

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 405**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2008 PCT/NL2008/050249**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2008 WO08133511**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2008 E 08741670 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2155866**

54 Título: **Fosfatasas modificadas**

30 Prioridad:

27.04.2007 EP 07107176
27.04.2007 US 926695 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2018

73 Titular/es:

AM-PHARMA B.V. (100.0%)
RUMPSTERWEG 6
3981 AK BUNNIK, NL

72 Inventor/es:

VELDERS, MARKWIN PAUL;
JONK, LUIGI JOHANNES CORNELIUS;
RAABEN, WILLEM y
WULFERINK, MARTY BERNARDUS FRANSISCUS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 656 405 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 modificadas

5 La invención se refiere a fosfatasa y más específicamente a fosfatasa (genéticamente) modificadas, composiciones farmacéuticas que comprenden fosfatasa (genéticamente) modificadas y el uso de fosfatasa (genéticamente) modificadas para tratar o curar, por ejemplo, sepsis, enfermedad inflamatoria del intestino u otras enfermedades inflamatorias o insuficiencia renal. La invención se refiere además a un método para producir fosfatasa.

10 Una fosfatasa es una enzima que desfosforila su sustrato; es decir, hidroliza monoésteres de ácido fosfórico en un ion fosfato y una molécula con un grupo hidroxilo libre. Esta acción es directamente opuesta a la de las fosforilasas y quinasas, que unen los grupos fosfato a sus sustratos mediante el uso de moléculas energéticas como el ATP. Las fosfatasa se pueden categorizar en dos categorías principales: fosfatasa dependientes de cisteína (CDP) y metalofosfatasa. Las últimas dependen de la presencia de uno o más iones metálicos en su(s) sitio(s) activo(s) para su actividad.

15 Los CDP catalizan la hidrólisis de un enlace fosfoéster a través de un intermediario de fosfocisteína. El nucleófilo de cisteína libre forma un enlace con el átomo de fósforo de la unidad estructural fosfato, y el enlace P-O que une el grupo fosfato con la tirosina es protonado, bien por un residuo de aminoácido ácido colocado adecuadamente o bien por una molécula de agua. El intermedio de fosfocisteína es luego hidrolizado por otra molécula de agua, regenerando así el sitio activo para otra reacción de desfosforilación.

20 Las metalofosfatasa coordinan 1 o más iones metálicos catalíticamente esenciales dentro de su sitio activo. Actualmente existe cierta confusión sobre la identidad de estos iones metálicos, ya que los intentos sucesivos de identificarlos producen respuestas diferentes. Actualmente hay evidencia de que estos metales pueden ser magnesio, manganeso, hierro, zinc o cualquier combinación de los mismos. Se cree que un ion hidroxilo que puentea los dos iones metálicos participa en el ataque nucleofílico en el grupo fosfato

25 Las fosfatasa actúan en oposición a las quinasas/fosforilasas, que añaden grupos fosfato a las proteínas. La adición de un grupo fosfato puede activar o desactivar una enzima (por ejemplo, rutas de señalización de quinasas) o permitir que tenga lugar una interacción proteína-proteína (por ejemplo, dominios SH3); por lo tanto, las fosfatasa son esenciales para muchas rutas de transducción de señales. Debe observarse que la adición y eliminación de fosfato no corresponde necesariamente a la activación o inhibición de la enzima, y que varias enzimas tienen sitios de fosforilación separados para activar o inhibir la regulación funcional. La CDK, por ejemplo, puede activarse o desactivarse dependiendo del residuo de aminoácido específico que se fosforila. Los fosfatasa son importantes en la transducción de señales porque regulan las proteínas a las que están unidos. Para revertir el efecto regulador, se elimina el fosfato. Esto ocurre por sí solo mediante hidrólisis, o está mediado por proteínas fosfatasa.

