)..(315)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 30 <221> característica diversa
<222> (317)..(318)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 35 <221> característica diversa
<222> (321)..(321)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

- <220>
<221> característica diversa
<222> (323)..(325)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 5 <220>
<221> característica diversa
<222> (357)..(357)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 10 <220>
<221> característica diversa
<222> (361)..(361)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>
<221> característica diversa
<222> (364)..(365)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 20 <220>
<221> característica diversa
<222> (368)..(369)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> VARIANTE
<222> (374)..(374)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural excepto metionina
- 25 <220>
<221> característica diversa
<222> (402)..(402)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 30 <220>
<221> característica diversa
<222> (412)..(412)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 35 <220>
<221> característica diversa
<222> (425)..(425)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>

- <221> característica diversa
<222> (463)..(463)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 5 <221> característica diversa
<222> (475)..(475)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 10 <221> característica diversa
<222> (480)..(480)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (488)..(488)
- 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (494)..(495)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 20 <220>
- <221> característica diversa
<222> (499)..(499)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 25 <221> característica diversa
<222> (501)..(501)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
- 30 <222> (503)..(508)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (510)..(510)
- 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa

<222> (512)..(512)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

5

<222> (514)..(514)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (517)..(522)

10

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 16

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

Leu Xaa Leu Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Phe
 515 520

<210> 17

<211> 2232

<212> ADN

5

<213> Artificial

<220>

<223> hsTNALP-FcD10

<400> 17

atggtttcac cattcttagt actggccatt ggcacctgcc ttactaactc cttagtgcc 60
 gagaaagaga aagaccccaa gtactggcga gaccaagcgc aagagacact gaaatatgcc 120
 ctggagcttc agaagctcaa caccaacgtg gctaagaatg tcatcatggt cctggggagat 180
 gggatgggtg tctccacagt gacggctgcc cgcacacctca agggtcagct ccaccacaac 240
 cctggggagg agaccaggct ggagatggac aagtteccct tcgtggccct ctccaagacg 300
 tacaacacca atgcccaggt ccctgacagc gccggcaccg ccaccgcta cctgtgtggg 360
 gtgaaggcca atgagggcac cgtgggggta agcgcagcca ctgagcgttc ccggtgcaac 420
 accaccagg ggaacgaggt cacctccatc ctgctgctggg ccaaggacgc tgggaaatct 480
 gtgggcattg tgaccaccac gagagtgaac catgccacce ccagegcegc ctacgcccac 540
 tcggctgacc gggactggta ctcagacaac gagatgcccc ctgaggcctt gagccagggc 600
 tgtaaggaca tcgctacca gctcatgcat aacatcaggg acattgacgt gatcatgggg 660
 ggtggccgga aatacatgta cccaagaat aaaactgatg tggagtatga gagtgacgag 720
 aaagccagg gacagaggct ggacggcctg gacctegttg acacctggaa gagcttcaaa 780
 ccgagataca agcactccca cttcatctgg aaccgcacgg aactcctgac ccttgacccc 840

ES 2 380 546 T3

cacaatgtgg actacctatt gggctctctc gagccagggg acatgcagta cgagctgaac 900
 aggaacaacg tgacggacce gtcactctcc gagatggtgg tgggtggccat ccagatcctg 960
 cggaagaacc ccaaaggett cttcttgctg gtggaaggag gcagaattga ccacggggcac 1020
 catgaaggaa aagccaagca ggccttgcac gaggcggtgg agatggaccg ggccatcggg 1080
 caggcaggca gcttgacctc ctcggaagac actctgaccg tggtcactgc ggaccattcc 1140
 cacgtcttca catttggtgg atacaccccc cgtggcaact ctatcttggg tctggccccc 1200
 atgctgagtg acacagacaa gaagcccttc actgccatcc tgtatggcaa tgggcctggc 1260
 tacaagggtg tgggctggtg acgagagaat gtctccatgg tggactatgc tcacaacaac 1320
 taccaggcgc agtctgctgt gcccctgcgc cacgagacce acggcgggga ggacgtggcc 1380
 gtcttctcca agggcccat ggcgcacctg ctgcacggcg tccacgagca gaactacgtc 1440
 cccacgtga tggcgtatgc agcctgcacc ggggccaacc tggccactg tgcctctgcc 1500
 agctcgctta aggacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 1560
 ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc 1620
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 1680
 tggtaactgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 1740
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1800
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1860
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1920
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttgggtca aaggcttcta tcccagcgac 1980
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 2040
 gtgctggact ccgacggctc cttcttcttc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 2100
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 2160
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaagatatcg atgacgatga cgatgacgat 2220
 gacgatgact ag 2232

<210> 18

<211> 541

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> ALP de consenso: TNALP procedente de diversas especies de mamíferos e isozimas de ALP humana PLAP, GCALP, IALP (con péptido señal y dominio de anclaje de GPI)

<220>

- <221> característica diversa
<222> (1)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 5 <221> VARIANTE
<222> (5)..(9)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
<220>
- 10 <221> característica diversa
<222> (10)..(21)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> VARIANTE
<222> (22)..(22)
- 15 <223> Xaa es serina o glicina
<220>
- <221> característica diversa
<222> (23)..(27)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 20 <220>
- <221> característica diversa
<222> (29)..(30)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 25 <221> característica diversa
<222> (32)..(32)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> VARIANTE
- 30 <222> (33)..(33)
<223> Xaa es tirosina o fenilalanina
<220>
- <221> característica diversa
<222> (35)..(37)
- 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa

<222> (39)..(41)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
5 <222> (43)..(44)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (46)..(47)
10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (50)..(53)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (54)..(54)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
<220>
20 <221> característica diversa
<222> (55)..(55)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
25 <222> (59)..(59)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (61)..(61)
30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (70)..(70)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
35 <220>
<221> característica diversa
<222> (75)..(75)

- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (82)..(86)
- 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (88)..(88)
- 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (90)..(91)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 15 <221> característica diversa
<222> (93)..(93)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 20 <222> (96)..(96)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (99)..(100)
- 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (107)..(111)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 30 <221> VARIANTE
<222> (116)..(117)
- <223> Xaa s alanina o glicina
<220>
- 35 <221> VARIANTE
<222> (128)..(128)
- <223> Xaa es alanina o glicina

- <220>
<221> característica diversa
<222> (130)..(131)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (133)..(133)
<223> Xaa es valina o isoleucina
- <220>
10 <221> característica diversa
<222> (135)..(135)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> VARIANTE
15 <222> (139)..(139)
<223> Xaa es treonina o alanina
- <220>
<221> característica diversa
<222> (140)..(140)
20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> VARIANTE
<222> (141)..(141)
<223> Xaa es arginina o fenilalanina
- 25 <220>
<221> característica diversa
<222> (142)..(143)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
30 <221> característica diversa
<222> (148)..(148)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> característica diversa
35 <222> (155)..(158)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>

- <221> característica diversa
<222> (161)..(162)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 5 <221> característica diversa
<222> (168)..(168)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 10 <221> VARIANTE
<222> (175)..(175)
<223> Xaa es asparagina o glutamina
<220>
- <221> característica diversa
<222> (178)..(178)
- 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (180)..(180)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
<222> (181)..(181)
<223> Xaa es alanina o glicina
<220>
- 25 <221> VARIANTE
<222> (182)..(182)
<223> Xaa es alanina, serina o treonina
<220>
- <221> VARIANTE
- 30 <222> (186)..(186)
<223> Xaa es serina o treonina
<220>
- <221> característica diversa
<222> (187)..(188)
- 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa

- <222> (190)..(190)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 5 <222> (195)..(195)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> VARIANTE
- <222> (196)..(196)
- 10 <223> Xaa es glutamato o aspartato
<220>
<221> VARIANTE
- <222> (197)..(197)
<223> Xaa es metionina o valina
- 15 <220>
<221> característica diversa
- <222> (199)..(200)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 20 <221> característica diversa
<222> (202)..(204)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 25 <222> (207)..(207)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- <222> (211)..(211)
- 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- <222> (214)..(215)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 35 <220>
<221> VARIANTE
- <222> (217)..(217)

- <223> Xaa es isoleucina, valina o metionina
<220>
<221> VARIANTE
<222> (218)..(218)
- 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
<220>
<221> característica diversa
<222> (221)..(221)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 10 <220>
<221> característica diversa
<222> (224)..(224)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 15 <221> característica diversa
<222> (232)..(237)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 20 <222> (239)..(239)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> VARIANTE
<222> (240)..(240)
- 25 <223> Xaa es valina o prolina
<220>
<221> característica diversa
<222> (242)..(243)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 30 <220>
<221> característica diversa
<222> (245)..(248)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 35 <221> característica diversa
<222> (250) .. (250)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

- <220>
<221> característica diversa
<222> (255)..(256)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 5 <220>
<221> característica diversa
<222> (258)..(260)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 10 <220>
<221> característica diversa
<222> (262)..(262)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (263)..(265)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
- 20 <220>
<221> característica diversa
<222> (266)..(268)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (269)..(269)
<223> Xaa es lisina o glutamina
- 30 <220>
<221> característica diversa
<222> (270)..(274)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 35 <220>
<221> característica diversa
<222> (279)..(279)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> característica diversa
<222> (281)..(286)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>

- <221> VARIANTE
<222> (287)..(287)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
<220>
- 5 <221> característica diversa
<222> (288)..(288)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
- 10 <222> (290)..(291)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (293)..(293)
- 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> VARIANTE
<222> (297)..(297)
<223> Xaa es glutamato o aspartato
- 20 <220>
- <221> característica diversa
<222> (302)..(302)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 25 <221> VARIANTE
<222> (305)..(305)
<223> Xaa es leucina o isoleucina
<220>
- <221> característica diversa
- 30 <222> (306)..(306)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (308)..(311)
- 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa

- <222> (316)..(316)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 5 <222> (319)..(321)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 10 <222> (323)..(325)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- <222> (327)..(331)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (334)..(334)
<223> Xaa es fenilalanina o tirosina
<220>
- 20 <221> característica diversa
<222> (336)..(336)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 25 <222> (349)..(350)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- <222> (352)..(353)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 30 <220>
<221> característica diversa
<222> (356)..(356)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 35 <220>
<221> característica diversa
<222> (358)..(359)

- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> VARIANTE
<222> (360)..(360)
- 5 <223> Xaa es glutamato o metionina
<220>
<221> VARIANTE
<222> (361)..(361)
- <223> Xaa es metionina o fenilalanina
- 10 <220>
<221> característica diversa
<222> (363)..(363)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 15 <221> característica diversa
<222> (366)..(367)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 20 <222> (370)..(371)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (374)..(375)
- 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (379)..(379)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (380)..(380)
- <223> Xaa es valina, isoleucina o leucina
<220>
- 35 <221> característica diversa
<222> (390)..(390)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

- <220>
<221> VARIANTE
<222> (395)..(395)
<223> Xaa es treonina o prolina
- 5 <220>
<221> característica diversa
<222> (396)..(396)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- 10 <221> característica diversa
<222> (399)..(399)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- <221> característica diversa
- 15 <222> (407)..(410)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- <221> VARIANTE
<222> (411)..(411)
- 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
- <220>
- <221> característica diversa
<222> (413)..(413)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 25 <220>
<221> característica diversa
<222> (415)..(415)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- 30 <221> VARIANTE
<222> (416)..(416)
<223> Xaa es fenilalanina o tirosina
- <220>
- <221> característica diversa
- 35 <222> (418)..(419)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>

- <221> característica diversa
 <222> (428)..(428)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
- 5 <221> VARIANTE
 <222> (429)..(429)
 <223> Xaa es valina, leucina o fenilalanina
 <220>
- 10 <221> VARIANTE
 <222> (430)..(430)
 <223> Xaa es valina, lisina o asparagina
 <220>
- <221> característica diversa
 <222> (431)..(431)
- 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
- <221> característica diversa
 <222> (433)..(433)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
 <222> (435)..(435)
 <223> Xaa es glutamato o prolina
 <220>
- 25 <221> característica diversa
 <222> (436)..(436)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
- <221> característica diversa
- 30 <222> (438)..(441)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
- <221> VARIANTE
 <222> (442)..(442)
- 35 <223> Xaa es tirosina o serina
 <220>
- <221> característica diversa

<222> (443)..(446)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

5

<222> (448)..(449)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (451)..(451)

10

<223> Xaa es serina o alanina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (456)..(456)

<223> Xaa es arginina, aspartato o serina

15

<220>

<221> VARIANTE

<222> (456)..(456)

<223> Xaa es arginina, aspartato o serina

<220>

20

<221> característica diversa

<222> (457)..(457)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> VARIANTE

25

<222> (461)..(461)

<223> Xaa es glicina o alanina

<220>

<221> característica diversa

<222> (469)..(470)

30

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (473)..(473)

<223> Xaa es metionina o glutamina

35

<220>

<221> característica diversa

<222> (477)..(477)

- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (481)..(481)
- 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> VARIANTE
<222> (484)..(484)
<223> Xaa es asparagina, treonina o serina
- 10 <220>
<221> característica diversa
<222> (485)..(487)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 15 <221> característica diversa
<222> (492)..(492)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 20 <222> (494)..(494)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> VARIANTE
<222> (496)..(496)
- 25 <223> Xaa es isoleucina o leucina
<220>
<221> VARIANTE
<222> (497)..(497)
<223> Xaa es glicina o glutamato
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (498)..(501)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
<220>
- 35 <221> característica diversa
<222> (502)..(507)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> característica diversa
 <222> (509)..(516)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (517)..(520)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
 <220>
 10 <221> característica diversa
 <222> (521)..(524)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> característica diversa
 15 <222> (526)..(532)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (534)..(534)
 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (535)..(540)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural o puede estar ausente
 25 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (541)..(541)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 18

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Pro Xaa
 30

ES 2 380 546 T3

Leu Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa
 500 505 510

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 515 520 525

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 530 535 540

<210> 19

<211> 524

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> TNALP de consenso procedente de diversas especies de mamíferos (con péptido señal y dominio de anclaje de GPI)

<220>

10 <221> característica diversa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

15 <222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (14)..(16)

20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (18)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25 <220>

<221> característica diversa

<222> (24)..(24)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

- <221> característica diversa
<222> (27)..(27)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 5 <221> característica diversa
<222> (31)..(31)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 10 <221> característica diversa
<222> (35)..(35)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (39)..(39)
- 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (42)..(42)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 20 <220>
- <221> característica diversa
<222> (45)..(45)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 25 <221> característica diversa
<222> (54)..(54)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
- 30 <222> (70)..(70)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (80)..(81)
- 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa

- <222> (86)..(86)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> característica diversa
- 5 <222> (94)..(94)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> característica diversa
- 10 <222> (135)..(135)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> característica diversa
- <222> (137)..(138)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>
 <221> característica diversa
- <222> (157)..(157)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
- 20 <221> VARIANTE
 <222> (177)..(177)
 <223> Xaa puede ser serina o alanina
 <220>
 <221> característica diversa
- 25 <222> (210)..(210)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> VARIANTE
- <222> (212)..(212)
- 30 <223> Xaa puede ser isoleucina o valina
 <220>
 <221> característica diversa
- <222> (213)..(213)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 35 <220>
 <221> característica diversa
- <222> (216)..(216)

- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (227)..(227)
- 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (231)..(231)
- 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (238)..(238)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 15 <221> característica diversa
<222> (242)..(243)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
- 20 <222> (245)..(245)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (251)..(251)
- 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> característica diversa
<222> (253)..(255)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 30 <221> característica diversa
<222> (258)..(258)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 35 <221> característica diversa
<222> (262)..(263)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

- <220>
<221> característica diversa
<222> (268)..(269)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 5 <220>
<221> característica diversa
<222> (274)..(274)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 10 <220>
<221> característica diversa
<222> (277)..(277)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> característica diversa
- 15 <222> (281)..(282)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> VARIANTE
<222> (291)..(291)
- 20 <223> Xaa puede ser glutamato o aspartato
- <220>
<221> característica diversa
<222> (303)..(304)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 25 <220>
<221> característica diversa
<222> (314)..(315)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- 30 <221> característica diversa
<222> (317)..(318)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
<221> característica diversa
- 35 <222> (321)..(321)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>

- <221> característica diversa
<222> (323)..(325)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 5 <221> característica diversa
<222> (357)..(357)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 10 <221> característica diversa
<222> (361)..(361)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (364)..(365)
- 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (368)..(369)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
<222> (374)..(374)
<223> Xaa puede ser valina o isoleucina
<220>
- 25 <221> característica diversa
<222> (402)..(402)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
- 30 <222> (412)..(412)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa
<222> (425)..(425)
- 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- <221> característica diversa

- <222> (463)..(463)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> característica diversa
- 5 <222> (475)..(475)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> característica diversa
- 10 <222> (480)..(480)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> característica diversa
- <222> (488)..(488)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>
 <221> característica diversa
- <222> (494)..(495)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
- 20 <221> característica diversa
- <222> (499)..(499)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
- <221> característica diversa
- 25 <222> (501)..(501)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
- <221> característica diversa
- <222> (503)..(508)
- 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
- <221> característica diversa
- <222> (510)..(510)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 35 <220>
- <221> característica diversa
- <222> (512)..(512)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (514)..(514)

5

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (517)..(522)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10

<400> 19

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

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

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

Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 546 T3

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

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

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

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

Leu Xaa Leu Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Phe
515 520

REIVINDICACIONES

1. Una fosfatasa alcalina dirigida al hueso, que comprende un polipéptido que tiene la estructura:



en la que sALP consiste en los restos de aminoácidos 18-502 de SEC ID NO: 8;

5 en la que V está ausente, o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido;

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;

10 W_n es un poliaspartato o un poliglutamato, en el que $n = 10$ a 16 ; y el espaciador comprende una región de fragmento cristalizable (Fc).

2. La fosfatasa alcalina de la reivindicación 1, en la que el Fc comprende un dominio CH2, un dominio CH3 y una región de bisagra, o en la que el Fc es un dominio constante de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste en IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-3 e IgG-4, preferiblemente en la que el Fc es un dominio constante de una inmunoglobulina IgG-1.

15 3. La fosfatasa alcalina de la reivindicación 2, en la que el Fc es un dominio constante de IgG-1 humana.

4. La fosfatasa alcalina de la reivindicación 3, en la que el Fc es como se expone en SEC ID NO: 3.

5. La fosfatasa alcalina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que W_n es un poliaspartato, preferiblemente en el que $n = 10$.

20 6. La fosfatasa alcalina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que Z está ausente, y/o en la que V está ausente.

7. La fosfatasa alcalina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que

a) Y es un resto de dos aminoácidos, preferiblemente en la que Y es leucina-lisina; y/o

b) X es un resto de dos aminoácidos, preferiblemente en la que X es aspartato-isoleucina.

8. La fosfatasa alcalina de la reivindicación 1, en la que el polipéptido es como se expone en SEC ID NO: 4.

25 9. La fosfatasa alcalina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende el polipéptido en una forma que comprende un dímero.

10. La fosfatasa alcalina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicha fosfatasa alcalina consiste en dicho polipéptido.

30 11. La fosfatasa alcalina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la fosfatasa alcalina está en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable es una disolución salina, más preferiblemente en la que la fosfatasa alcalina está en una forma liofilizada.

12. La fosfatasa alcalina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para uso como un medicamento.

13. La fosfatasa alcalina de la reivindicación 12, en una dosificación diaria de alrededor de 0,2 a alrededor de 20 mg/kg, o una dosificación semanal de alrededor de 1,4 a alrededor de 140 mg/kg.

35 14. Un ácido nucleico aislado que comprende o consiste en una secuencia que codifica el polipéptido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

15. Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 14.

16. Un vector vírico adenoasociado recombinante que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 14.

40 17. Una célula hospedante recombinante aislada, transformada o transfectada con el vector de la reivindicación 15 ó 16.

18. Un método para producir la fosfatasa alcalina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende cultivar la célula hospedante de la reivindicación 17 en condiciones adecuadas para efectuar la expresión de la fosfatasa alcalina, y recuperar la fosfatasa alcalina del medio de cultivo.

19. El método de la reivindicación 18, en el que la célula hospedante es una célula L, célula C127, célula 3T3, célula CHO, célula BHK, célula COS-7 o una célula de ovario de hámster chino (CHO), preferiblemente en el que la célula hospedante es una célula de ovario de hámster chino (CHO), más preferiblemente en el que la célula hospedante es una célula CHO-DG44.

5 20. Un kit que comprende la fosfatasa alcalina como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, e instrucciones para uso en un método para corregir o evitar un fenotipo de hipofosfatasa (HPP).

21. Una fosfatasa alcalina como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para uso en un método para corregir o evitar al menos un fenotipo de hipofosfatasa (HPP) en un sujeto que lo necesite.

22. La fosfatasa alcalina de la reivindicación 21, en la que

10 a) el sujeto tiene al menos un fenotipo de HPP, preferiblemente en la que

i) el al menos un fenotipo de HPP comprende ataque relacionado con HPP, o

ii) el al menos un fenotipo de HPP comprende pérdida prematura de dientes de leche, o

15 iii) el al menos un fenotipo de HPP comprende mineralización ósea incompleta, preferiblemente en el que la mineralización ósea incompleta es mineralización ósea femoral incompleta o mineralización ósea tibial incompleta, o mineralización ósea metatarsiana incompleta, o mineralización ósea incompleta de las costillas, o

iv) el al menos un fenotipo de HPP comprende niveles elevados sanguíneos y/o de orina de pirofosfato inorgánico (PPi), o

20 v) el al menos un fenotipo de HPP comprende niveles elevados sanguíneos y/o de orina de fosfoetanolamina (PEA), o

vi) el al menos un fenotipo de HPP comprende niveles elevados sanguíneos y/o de orina de 5'-fosfato de piridoxal (PLP), o

vii) el al menos un fenotipo de HPP comprende ganancia de peso inadecuada; o

viii) el al menos un fenotipo de HPP comprende raquitismo, o

25 ix) el al menos un fenotipo de HPP comprende dolor óseo, o

x) el al menos un fenotipo de HPP comprende deposición de cristales de pirofosfato de calcio dihidratado; o

xi) el al menos un fenotipo de HPP comprende aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental.

23. La fosfatasa alcalina de la reivindicación 21 ó 22, en la que el sujeto que la necesita tiene

30 a) HPP de lactante; o

b) HPP de la niñez; o

c) HPP perinatal; o

d) HPP de adulto; o

e) HPP de odontohipofosfatasa.

35 24. La fosfatasa alcalina de cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en la que el uso comprende transfectar una célula en el sujeto con un ácido nucleico que codifica la fosfatasa alcalina, en particular en la que la transfección de la célula se lleva a cabo *in vitro* de manera que la fosfatasa alcalina es expresada y segregada en una forma activa, y es administrada al sujeto con dicha célula.

40 25. La fosfatasa alcalina de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en la que el uso comprende la administración subcutánea de la fosfatasa alcalina al sujeto.

26. La fosfatasa alcalina de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en la que el uso comprende la administración intravenosa de la fosfatasa alcalina al sujeto.

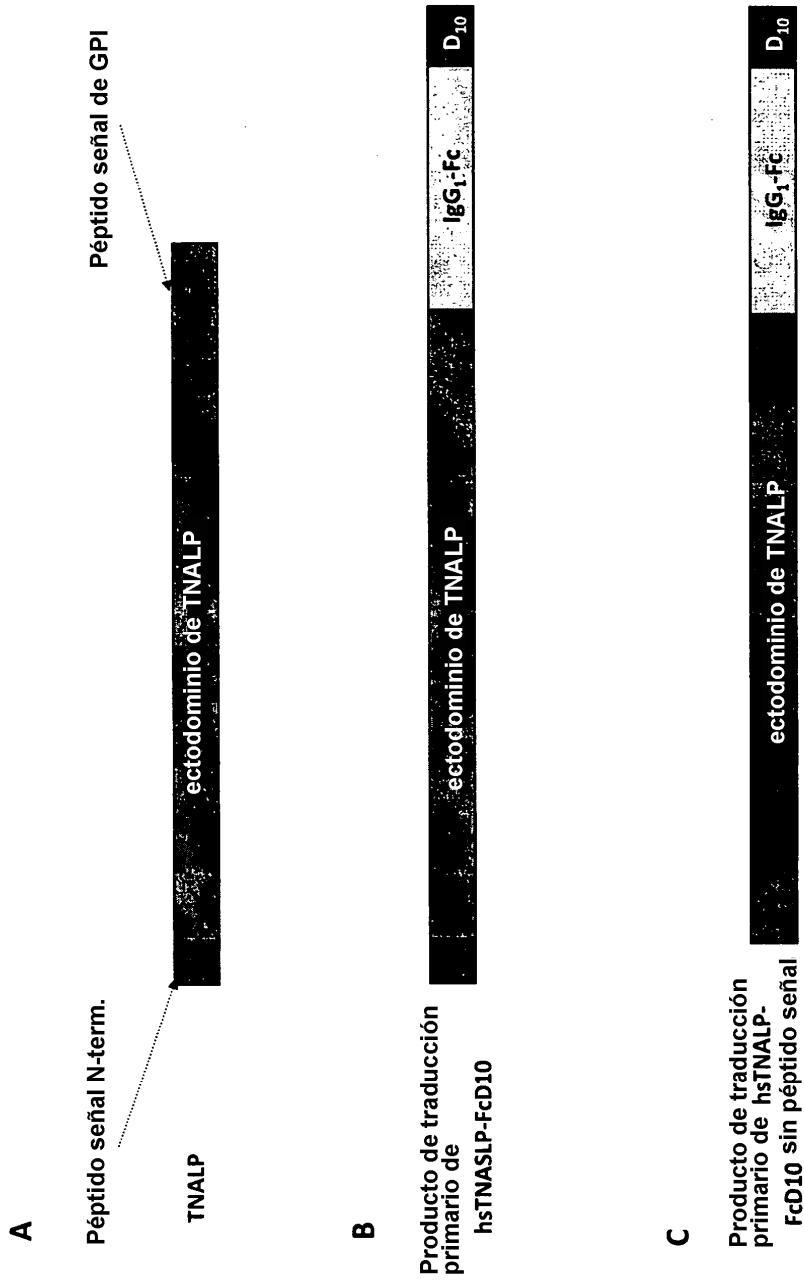


Figura 1

ES 2 380 546 T3

Secuencia proteica para sTNALP-FcD₁₀ con la señal peptídica

MISPFLVLAIGTCLTNSLVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTV
TAARILKGQLHHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAAT
ERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC
KDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKMYPKNKTDVEYESDEKARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYKHSHF
IWNRTELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRNNVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGR
IDHGHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSSEDTLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPML
SDTDKKPFTAILYGNPGYKVVGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMAH
LLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSLKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGKID
DDDDDD