30 Sin limitar la presente invención, las fosfatasa alcalinas se discuten con más detalle como un ejemplo de las fosfatasa descritas y reivindicadas aquí. La fosfatasa alcalina (ALP) (EC 3.1.3.1) es una enzima hidrolasa responsable de eliminar los grupos fosfato de muchos tipos de moléculas, incluidos nucleótidos, proteínas y alcaloides. El proceso de eliminación del grupo fosfato se llama desfosforilación. Como su nombre indica, las fosfatasa alcalinas son más efectivas en un ambiente alcalino.

35 La fosfatasa alcalina se ha convertido en una herramienta útil en los laboratorios de biología molecular, ya que el ADN normalmente posee grupos de fosfato en el extremo 5'. La eliminación de estos fosfatasa evita que el ADN se ligue (el extremo 5' se une al extremo 3' de la misma u otra molécula); también, la eliminación de los grupos fosfato permite la radiomarcación (reemplazo por grupos de fosfato radioactivo) con el fin de medir la presencia del ADN marcado a través de etapas adicionales en el proceso o experimento. Para estos fines, la fosfatasa alcalina del camarón es la más útil, ya que es la más fácil de desactivar una vez que ha hecho su trabajo.

Otro uso importante de la fosfatasa alcalina es como etiqueta para inmunoensayos enzimáticos.

40 Además, las fosfatasa alcalinas se usan en el tratamiento de, por ejemplo, sepsis, enfermedad inflamatoria del intestino o insuficiencia renal.

45 Aunque las fosfatasa (alcalinas) actualmente disponibles son útiles tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de la enfermedad, existe la necesidad de fosfatasa alternativas con, por ejemplo, una actividad específica alterada (por ejemplo mejorada), estabilidad (por ejemplo, $T_{1/2}$ in vivo, o estabilidad con respecto al almacenamiento (vida útil)) o especificidad del sustrato. Además, también existe la necesidad de fosfatasa con un perfil diferente de (in)dependencia del pH o la temperatura o la sal.

50 La presente invención proporciona fosfatasa alternativas (genéticamente) modificadas.

65

La invención se refiere a una fosfatasa alcalina aislada o recombinante que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, en el que dicho dominio de corona y dicho dominio catalítico se obtienen a partir de diferentes fosfatasas alcalinas. Estos mutantes se denominan en el presente documento "mutantes intercambiados en dominio".

En una primera realización, la invención proporciona una fosfatasa alcalina aislada o recombinante que comprende un y un dominio catalítico, en el que dicho dominio de corona es el dominio de corona de una fosfatasa alcalina de placenta (MF) y en donde dicho dominio catalítico es el dominio catalítico de una fosfatasa alcalina intestinal (ALPI).

Fosfatasa alcalina (AP); EC 3.1.3.1 según IUBMB Enzyme Nomenclature, el nombre común es fosfatasa alcalina (AP), es una enzima que cataliza la reacción de un monoéster de fosfatasa y H₂O a un alcohol y fosfato. Otros nombres para la AP son fosfomonoesterasa alcalina; fosfomonoesterasa; glicerofosfatasa; fosfohidrolasa alcalina; fenil fosfatasa alcalina; ortofosfórico-monoéster fosfohidrolasa (alcalino óptimo). El nombre sistémico de AP es fosfato-monoéster fosfohidrolasa (alcalino óptimo).

La AP es una enzima de amplia especificidad, y también cataliza transfosforilaciones. En humanos y otros mamíferos, se conocen al menos cuatro fosfatasas alcalinas distintas, pero relacionadas. En humanos, son fosfatasa alcalina intestinal, placentaria, similar a placentaria y de hígado/hueso/riñón (o tejido no específico). Las tres primeras se encuentran juntas en el cromosoma 2, mientras que la forma no específica del tejido se encuentra en el cromosoma 1. No se conocen las funciones fisiológicas exactas de las AP, pero las AP parecen estar involucradas en una gran cantidad de procesos fisiológicos.

La fosfatasa alcalina placentaria se abrevia aquí como ALPP o PLAP. Las abreviaturas ALPI o IAP se refieren a la fosfatasa alcalina intestinal. La fosfatasa alcalina tipo 2 placentaria se abrevia aquí como ALPP2, ALPG o GCAP y las abreviaturas ALPL, TNSALP, TNAP o BLK se usan en este documento para referirse a la fosfatasa alcalina no específica de hígado/tejido. Las diferentes abreviaturas para una y la misma fosfatasa alcalina se usan indistintamente en este documento.

Desde un punto de vista conformacional, una fosfatasa alcalina consiste aproximadamente en dos dominios: un dominio de corona y un dominio de sitio activo. El dominio de sitio activo se puede dividir en partes separadas como el residuo catalítico y los tres sitios de ion metálico (Zn₁, Zn₂ y Mg₃). Desde el punto de vista de la estructura primaria, está claro que el dominio de corona está flanqueado por los aminoácidos que forman el dominio de sitio activo. Por lo tanto, en una realización preferida, el dominio catalítico no está compuesto de una secuencia contigua de aminoácidos, sino que está flanqueando el dominio de corona.

La secuencia de aminoácidos de las fosfatasas alcalinas y las posiciones relativas del dominio catalítico y corona son conocidas por la persona experta. Como ejemplo, se hace referencia a la Figura 1 que muestra, entre otros, la secuencia de aminoácidos de las cuatro fosfatasas alcalinas humanas. El dominio de corona está subrayado en estas secuencias. Los mutantes intercambiados en el dominio de la invención preferiblemente se han fabricado reemplazando su propio dominio de corona (subrayado) por un dominio de corona de otra fosfatasa (subrayado). Por ejemplo, el dominio de corona de ALPP está localizado entre los aminoácidos 366 a 430 y por lo tanto en una realización preferida la referencia al dominio de corona corresponde a los aminoácidos 366 a 430 en la figura 1, es decir, en una realización preferida la fosfatasa alcalina recombinante según las reivindicaciones, cuyo dominio de corona en el ALPP de la Figura 1 está localizada entre los aminoácidos 366 a 430.

Las fosfatasas alcalinas están presentes en prácticamente todos los organismos, desde bacterias hasta humanos. En una realización preferida, la invención proporciona una fosfatasa alcalina aislada o recombinante que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, donde dicho dominio de corona y dicho dominio catalítico se obtienen de diferentes fosfatasas alcalinas, donde dicho dominio de corona es el dominio de corona de una fosfatasa alcalina de placenta (ALPP) y en el que dicho dominio catalítico es el dominio catalítico de una fosfatasa alcalina intestinal (ALPI), y en el que al menos una de dichas fosfatasas diferentes es una fosfatasa humana. La otra fosfatasa es, por ejemplo, ECAP (fosfatasa alcalina de *Escherichia coli*) o una de las siete BIAP conocidas (fosfatasa alcalina intestinal bovina). En una realización preferida, la invención proporciona una fosfatasa alcalina aislada o recombinante que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, donde dicho dominio de corona y dicho dominio catalítico se obtienen de diferentes fosfatasas alcalinas, donde dicho dominio de corona es el dominio de corona de una fosfatasa alcalina de placenta (ALPP) y en el que dicho dominio catalítico es el dominio catalítico de una fosfatasa alcalina intestinal (ALPI) y en el que las diferentes fosfatasas alcalinas son fosfatasas humanas. Esto es especialmente útil si la fosfatasa modificada se usa posteriormente en terapia humana, por ejemplo en el tratamiento de sepsis, enfermedad inflamatoria del intestino u otra enfermedad inflamatoria o insuficiencia renal. Se espera que tales fosfatasas (genéticamente) modificadas de origen humano no sean o sean muy poco inmunogénicas. Sin embargo, es evidente para el experto en la materia que si una fosfatasa modificada se utiliza por ejemplo en diagnósticos "in vitro" o "ex vivo", una fosfatasa modificada puede estar compuesta, por ejemplo, de una fosfatasa alcalina humana y una *E. coli* o puede estar compuesta de una fosfatasa alcalina de *E. coli* y bovina.