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MIS	PFLVLA	IGTCLTNSL	VPEKEKDPKYWR	DQAQETLKYA	LELQKLNTNV
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
GMGVSTV	TAA	RILKGQLHHN	PGEETRLEMD	KFPFVALSKT	YNTNAQVPDS
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
VKANEGTVGV	SAATERSRCN	TTQGNEVTSI	LRWAKDAGKS	VGIVTTTRVN	HATPSAAYAH
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
SADRDWYSDN	EMPPEALSQGC	KDIAYQLMH	NIRDIDVIMG	GGRKMYMPKN	KTDVEYESDE
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
KARGTRLDGL	DLVDTWKSFK	PRYKHSHF	IWN	RTELLTLD	PHNV
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
RNNVT	DPSLS	EMVVVAIQIL	RKNPKGFFLL	VEGGRIDHGH	HEGKAKQALH
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
QAGSLTSS	EDTLTVVTADHS	HVFTFGGYTP	RGNSIFGLAP	MLS	SDTDK
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	<u>480</u>
YKVVGGEREN	VSMVDYAHNN	YQAQSAVPLR	HETHGGEDVA	VFSKGPMAHL	LHGVHEQNYV
<u>490</u>	<u>500</u>	<u>510</u>	<u>520</u>	<u>530</u>	<u>540</u>
PHVMAYAACI	GANLGHCAPA	SSLKDKTHTC	PPCPAPELLG	GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT
<u>550</u>	<u>560</u>	<u>570</u>	<u>580</u>	<u>590</u>	<u>600</u>
PEVTCVVVDV	SHEDPEVKFN	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQY	NSTYRVVSVL	TVLHQDWLNG
<u>610</u>	<u>620</u>	<u>630</u>	<u>640</u>	<u>650</u>	<u>660</u>
KEYKCKVSNK	ALPAPIEKT	ISKAKGQPREP	QVYTLPPSRE	EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD
<u>670</u>	<u>680</u>	<u>690</u>	<u>700</u>	<u>710</u>	<u>720</u>
IAVEWESNGQ	PENNYK	TPPVLDSDGSFFL	YSKLTVDKSR	WQQGNVFSCS	VMHEALHNNHY
<u>730</u>	<u>740</u>				
TQKSLSLSPG	KDIDDDDDDD	DDD			

Figura 2

ES 2 380 546 T3

Secuencia proteica para sTNALP-FcD₁₀ sin la señal peptídica

LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTAARILKQGQLHHNP
 GEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAATERSRCNTTQGN
 EVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSADRWDYSDNEMPEALSQGCKDIAYQLM
 HNIIRDIDVIMGGGRKMYPKNKT DVEYESDEKARGTRL DGLDLVDTWKSFKPRYKHSFIWNRT
 ELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRNNTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGRID
 HGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSS EDTLT VVTADHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPM
 LSDTDKPKPFTAILYGNPGYKVVGGGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKG
 PMAHLLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSLKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGKIDDDDDDDDDDD

10	20	30	40	50	60
LVPEKEKDPK	YWRDQAQETL	KYALELQKLN	TNVAKNVIMF	LGDGMGVSTV	TAARILKQGL
70	80	90	100	110	120
HHNPGEETRL	EMDKFPFVAL	SKTYNTNAQV	PDSAGTATAY	LCGVKANEGT	VGVSAAATERS
130	140	150	160	170	180
RCNTTQGNEV	TSILRWAKDA	GKSVGIVTTT	RVNHATPSAA	YAHSADRWDY	SDNEMPEAL
190	200	210	220	230	240
SQGCKDIAYQ	LMHNIIRDIDV	IMGGGRKMY	PKNKT DVEYE	SDEKARGTRL	DGLDLVDTWK
250	260	270	280	290	300
SFKPRYKHS	FIWNRT ELLT	LDPHNVDYLL	GLFEPGDMQY	ELNRNNTDPS	SLSEMVVVAI
310	320	330	340	350	360
QILRKNPKGF	FLLVEGGRID	HGHHEGKAKQ	ALHEAVEMDR	AIGQAGSLTS	SEDTLT VVT A
370	380	390	400	410	420
DHSHVFTFGG	YTPRGNSIFG	LAPMLS DTDK	KPFTAILYGN	GPGYKVVGGE	RENVSMVDYA
430	440	450	460	470	480
HNNYQAQSAV	PLRHETHGGE	DVAVFSKGP	AHLLHGVHEQ	NYVPHVMAYA	ACIGANLGH
490	500	510	520	530	540
APASSLKDKT	HTCPPCPAPE	LLGGPSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV
550	560	570	580	590	600
KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE
610	620	630	640	650	660
KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	SREEMTKNQV	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT
670	680	690	700	710	720
TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD	KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL	SPGKIDDDDD