La invención proporciona así una fosfatasa alcalina aislada o recombinante que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, donde dicho dominio de corona y dicho dominio catalítico se obtienen de diferentes fosfatasas

alcalinas y en el que dicho dominio de corona es el dominio de corona de ALPP y en el que dicho dominio catalítico es el dominio catalítico de ALPI. Preferiblemente, al menos una de dichas fosfatasa diferentes es una fosfatasa humana y en una realización aún más preferida, ambas fosfatasa diferentes son fosfatasa humanas.

5 Hasta la presente invención, generalmente se creía que el dominio catalítico de una fosfatasa alcalina era el dominio más importante con respecto a la actividad específica. Además, se creía que el dominio de corona estaba involucrado en la estabilidad de una fosfatasa alcalina. Por lo tanto, al probar una fosfatasa alcalina recombinante que comprende el dominio catalítico de ALPI y el dominio de corona de ALPP (referido adicionalmente como ALPIcat/ALPPcorona) se esperaba que la actividad de esta fosfatasa alcalina recombinante fuera comparable a la
10 actividad de ALPI. Sin embargo, la producción de ALPIcat/ALPPcorona en un medio sin o con muy poco Zn^{2+} , por ejemplo medio de expresión Freestyle™ 293 (GIBCO), dio como resultado una actividad específica de aproximadamente 600 U/mg mientras que ALPI producida por la misma línea celular y en el mismo medio dio como resultado una actividad específica de aproximadamente 30 U/mg.

15 Aún más sorprendente fue el efecto de añadir iones Zn^{2+} al medio de crecimiento de las células productoras: esto tiene poco efecto sobre la actividad específica de ALPIcat/ALPPcorona mientras que la actividad específica de ALPI aumentó a aproximadamente 750 U/mg. La adición de concentraciones similares de Zn^{2+} después de la producción indujo solo un aumento de 2 veces en la actividad específica de ALPI después de 16 h.

20 Se proporciona un resumen de estos resultados en las Tablas 1 y 2.

Sin estar limitados por la teoría, se cree que el dominio de corona de ALPP proporciona un cambio conformacional en la ALPIcat/ALPPcorona recombinante producida que da como resultado una actividad específica más alta y una enzima independiente de Zn^{2+} , es decir, la presencia del dominio de corona de ALPP da como resultado una
25 actividad específica relativamente alta y se considera que es independiente de Zn^{2+} .

Además, no solo se demostró que ALPI requería altas concentraciones de Zn^{2+} durante la producción para aumentar la actividad específica de la enzima, sino también que la actividad específica de ALPI disminuía en 24 horas en medio deficiente en Zn^{2+} , mientras que ALPIcat/ALPPcorona conservaba su actividad específica inicial bajo las
30 mismas condiciones. Estos resultados implican que la actividad in vivo es independiente de Zn^{2+} . Dicha enzima, cuya actividad es independiente de Zn^{2+} , podría ser útil en enfermedades donde la pérdida de Zn^{2+} es parte de la patología (por ejemplo, defectos nutricionales, abuso de alcohol y daño a la integridad intestinal, infecciones crónicas incluyendo sepsis o enfermedades inflamatorias en general) o donde la adición de Zn^{2+} puede estar contraindicada (por ejemplo, fase aguda de la sepsis, enfermedades autoinmunes). Además de las ventajas de producción y
35 aplicación, ALPIcat/ALPPcorona también tiene ventajas con respecto a la estabilidad durante el almacenamiento.

Por lo tanto, se ha demostrado que una AP nativa, como ALPI, pierde su actividad enzimática en entornos con bajas concentraciones de Zn^{2+} . Por tanto, en enfermedades en las que la pérdida de Zn^{2+} es parte de la patología, dicha AP nativa no puede desplegar su actividad enzimática en el sitio donde se cree que es el más beneficiosa, por
40 ejemplo en el sitio de la inflamación. Por el contrario, una AP recombinante no susceptible a bajas concentraciones de Zn^{2+} , por ejemplo ALPIcat/ALPPcorona conserva su actividad en un entorno con baja concentración de Zn^{2+} , por ejemplo en un sitio de inflamación. En un individuo sano, los valores de referencia del Zn^{2+} en suero están entre 10 y 20 μM . Por ejemplo, en el abuso del alcohol o durante la desnutrición, estos niveles pueden disminuir a menos de 10 μM o incluso a menos de 1 μM . Varias enzimas en el cuerpo humano dependen del Zn^{2+} para su actividad y, por
45 ejemplo, las respuestas inmunológicas son más eficaces si hay niveles suficientes de Zn^{2+} . Se sabe que las partes innata y específica del sistema inmune están influenciadas por el zinc y se ha establecido que las proteínas que contienen zinc se acumulan en los sitios de inflamación. Además, la inflamación (sub)crónica, como la artritis reumatoide, la sepsis y la enfermedad de Crohn se presentan con deficiencia de zinc en suero. Sorprendentemente, la invención también proporciona la idea de que ALPIcat/ALPPcorona conserva su actividad en un intervalo de pH
50 mucho más amplio que la fosfatasa alcalina no modificada (recombinante). Dado el hecho de que muchos trastornos, tales como inflamación y/o isquemia, abarcan alteraciones en el pH del tejido, ALPIcat/ALPPcorona es, por lo tanto, particularmente útil para el tratamiento de tales enfermedades. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un uso de una fosfatasa que comprende un dominio catalítico de ALPI y un dominio de corona de ALPP como medicamento, preferiblemente para uso en el tratamiento de una enfermedad que está acompañada por pH de tejido alterado, preferiblemente dicha enfermedad comprende una enfermedad inflamatoria y/o una enfermedad acompañada de isquemia.

La descripción proporciona la idea de que una fosfatasa recombinante que comprende el dominio catalítico de ALPI y el dominio de corona de ALPP (ALPIcat/ALPPcorona) es especialmente útil en el tratamiento de una enfermedad
60 que está acompañada de deficiencia de Zn^{2+} local o sistémica. Por lo tanto, en otra realización, la invención se refiere a un uso de una fosfatasa que comprende un dominio catalítico de ALPI y un dominio de corona de ALPP como medicamento, preferiblemente para uso en el tratamiento de una enfermedad que está acompañada por deficiencia de Zn^{2+} . Preferiblemente, dicha enfermedad comprende una enfermedad inflamatoria, más preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, sepsis,
65 neurodermitis y enfermedades representadas en la Tabla 10.

En otra realización, la invención se refiere al uso de una fosfatasa que comprende un dominio catalítico de ALPI y un dominio de corona de ALPP en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que está acompañada por deficiencia de Zn²⁺, preferiblemente dicha enfermedad comprende una enfermedad inflamatoria, más preferiblemente una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, sepsis, neurodermitis y enfermedades representadas en la Tabla 10.

En aún otra realización, la invención se refiere a un método para tratar un sujeto (preferiblemente un ser humano) para tratar una enfermedad que está acompañada por deficiencia de Zn²⁺, que comprende administrar una cantidad efectiva de una fosfatasa que comprende un dominio catalítico de ALPI y un dominio de corona de ALPP a un sujeto que lo necesita, donde dicha enfermedad comprende preferiblemente una enfermedad inflamatoria, más preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, sepsis, neurodermitis y enfermedades representadas en la Tabla 10.

También se describe una fosfatasa alcalina aislada o recombinante que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, donde dicho dominio de corona y dicho dominio catalítico se obtienen de diferentes fosfatasas alcalinas y en el que dicho dominio de corona es el dominio de corona de ALPI y en el que dicho dominio catalítico es el dominio catalítico de ALPP (más conocido como catALPP/coronaALPI). Preferiblemente, al menos una de dichas fosfatasas diferentes es una fosfatasa humana e incluso más preferiblemente, ambas fosfatasas diferentes son fosfatasas humanas.