DDDDDD

Figura 3

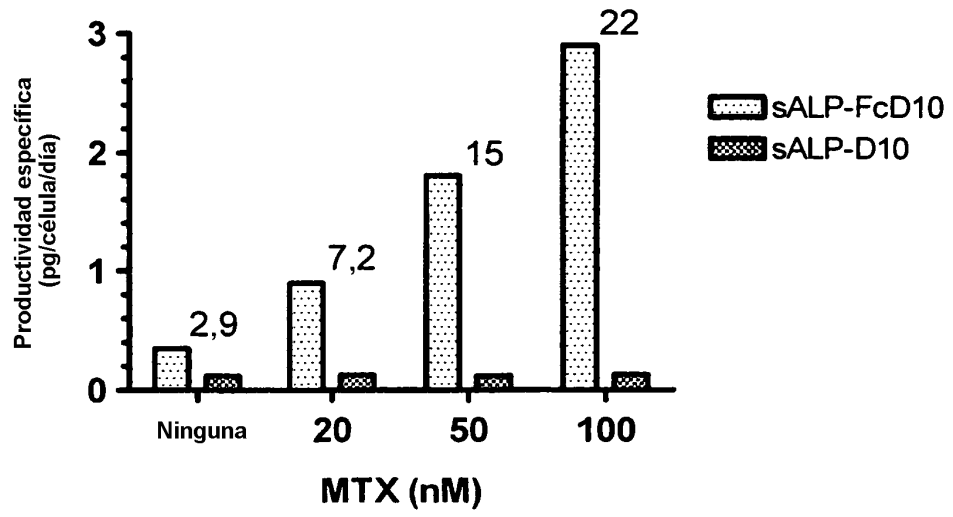


Figura 4

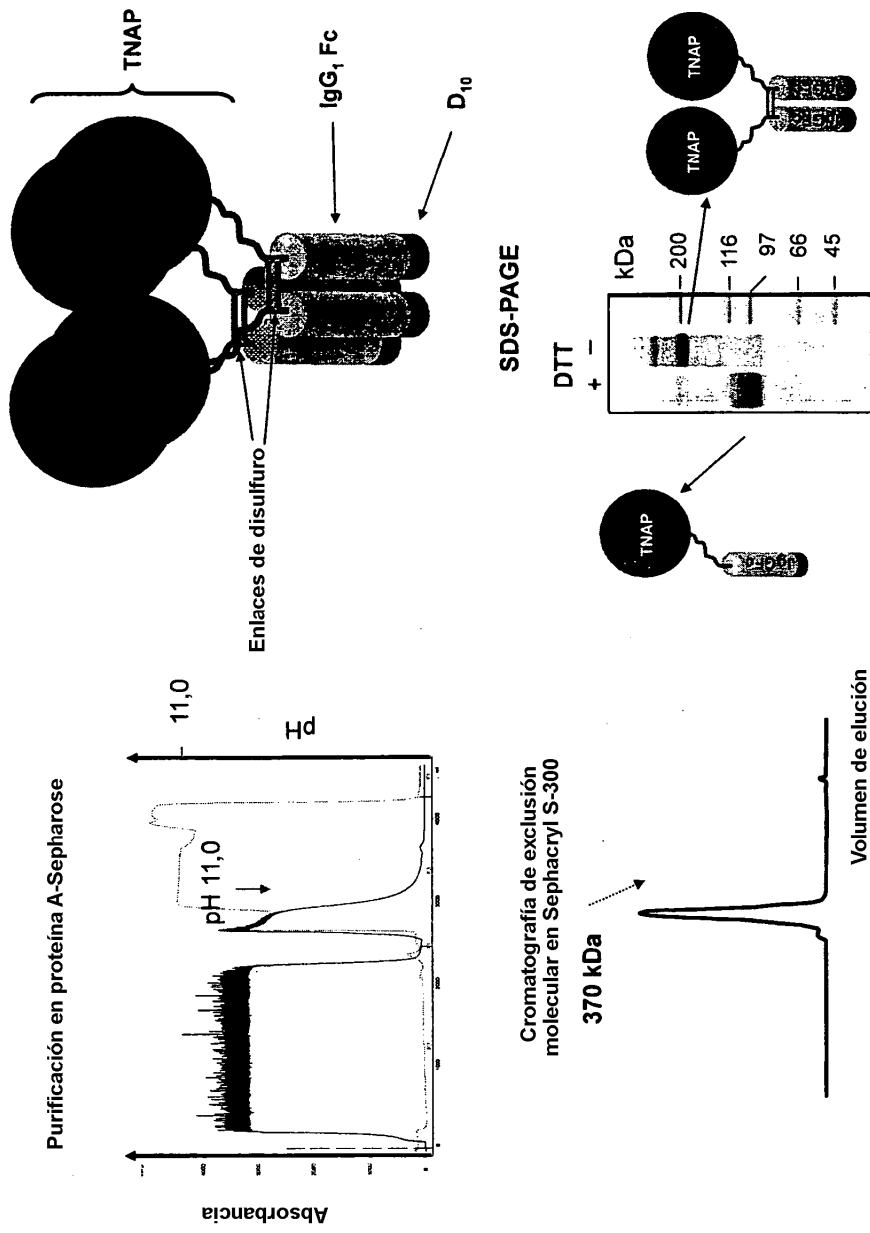


Figura 5

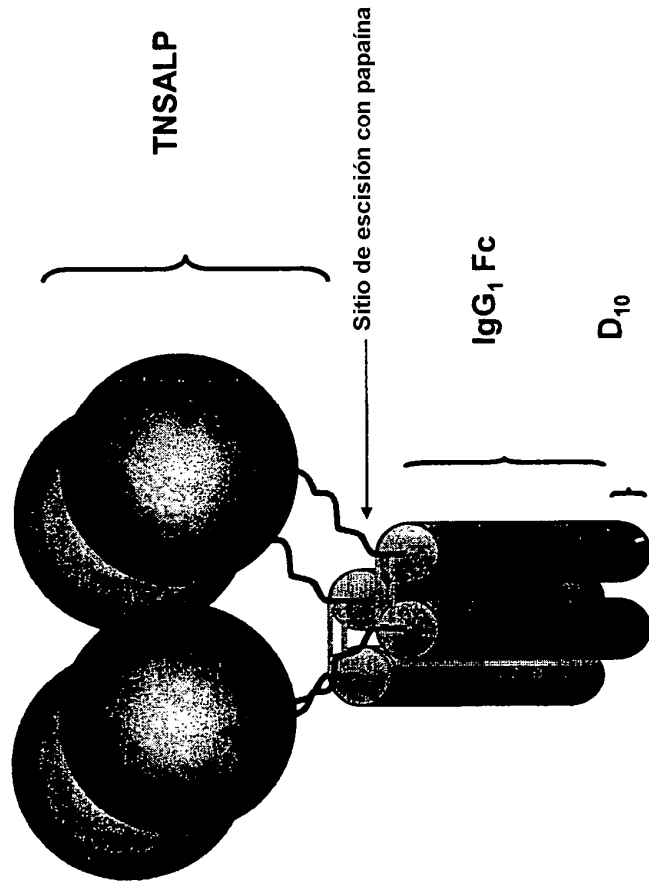


Figura 6

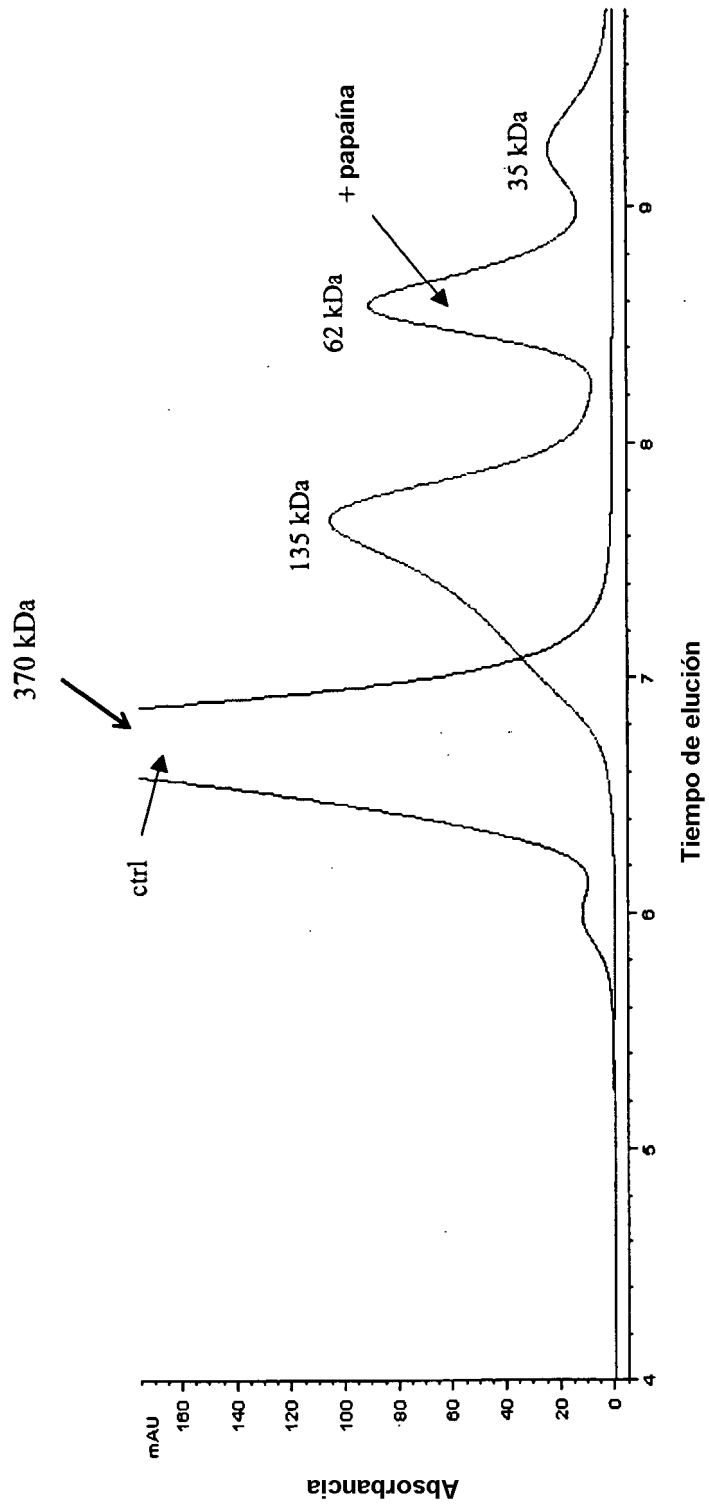


Figura 7

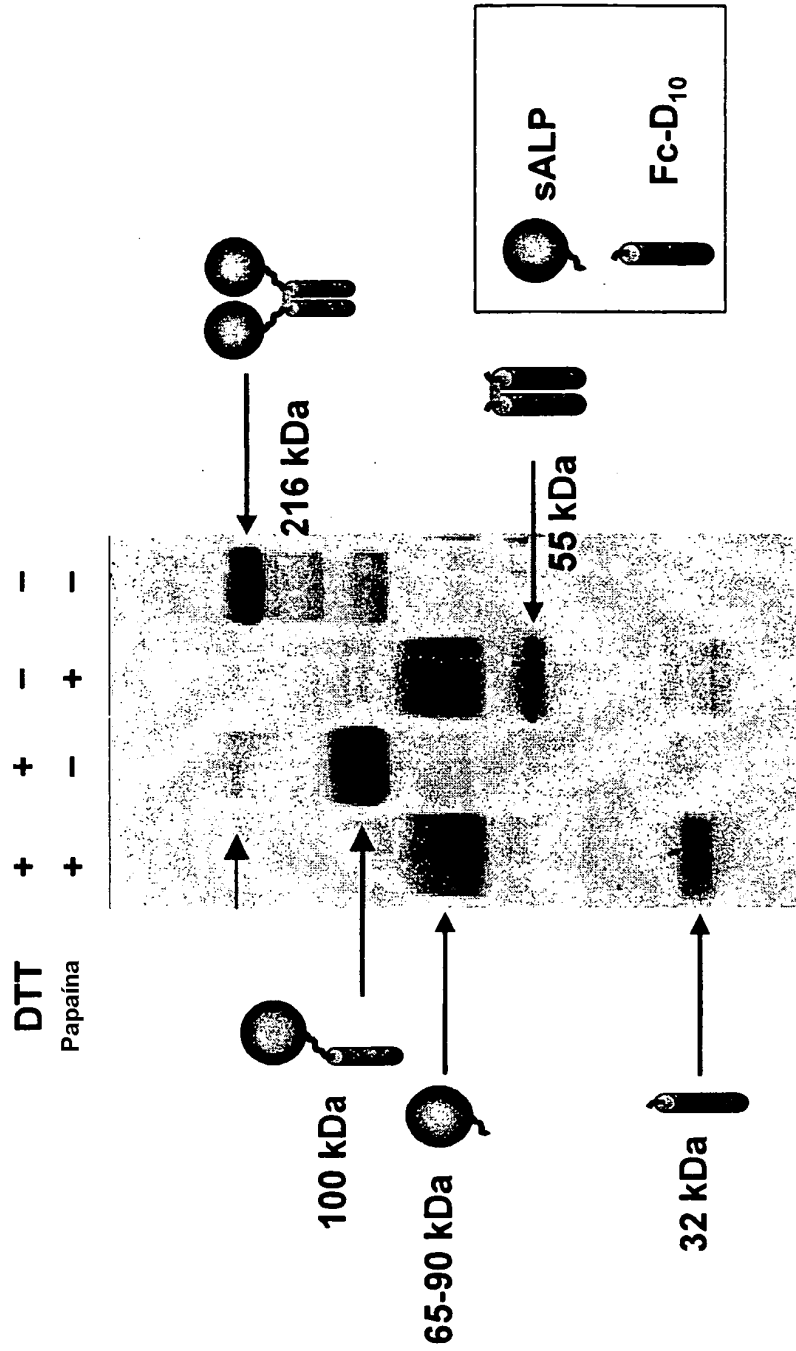


Figura 8

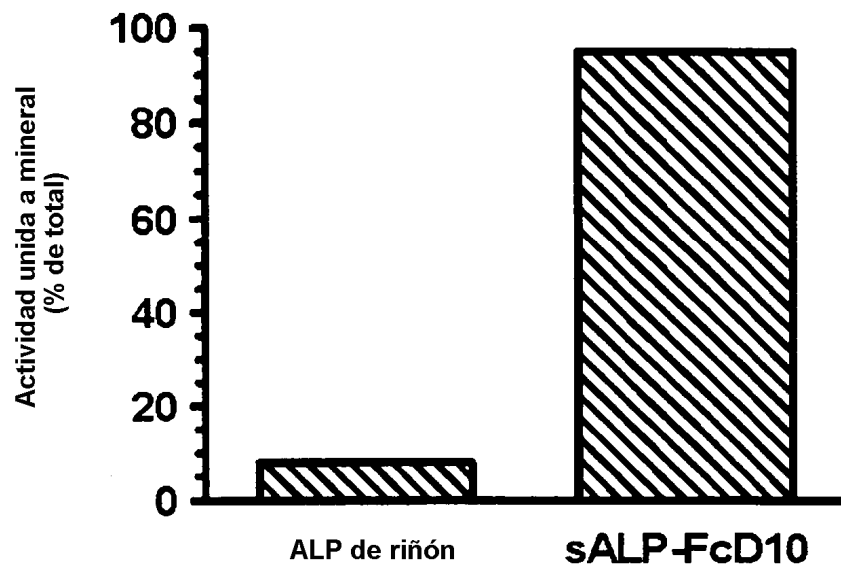


Figura 9