Otros mutantes preferidos intercambiados en el dominio que se basan en las fosfatasas alcalinas humanas son:

Dominio catalítico	Dominio de corona	Denominado
ALPI	GCAP	ALPIcat/GCAPcorona
	TNAP	ALPIcat/TNAPcorona
ALPP	GCAP	ALPPcat/GCAPcorona
	TNAP	ALPPcat/TNAPcorona
GCAP	ALPI	GCAPcat/ALPIcorona
	ALPP	GCAPcat/ALPPcorona
	TNAP	GCAPcat/TNAPcorona
TNAP	ALPI	TNAPcat/ALPIcorona
	ALPP	TNAPcat/ALPPcorona
	GCAP	TNAPcat/GCAPcorona

En aras de la claridad, ALPI es AP intestinal, ALPP es AP placentario, GCAP es AP similar a placentario y TNAP es AP no específico de tejido.

Está claro que también se pueden realizar combinaciones entre el dominio catalítico de ECAP o cualquiera de las formas humanas (ALPI, ALPP, GCAP o TNAP) con el dominio de corona de BIAP. Además, también se pueden producir combinaciones del dominio de corona de BIAP con el dominio catalítico de ECAP o cualquiera de las formas humanas.

A lo largo de la especificación, ejemplos y bibliografía en la técnica, se usa otra nomenclatura para designar las isoformas respectivas de fosfatasa alcalina. En aras de la claridad, en la tabla a continuación, se enumeran los nombres y abreviaturas utilizados comúnmente, o utilizados en esta solicitud.

FOSFATASAS ALCALINAS	ABREVIATURAS
Placenta alcalina fosfatasa	ALPP, PLAP,
Fosfatasa alcalina placentaria secretable	shPLAP, sALPP
Fosfatasa alcalina intestinal	ALPI, IAP hIAP

FOSFATASAS ALCALINAS	ABREVIATURAS
Fosfatasa alcalina intestinal secretable	shIAP, sALPI
Fosfatasa alcalina similar a placenta	GCAP
Fosfatasa alcalina no específica de tejido	TNAP,BLK, ALPL, TNSALP
Fosfatasa alcalina de <i>E.coli</i>	ECAP
Fosfatasa alcalina intestinal bovina	BIAP
Fosfatasa alcalina recombinante que comprende el dominio catalítico de ALPI y el dominio de corona de ALPP	ALPIcat/ALPPcorona, RecAP, Xinlap
Fosfatasa alcalina recombinante que comprende el dominio catalítico de ALPI y el dominio de corona de ALPP	catALPP/coronaALPI, shPLAP-hIAP-CD

5 Otra clase de fosfatasa modificadas útiles son las fosfatasa que en condiciones naturales están unidas a la membrana de una célula a través de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) pero que ahora están modificadas de manera que ya no están unidas a la membrana de una célula. Ejemplos de fosfatasa que están ancladas a GPI son fosfatasa alcalina y 5'-nucleotidasa. Todas las isoenzimas son funcionalmente activas en la membrana celular y las formas deficientes en anclaje a GPI no están presentes de manera natural a niveles detectables. Aunque se ha demostrado la actividad del fosfato alcalino sérico, generalmente se acepta que la enzima aún está presente en fracciones de membranas de membrana o vesículas de membrana. La actividad de AP en leche también está presente en fracciones que contienen vesículas de membrana. El ancla de GPI se almacena como una molécula precursora en la célula donde está unida al sitio de unión a través de una transamidasa. La cadena principal del anclaje de GPI es idéntica en mamíferos, pero se conocen modificaciones dependientes del tipo de célula.

10 Las fosfatasa alcalinas se encuentran predominantemente en asociación con membranas plasmáticas a través de su anclaje de GPI. Por ejemplo, los neutrófilos presentan la enzima contra el fondo de su membrana celular cargada negativamente en lugar de liberarla en el microambiente inflamatorio. Por esta razón, se acepta comúnmente que para una actividad in vivo óptima de AP, la enzima debe estar incrustada en una membrana celular o una membrana vesicular. Además, se ha observado que los sustratos polianiónicos pueden contribuir adicionalmente a condiciones aniónicas favorables in vivo para la actividad de fosfatasa de las enzimas fosfatasa y sus derivados que normalmente tienen un pH alcalino óptimo, en particular para la actividad fosfatasa de la fosfatasa alcalina.