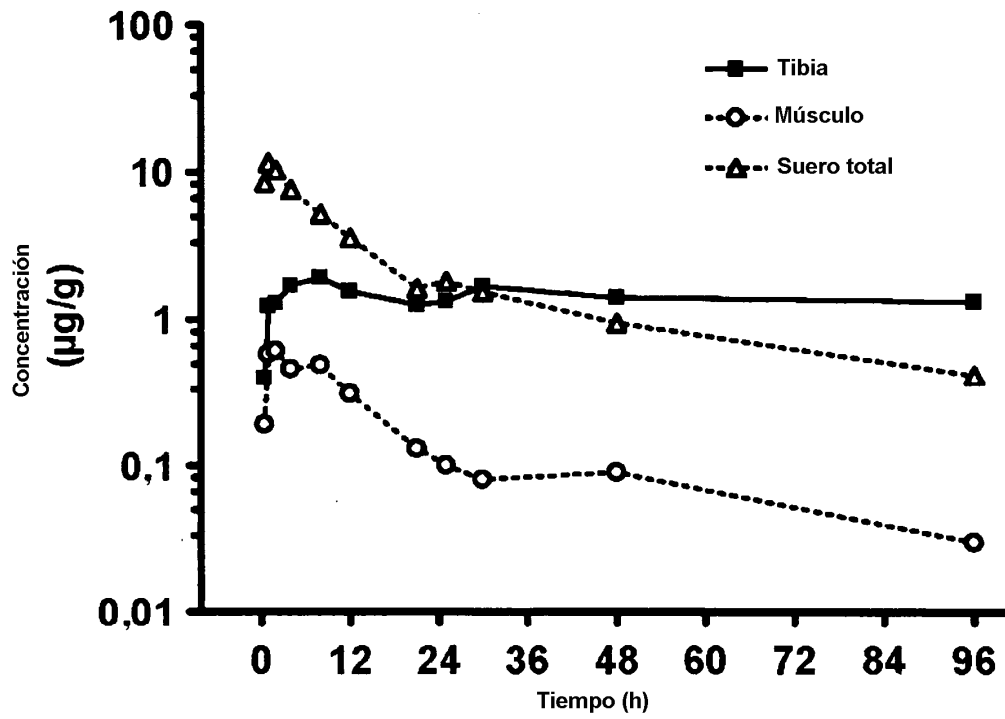


Figura 10

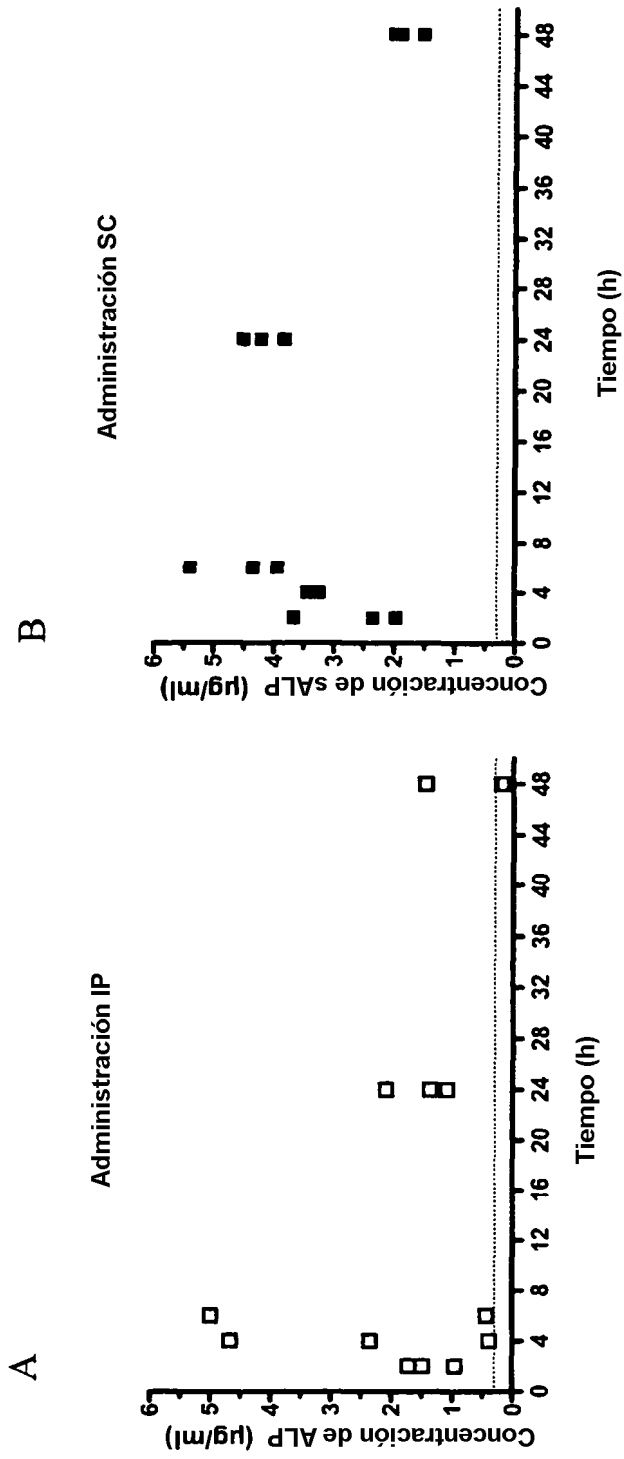


Figura 11

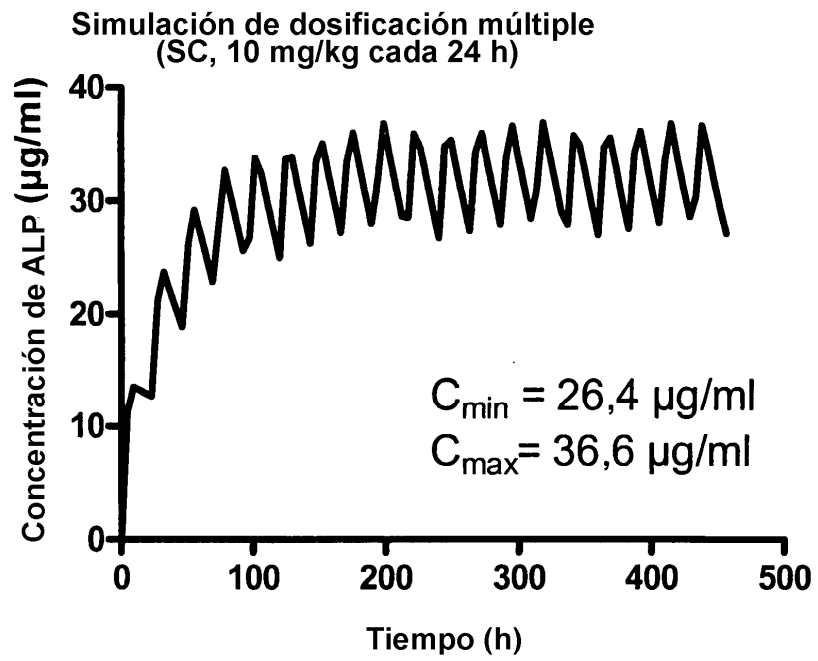


Figura 12

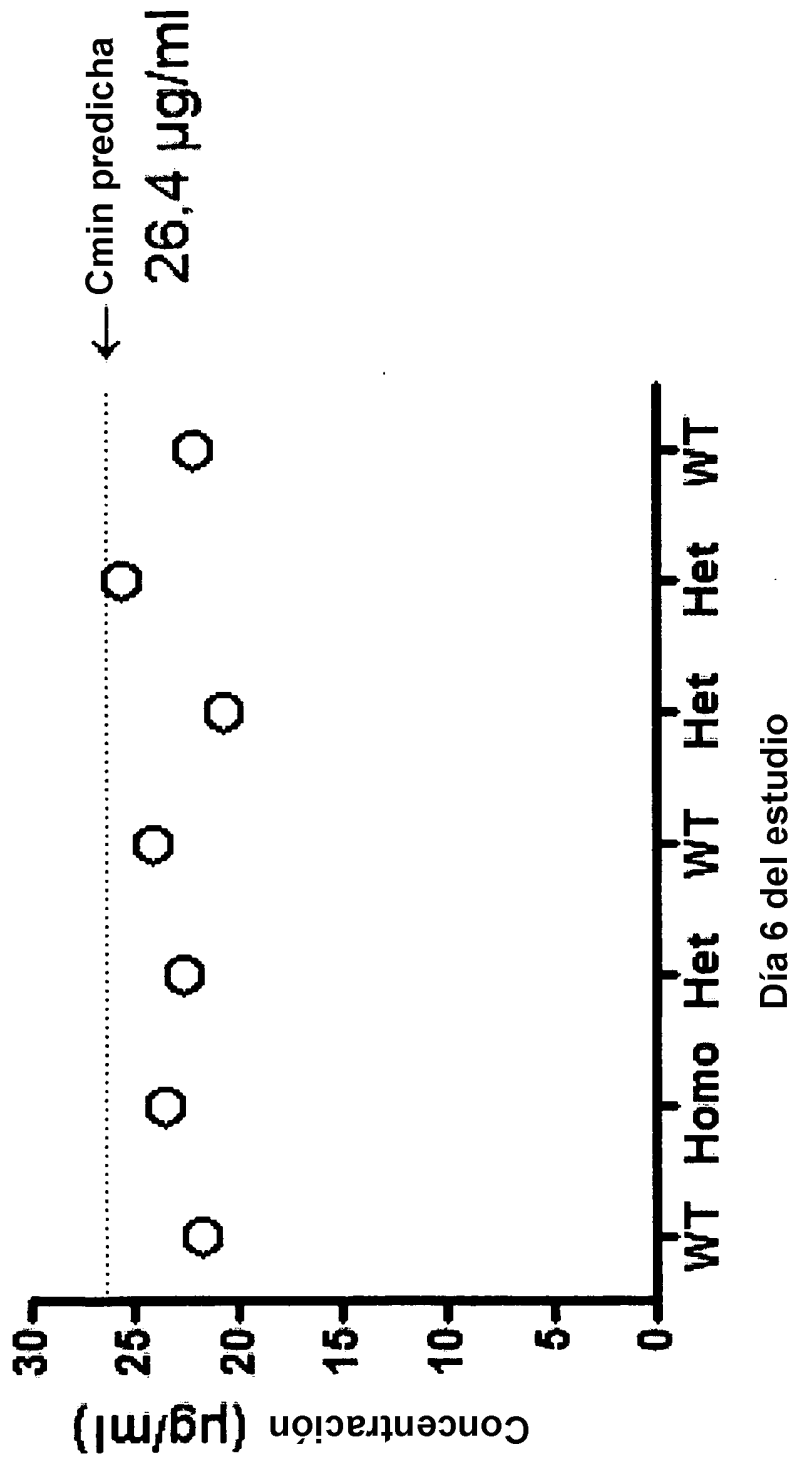


Figura 13

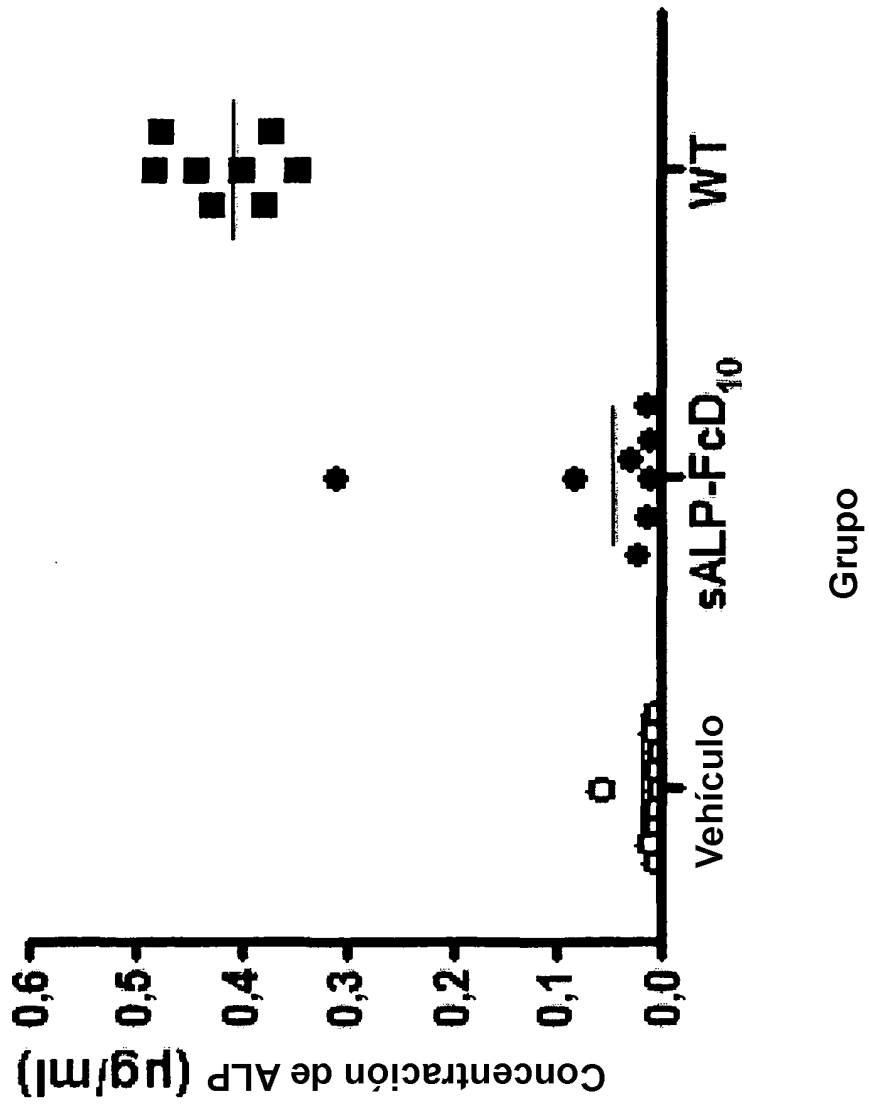


Figura 14

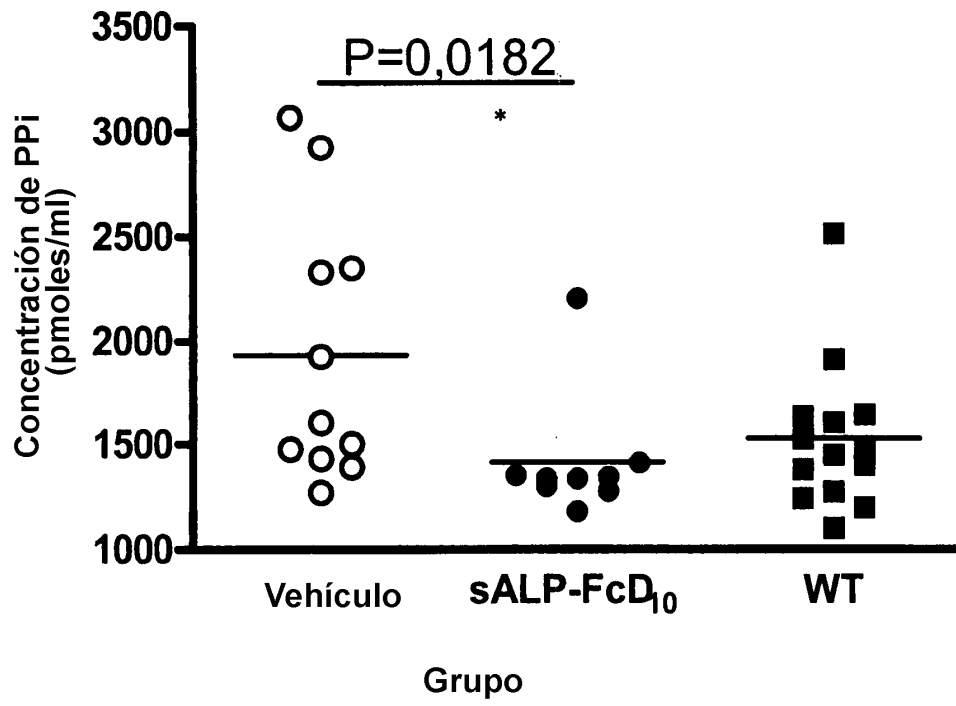
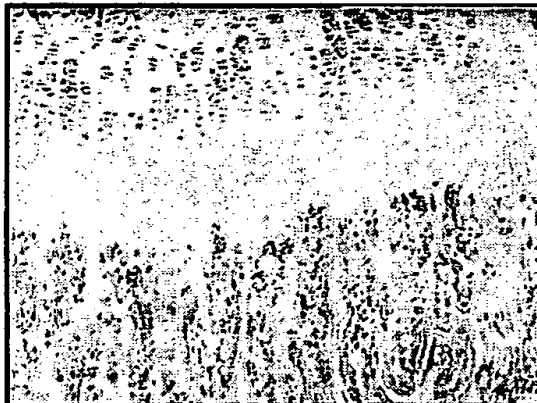


Figura 15

Vehículo



sALP-FcD₁₀



WT



Figura 16

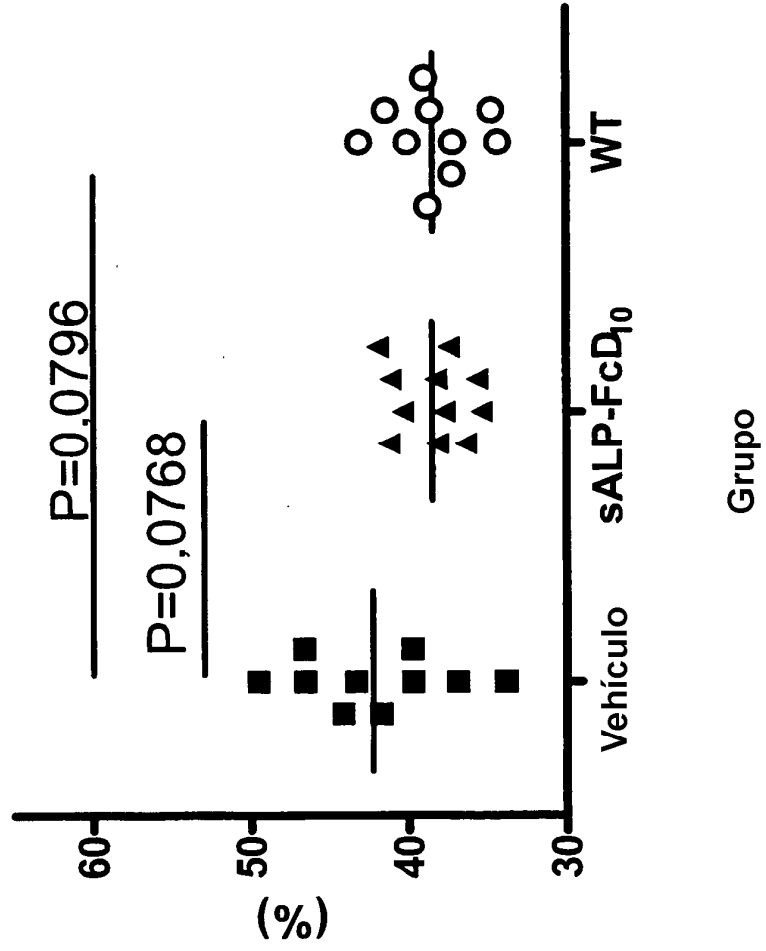


Figura 17

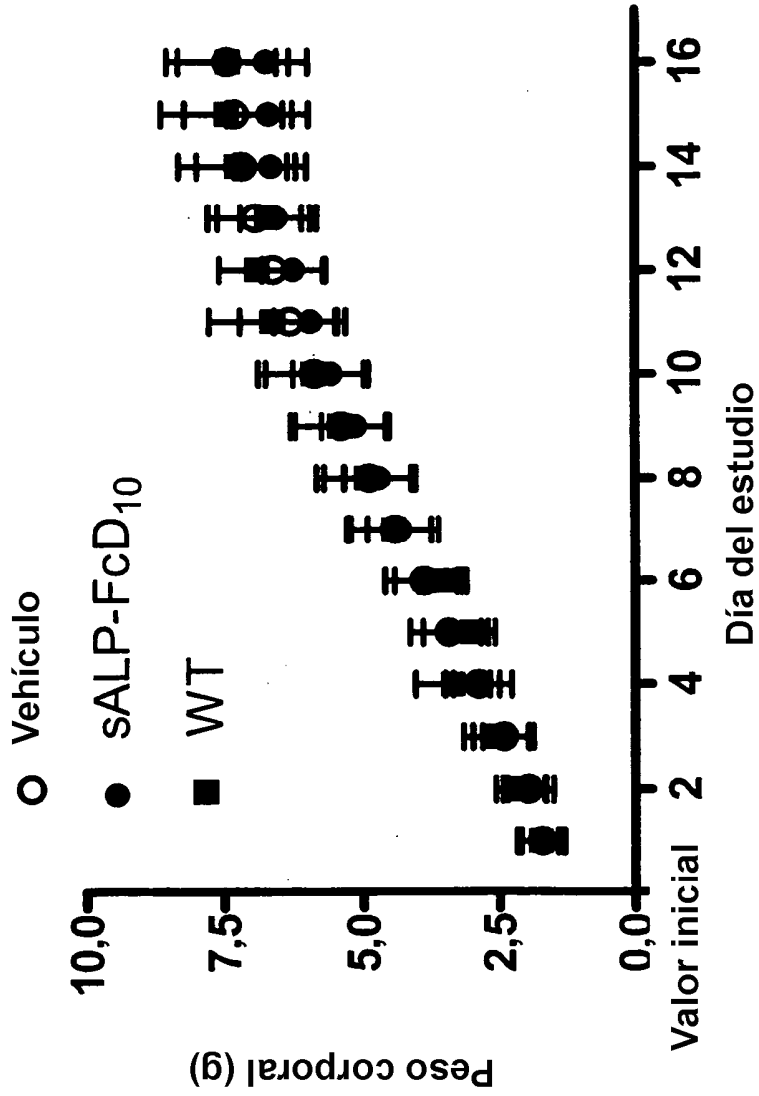


Figura 18

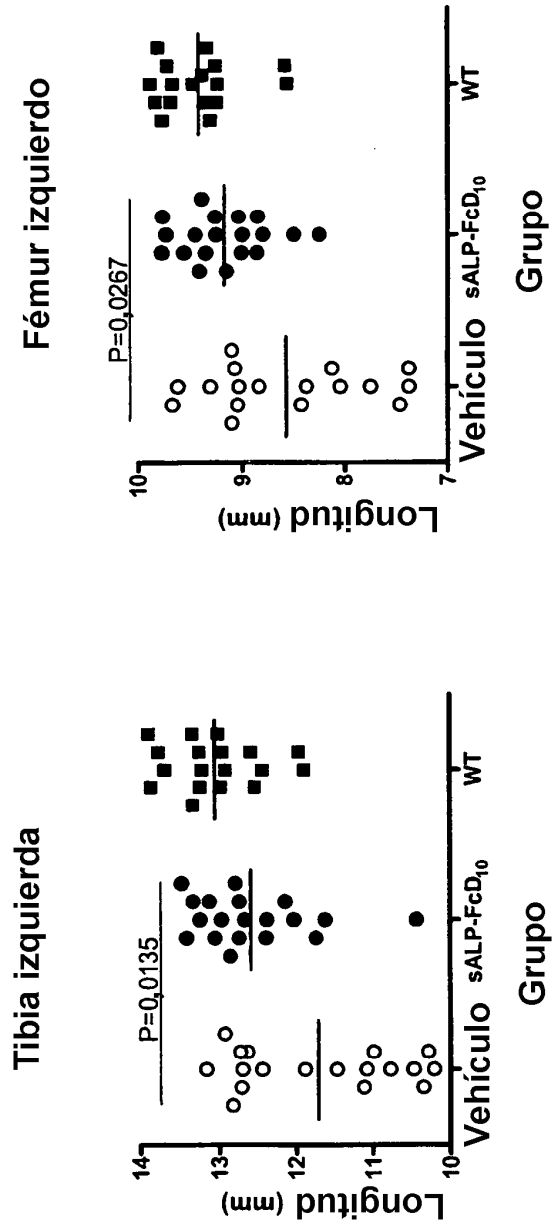


Figura 19

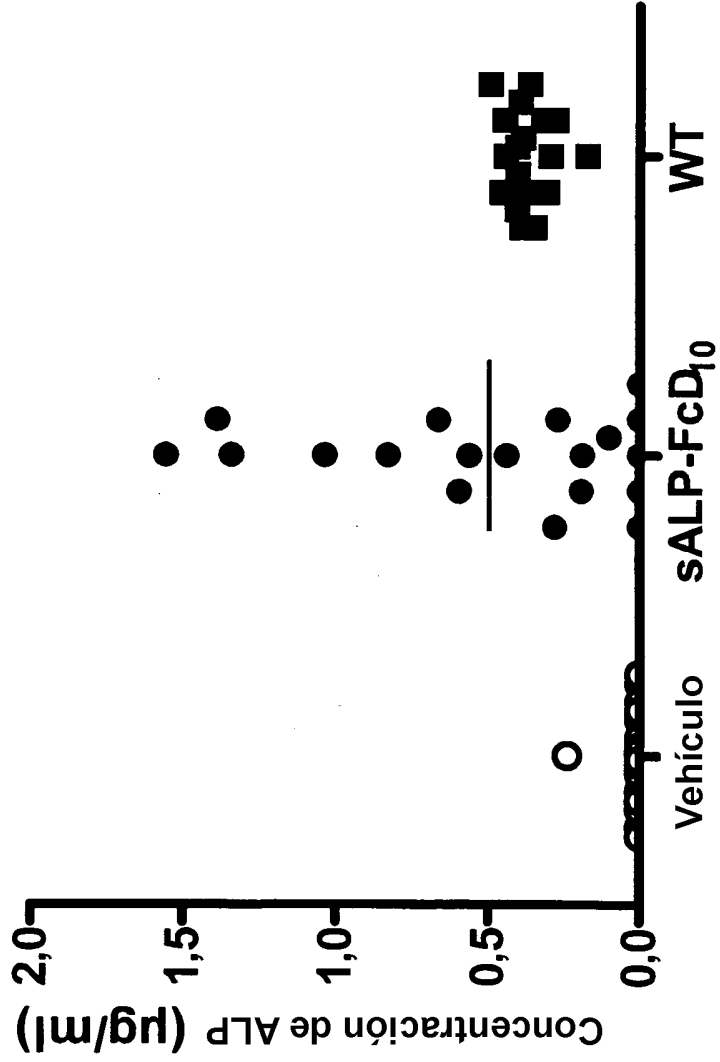


Figura 20