15 Para el uso farmacéutico de AP en sujetos humanos es para la mayoría de las aplicaciones un requisito aplicar formas humanas de la enzima para medicamentos y tratamiento, ya que las formas de AP obtenidas de otras especies pueden ser inmunogénicas en sujetos humanos y el tratamiento podría provocar reacciones inmunológicas y efectos secundarios patológicos. En algunos sujetos, incluso pueden producirse efectos secundarios letales, es decir, choque anafiláctico (que se muestra en nuestros estudios con animales) y, por lo tanto, se deben minimizar los riesgos de efectos secundarios inmunológicos. Como el aislamiento de AP de humanos es prácticamente inviable, las formas recombinantes humanas de las proteínas de AP pueden producirse rutinariamente en diferentes plataformas de expresión recombinantes. Sin embargo, la expresión y purificación de proteínas que contienen GPI y ancladas a la membrana es notoriamente difícil; las proteínas GPI son difíciles de separar de las membranas y son difíciles de aislar y purificar. Sin embargo, el anclaje de GPI y la localización de la membrana siempre se han considerado esenciales para la actividad biológica de AP.

20 Esta parte de la presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que las enzimas AP humanas que carecen de un anclaje de GPI y enzimas que son así solubles y se secretan fácilmente mediante sistemas de expresión de proteínas recombinantes, exhiben actividad fosfatasa significativa a niveles de pH fisiológicos hacia sustratos fosforilados biológicamente relevantes en un ensayo biológico basado en células hepáticas.

25 La invención describe una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia de señalización de glicosilfosfatidilinositol (GPI), en donde dicha modificación da como resultado una fosfatasa secretada, es decir, la fosfatasa no está unida a la membrana celular.

30 La invención describe además una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la de glicosilfosfatidilinositol (GPI), donde dicha modificación da como resultado una fosfatasa secretada que es biológicamente activa, es decir, muestra actividad hacia un sustrato biológico (relevante).

35 No hay una secuencia general responsable de la unión de un anclaje de GPI, pero existe un consenso claro:

40 1) estiramiento hidrofóbico de aminoácidos en el extremo C (al menos 11 aminoácidos, pero preferiblemente más de 11 aminoácidos)

50

2) Aguas arriba de la región hidrofóbica, un espaciador de aminoácidos hidrófilos (5-12 aminoácidos)

3) GPI está unido a un pequeño aminoácido: glicina, ácido aspártico, asparagina, alanina, serina o cisteína.

5 4) Los 2 aminoácidos subsiguientes aguas abajo del sitio de unión de GPI deben ser aminoácidos pequeños y en la mayoría de los casos se seleccionan entre glicina, ácido aspártico, asparagina, alanina, serina o cisteína.

10 Basado en este consenso, la persona experta es capaz de mutar este consenso, por ejemplo, insertando uno o múltiples aminoácidos y alterando parte del consenso. Sin embargo, la invención describe una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia de señalización de glicosilfosfatidilinositol (GPI), donde dicha modificación da como resultado una fosfatasa secretada y dicha modificación comprende una mutación o eliminación de la secuencia de aminoácidos que abarca la secuencia de señalización de consenso de GPI.

15 Para aplicaciones en terapia humana, se desea que la fosfatasa modificada resultante no sea o sea muy poco inmunogénica, es decir, que la fosfatasa modificada sea esencialmente de origen humano. La invención describe una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia de señalización de glicosilfosfatidilinositol (GPI), donde dicha modificación da como resultado una fosfatasa secretada (preferiblemente con actividad contra un sustrato biológico relevante) y en el que dicha fosfatasa es una fosfatasa humana.

20 Ejemplos de fosfatasas que están ancladas a GPI son fosfatasa alcalina y 5'-nucleotidasa y, por lo tanto, la invención describe una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia de señalización de glicosilfosfatidilinositol (GPI), donde dicha modificación da como resultado una fosfatasa secretada y la fosfatasa es una fosfatasa alcalina, por ejemplo, una fosfatasa alcalina humana, como la fosfatasa humana de hígado y riñón, la fosfatasa alcalina intestinal humana o la fosfatasa alcalina similar a la placenta humana.