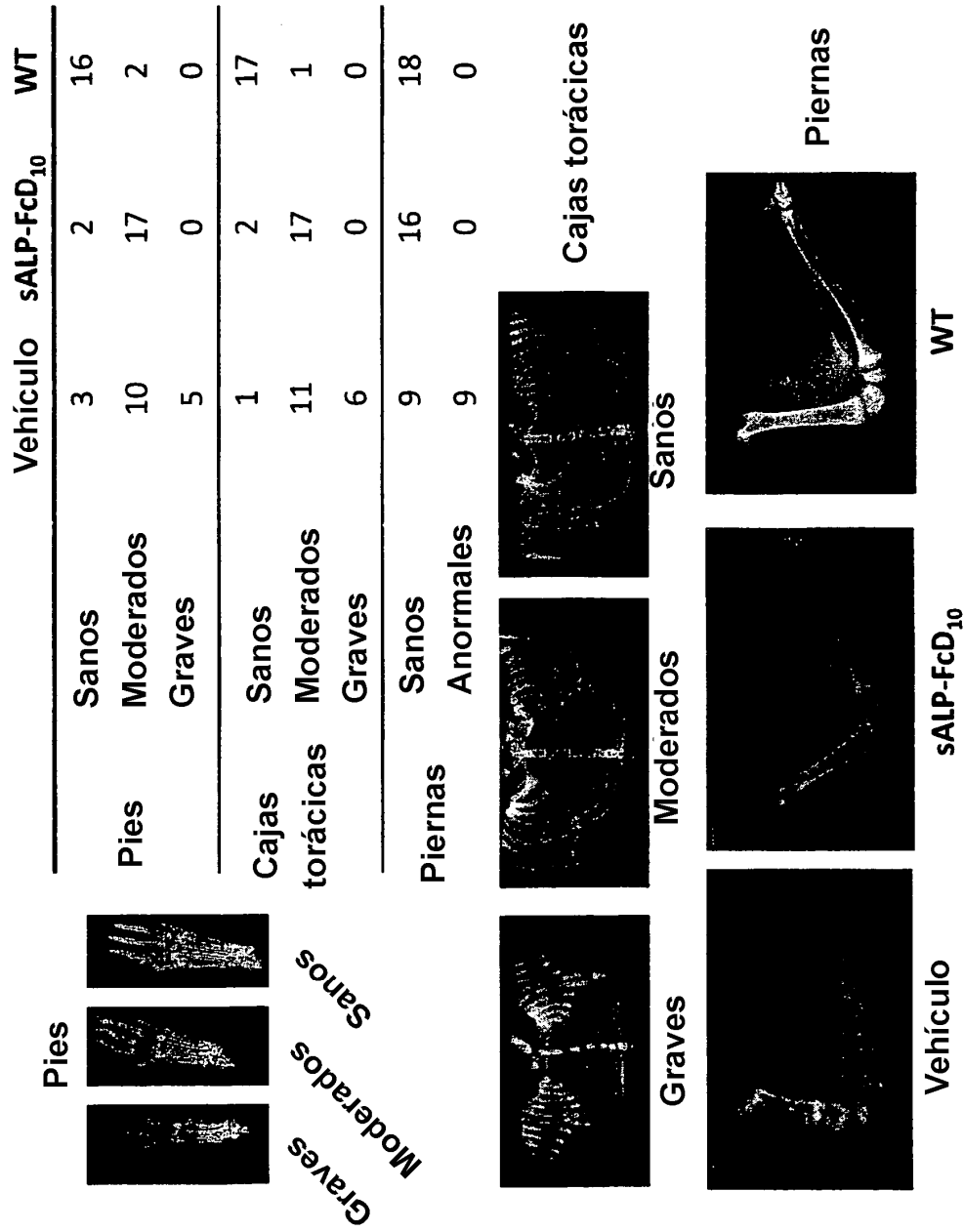


Figura 21

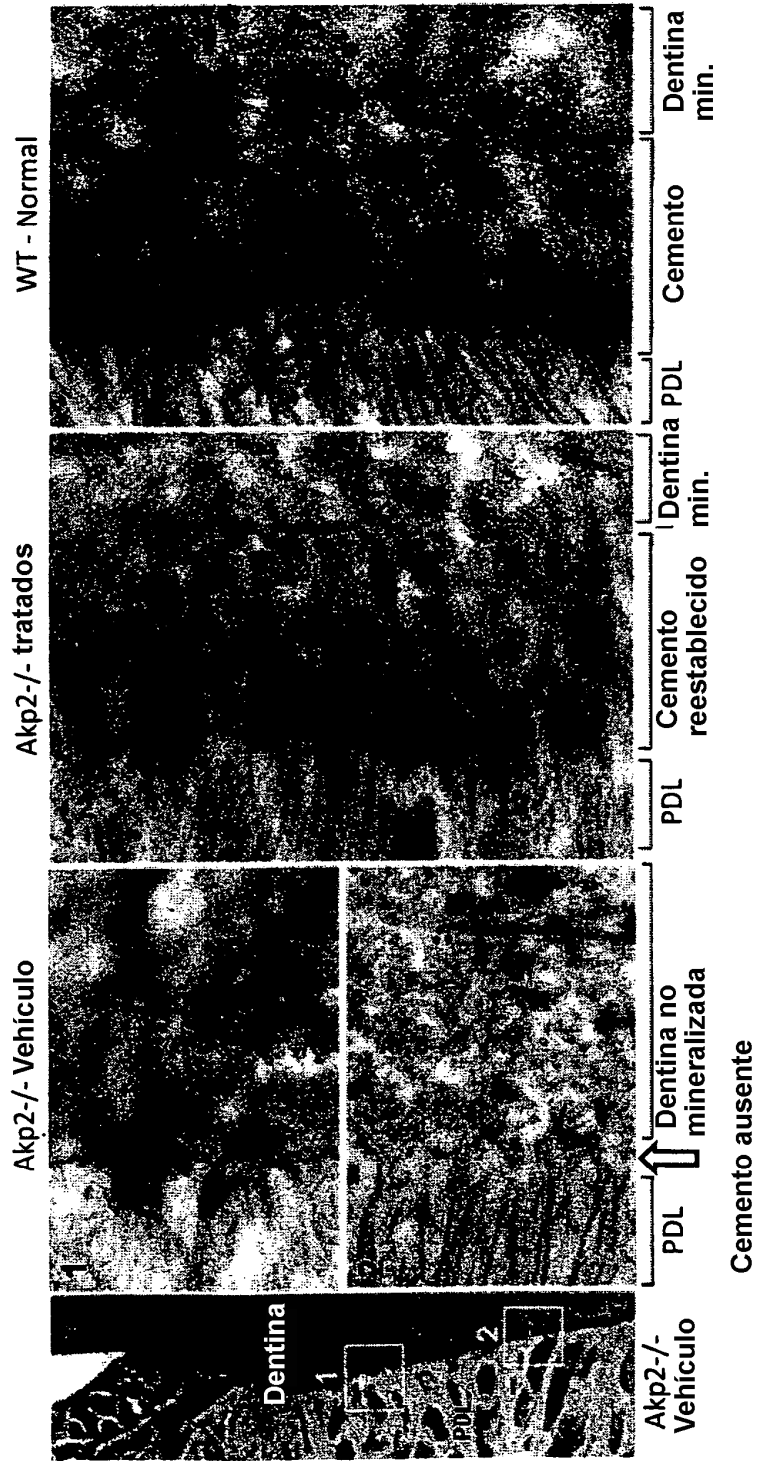


Figura 22

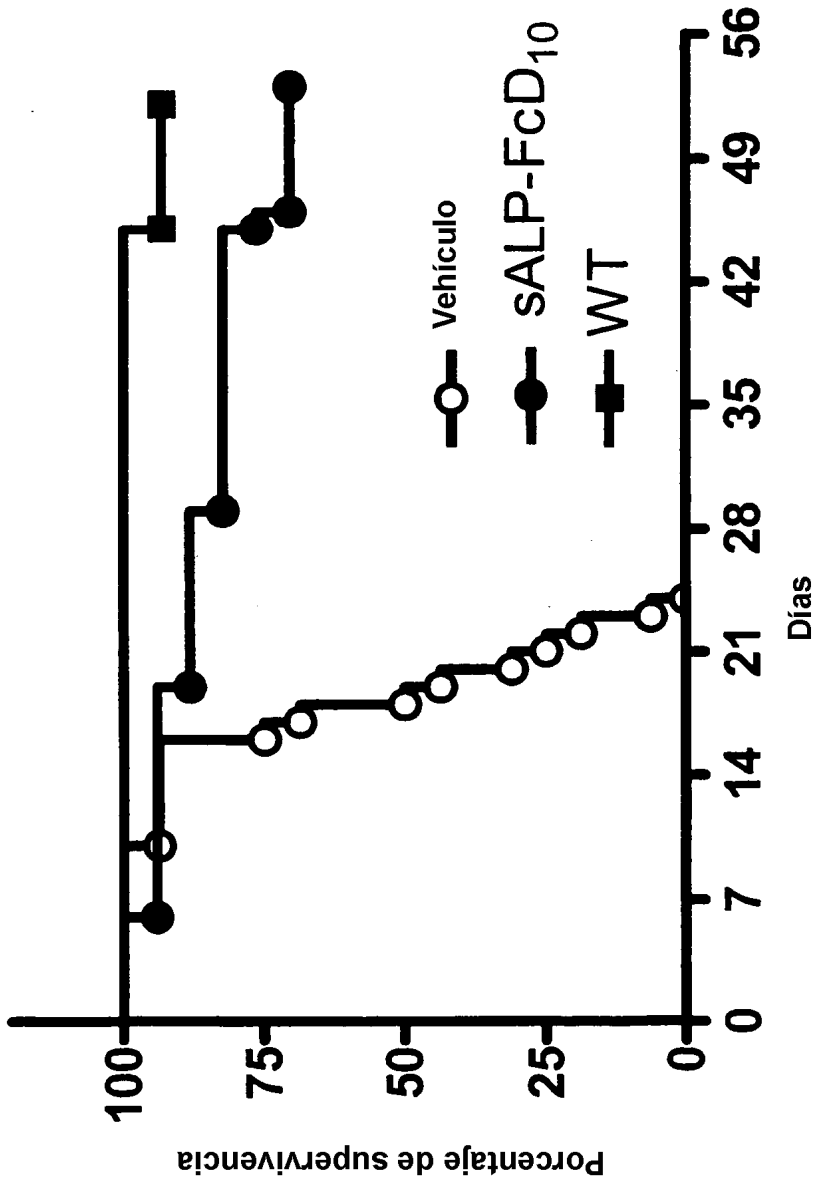


Figura 23



Figura 24

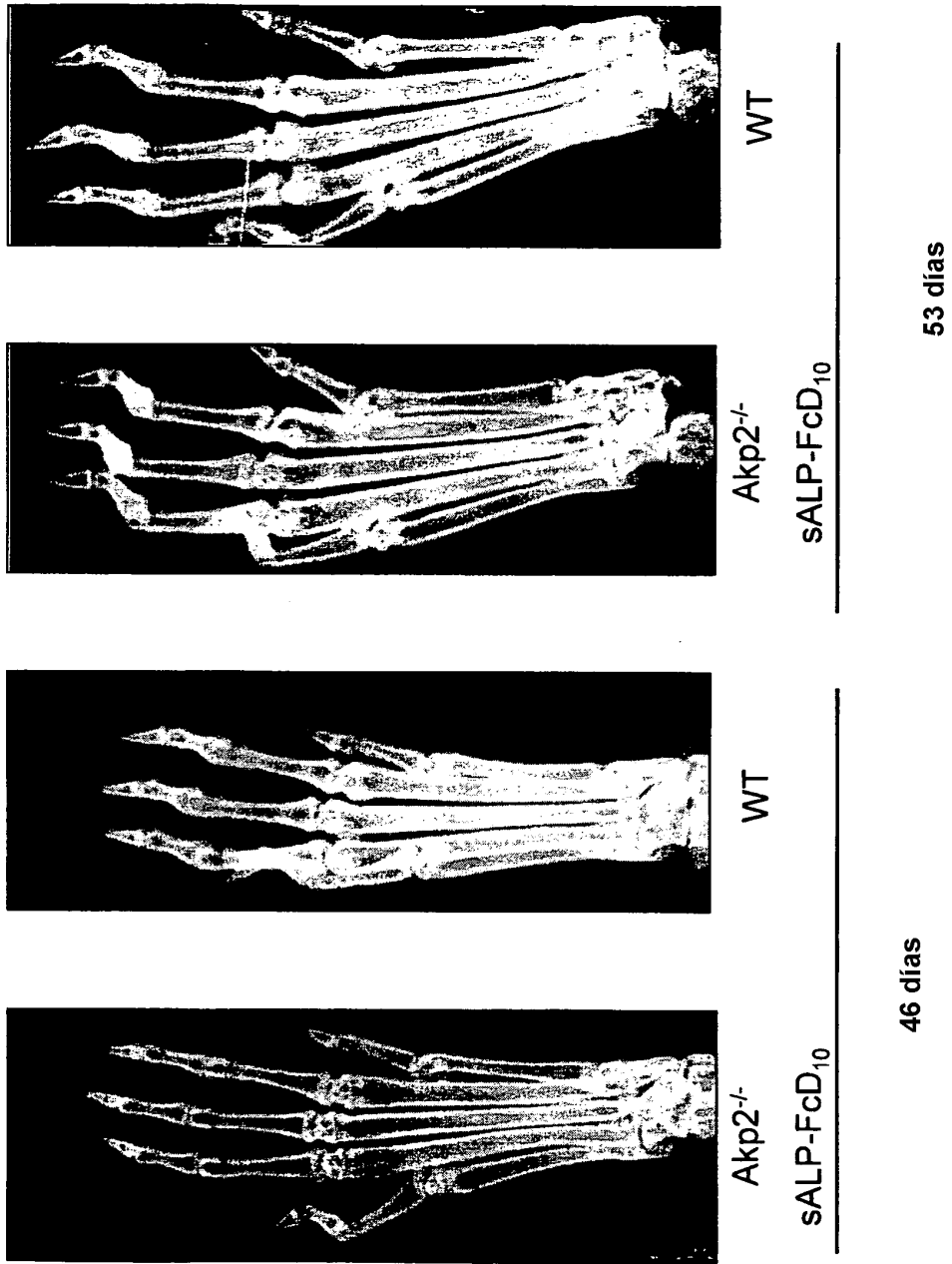


Figura 25

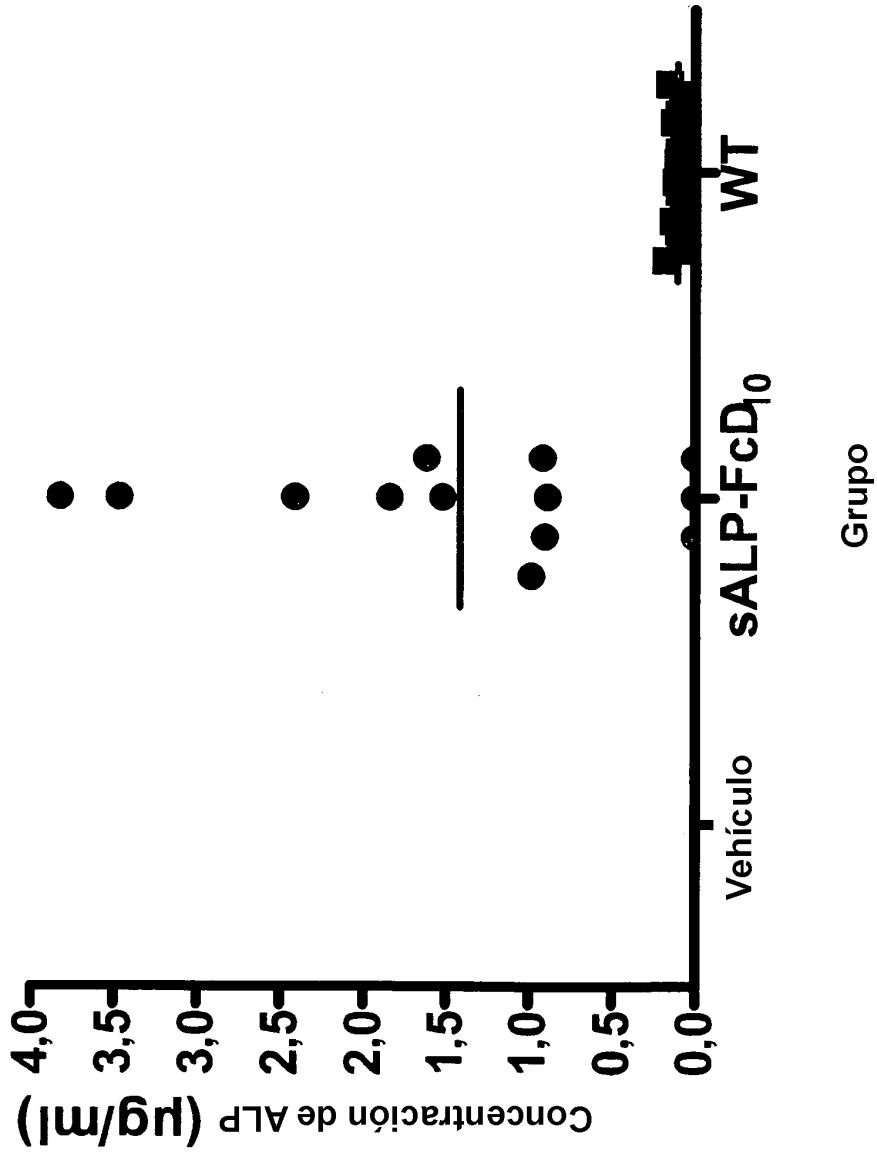
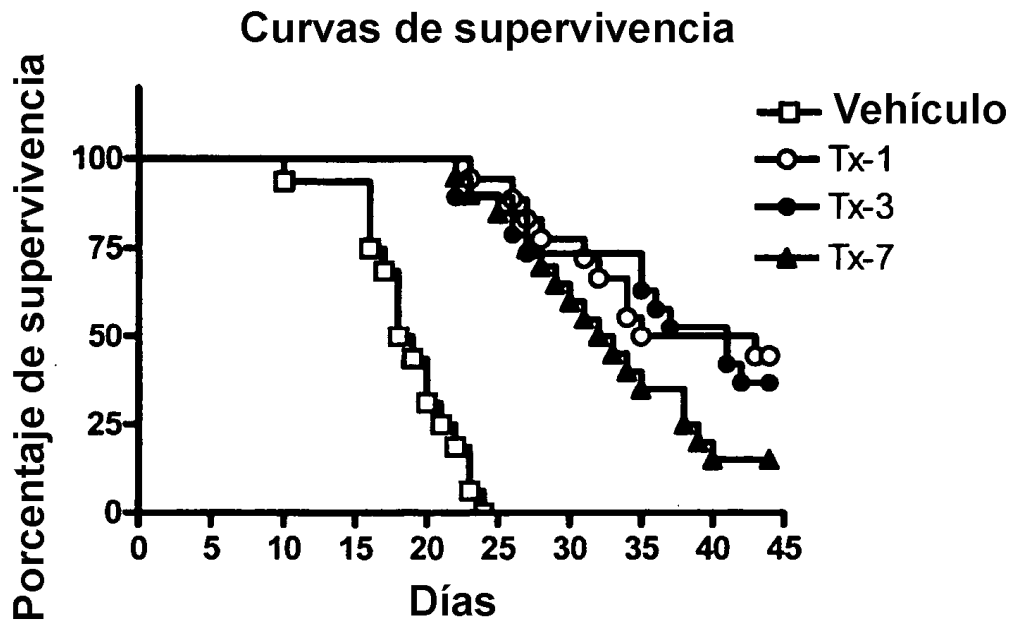


Figura 26

A

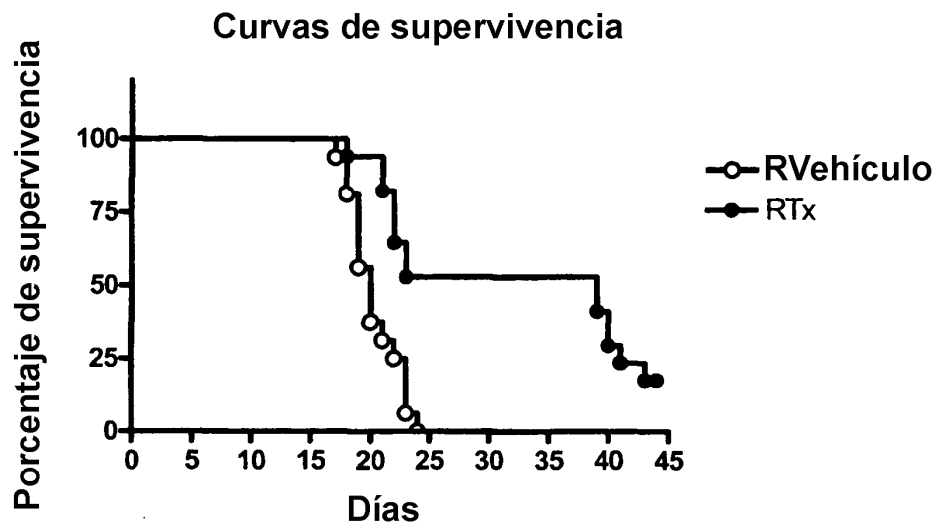


B

Grupo	Supervivencia media (Día)
Vehículo	18,5
Tx-1	39
Tx-3	41
Tx-7	32,5

Figura 27

A



B

	Supervivencia media (Día)
RVehículo	20
RTx	39

Figura 28

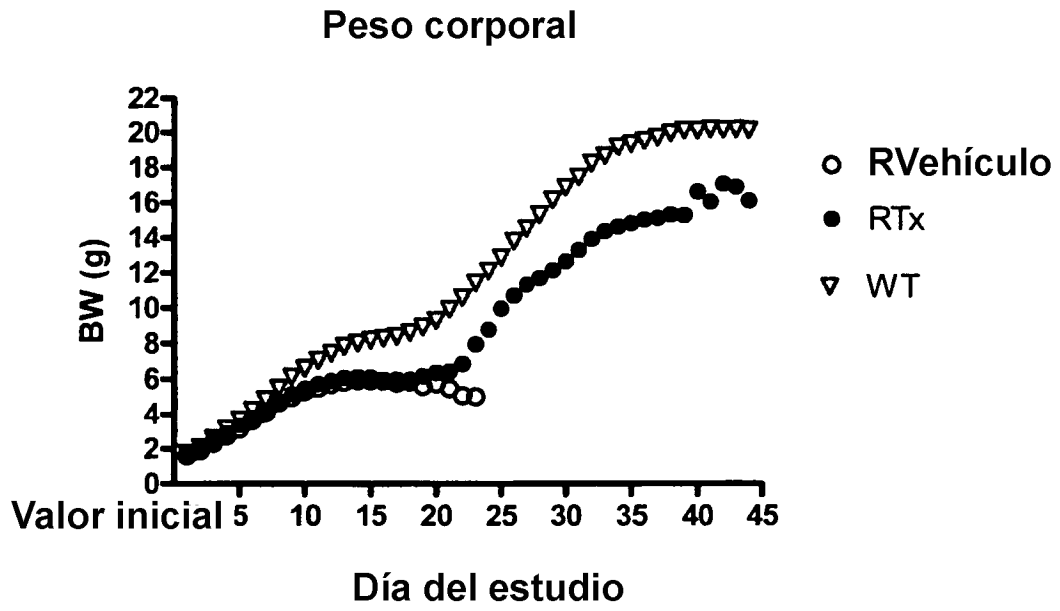


Figura 29

Alineamiento de múltiples secuencias de CLUSTAL W (1.82): Fosfatasa alcalina no específica de tejidos

```

1  MISPFLLAI  GTCFASSLVP  EKEKDPKYWR  DQAQQTLLKNA  LRLQTLNTNV  AKNVIMFLGD
   Q29486|PPBT_FELCA
   P05186|PPBT_HUMAN
   P09242|PPBT_MOUSE
   P08289|PPBT_RAT
   Q9N0V0|Q9N0V0_CANFA
Consenso
XXXXXXXXXX  XXXXXXXXXXXX  XXEXDPXYWR  XQAQXTLLKXA  LXLQXLNTNV  XKNXIMFLGD

61  GMGVSTVTAA  RILKGQLHHS  PGEETKLEMD  KFPYVALSKT  YNTNAQVPDS  AGTATAYLCC
   Q29486|PPBT_FELCA
   P05186|PPBT_HUMAN
   P09242|PPBT_MOUSE
   P08289|PPBT_RAT
   Q9N0V0|Q9N0V0_CANFA
Consenso
XXXXXXXXXX  RILKGQLHHS  PGEETKLEMD  KFPYVALSKT  YNTNAQVPDS  AGTATAYLCC

121  VKANEGTVGV  SAATQSQCN  TTQGNEVTSI  LRWAKDAGKS  VGIVTTTRVN  HATPSASYAH
   Q29486|PPBT_FELCA
   P05186|PPBT_HUMAN
   P09242|PPBT_MOUSE
   P08289|PPBT_RAT
   Q9N0V0|Q9N0V0_CANFA
Consenso
XXXXXXXXXX  SAATQSQCN  TTQGNEVTSI  LRWAKDAGKS  VGIVTTTRVN  HATPSASYAH

```

Figura 31


```

361  P09487|PPBT_BOVIN      QAGAMTSVED  TLTVVTADHS  HVFTFGGYTP  RGNsIFGLAP  MVSDTDKPPF  TAILYNGGPG
    Q29486|PPBT_FELCA    RAGAMTSVED  TLTIVTADHS  HVFTFGGYTP  RGNsIFGLAP  MVSDTDKPPF  TSILYNGGPG
    P05186|PPBT_HUMAN    QAGSLTSED  TLTVVVTADHS  HVFTFGGYTP  RGNsIFGLAP  MLSDDTDKPPF  TAILYNGGPG
    P09242|PPBT_MOUSE    KAGAMTSQKD  TLTVVVTADHS  HVFTFGGYTP  RGNsIFGLAP  MVSDTDKPPF  TAILYNGGPG
    P08289|PPBT_RAT      KAGMTSQKD  TLTVVVTADHS  HVFTFGGYTP  RGNsIFGLAP  MVSDTDKPPF  TAILYNGGPG
    Q9N0V0|Q9N0V0_CANFA  KAGVMTSLED  TLTVVVTADHS  HVFTFGGYTP  RGNsIFGLAP  MVSDTDKPPF  TAILYNGGPG
    **: ** : * ***:***** * :***** ** :***** * :*****
    XAGXXTSXXD  TLTXXVTADHS  HVFTFGGYTP  RGNsIFGLAP  MXSDTDKPPF  TXILYNGGPG

421  P09487|PPBT_BOVIN      YKVVGGEREN  VSMVDYAHNN  YQAQSAVPLR  HETHGGEDVA  VFAKGPMAHL  LHGVQEQNYI
    Q29486|PPBT_FELCA    YKVVGGEREN  VSMVDYAHNN  YQAQSAVPLR  HETHGGEDVA  VFAKGPMAHL  LHGVHEQNYI
    P05186|PPBT_HUMAN    YKVVGGEREN  VSMVDYAHNN  YQAQSAVPLR  HETHGGEDVA  VFSKGPMAHL  LHGVHEQNYI
    P09242|PPBT_MOUSE    YKVVDGEREN  VSMVDYAHNN  YQAQSAVPLR  HETHGGEDVA  VFAKGPMAHL  LHGVHEQNYI
    P08289|PPBT_RAT      YKVVDGEREN  VSMVDYAHNN  YQAQSAVPLR  HETHGGEDVA  VFAKGPMAHL  LHGVHEQNYI
    Q9N0V0|Q9N0V0_CANFA  YKVVGGEREN  VSMVDYAHNN  YQAQSAVPLR  HETHGGEDVA  VFAKGPMAHL  LHGVHEQNYI
    ****.***** * :***** ** :***** ** :*****
    YKVXGGEREN  VSMVDYAHNN  YQAQSAVPLR  HETHGGEDVA  VFXXKGPMAHL  LHGVXEQNYX

481  P09487|PPBT_BOVIN      PHVMAYAACI  GANRDHCASA  SSSGSPSPGP  LLLLALLPL  GSLF
    Q29486|PPBT_FELCA    PHVMAYAACI  GANLDHCASA  SSAGSPSPGP  LFLLLALPSL  GILF
    P05186|PPBT_HUMAN    PHVMAYAACI  GANLGHCAPA  SSAGSLAAGP  LLLAIALYPL  SVLF
    P09242|PPBT_MOUSE    PHVMAYASCI  GANLDHCAWA  GSGSAPSPGA  LLLPLAVLSL  PTLF
    P08289|PPBT_RAT      PHVMAYASCI  GANLDHCAWA  SSASSPSPGA  LLLPLALFPL  RTLF
    Q9N0V0|Q9N0V0_CANFA  PHVMAYAACI  GANQDHCASA  SSAGGSPSPGP  LLLLALLPLV  GILF
    *****: ** ***.*** * *... :.. * : * ** : **
    PHVMAYAXCI  GANXXHCAXA  XSXXXXXXGX  LXLXLAXXXX  XXLF

```

Figura 31 (continuación)

ES 2 380 546 T3

```

1 atggtttcac cattcttagt actggccatt ggcacctgcc ttactaactc cttagtgcca
61 gagaaagaga aagaccccaa gtactggcga gaccaagcgc aagagacact gaaatatgcc
121 ctggagcttc agaagctcaa caccaacgtg gctaagaatg tcatcatggt cctgggagat
181 gggatgggtg tctccacagt gacggctgcc cgcatcctca agggtcagct ccaccacaac
241 cctggggagg agaccaggct ggagatggac aagtccccct tctgtggcct ctccaagacg
301 tacaacacca atgcccagggt ccctgacagc gccggcaccg ccaccgccta cctgtgtggg
361 gtgaaggcca atgagggcac cgtgggggta agcgcagcca ctgagcgttc ccggtgcaac
421 accaccagg ggaacgaggt cacctccatc ctgctgctgg ccaaggacgc tgggaaatct
481 gtgggcattg tgaccaccac gagagtgaac catgccacc ccagcgcgc ctaccgccac
541 tctggctgacc gggactggta ctcagacaac gagatgcccc ctgaggcctt gagccagggc
601 tgtaaggaca tgcctacca gctcatgcat aacatcaggg acattgacgt gatcatgggg
661 ggtggccgga aatacatgta ccccaagaat aaaactgatg tggagtatga gagtgacgag
721 aaagccagg gacagaggct ggacggcctg gacctcgttg acacctggaa gagcttcaaa
781 ccgagataca agcactccca cttcatctgg aaccgcacgg aactcctgac ccttgacccc
841 cacaatgtgg actacctatt gggctctctc gagccagggg acatgcagta cgagctgaac
901 aggaacaacg tgacggaccc gtcactctcc gagatggtgg tgggtggcct ccagatcctg
961 cggagaacg ccaaaggctt cttcttgctg gtggaaggag gcagaattga ccacgggcac
1021 catgaaggaa aagccaagca ggccctgcat gaggcgggtg agatggaccg ggccatcggg
1081 caggcaggca gcttgacctc ctctggaagac actctgaccg tggtcactgc ggaccattcc
1141 cagctcttca catttgggtg atacaccccc cgtggcaact ctatctttgg tctggcccc
1201 atgctgagtg acacagacaa gaagcccttc actgccatcc tgtatggcaa tgggcctggc
1261 tacaaggtgg tgggcgggtg acgagagaa gtctccatgg tggactatgc tcacaacaac
1321 taccaggcgc agtctgctgt gcccctgctc cacgagaccc acggcgggga ggacgtggcc
1381 gtcttctcca agggccccc atggcgcacct ctgcacggcg tccacgagca gaactacgtc
1441 cccacgtga tggcgtatgc agcctgcatc ggggccaacc tgggacctg tgctcctgcc
1501 agctcgCTTA AGgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg
1561 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc
1621 cctgaggtca catgctggtt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttaaac
1681 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgaggga ggagcagtac
1741 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc
1801 aaggagtaca agtgaagggt ctccaacaaa gcctcccag ccccatcgca gaaaaccatc
1861 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag
1921 gagatgacca agaaccagggt cagcctgacc tgcttggta aaggcttcta tcccagcgac
1981 atcgccgtgg agtgggagag caatgggag cgggagaaca actacaagac cacgcctccc
2041 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg
2101 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac
2161 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaGATATCG ATGACGATGA CGATGACGAT
2221 GACGATGACT AG

```

Figura 32