25 Está claro que cualquiera de las fosfatasas modificadas secretables descritas puede producirse, por ejemplo, introduciendo en una célula huésped un ácido nucleico capaz de codificar dicha fosfatasa secretable en un enlace operable con secuencias reguladoras y permitiendo que dicha célula huésped exprese dicha fosfatasa secretable y opcionalmente aislar la fosfatasa producida del medio en el que crecen y/o se mantienen las células huésped. Sin embargo, aparte de las mutaciones en la secuencia de inserción de GPI mencionada anteriormente, existen otros métodos que producen proteínas GPI sin anclaje, secretadas:

30 1) Después de la expresión como proteínas ancladas a la membrana, las fosfolipasas pueden usarse para escindir el anclaje de GPI. Por lo tanto, la invención también describe un método para producir una fosfatasa secretada que comprende cultivar un huésped capaz de expresar una fosfatasa anclada a membrana, permitiendo que dicha célula huésped produzca dicha fosfatasa e incubando las células obtenidas con una fosfolipasa y aislando opcionalmente la fosfatasa liberada. La fosfatasa anclada a la membrana es, por ejemplo, una fosfatasa de tipo salvaje (o natural o no modificada). Sin embargo, la fosfatasa anclada a la membrana puede comprender mutaciones en otras partes de su secuencia (por ejemplo, el dominio de corona).

40 2) La interferencia con la producción del anclaje de GPI o el uso de una célula (tipo) que es deficiente en la producción de anclaje de GPI también se puede usar para hacer una forma secretable de una proteína anclada a GPI. Los ejemplos de líneas celulares que se han hecho deficientes en la bioquímica de anclaje de GPI son, por ejemplo Jurkat, AM-B, C84, BW, S49, CHO y Raji. Por lo tanto, la invención describe un método para producir una fosfatasa secretada que comprende cultivar una célula huésped capaz de expresar una fosfatasa (alcalina) secretable (por ejemplo, una célula huésped que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica cualquiera de las fosfatasas secretadas modificadas (alcalinas) mencionadas), permitiendo dicho huésped la producción de dicha fosfatasa secretable y opcionalmente aísla la fosfatasa producida, en donde dicha célula huésped no es capaz de biosíntesis de proteínas ancladas a GPI funcionales. Sin embargo, la célula huésped también puede producir una fosfatasa con una secuencia de señal de GPI funcional.

50 3) La interferencia con o el uso de una célula deficiente en transamidasa puede usarse para inhibir la unión de un anclaje de GPI a la proteína, haciendo que la proteína sea anclable y secretable. Dicha célula deficiente se ha obtenido mediante mutagénesis en CHO.

55 Está claro para los expertos en la materia que una fosfatasa modificada que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, en el que dicho dominio de corona y dicho dominio catalítico que se obtienen a partir de diferentes fosfatasas alcalinas pueden modificarse adicionalmente y hacerse secretables. Por lo tanto, la invención describe una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia de señalización de glicosilfosfatidilinositol (GPI), donde dicha modificación da como resultado una fosfatasa secretada y en la que dicha fosfatasa recombinante comprende además un dominio de corona y un dominio catalítico que se obtienen de diferentes fosfatasas. Ejemplos de tales mutantes de fosfatasa alcalina se proporcionan en la Figura 1. Tal mutante combinado o "doble" da como resultado, por ejemplo, una fosfatasa modificada con cierta actividad, estabilidad o especificidad de sustrato específica y, al mismo tiempo, la producción de dicho producto es muy mejorada por el hecho de que puede aislarse del medio que rodea las células productoras.

El dominio catalítico de las fosfatasa alcalinas está compuesto por varias secuencias de aminoácidos que no son contiguas en la secuencia primaria de la enzima. El dominio catalítico contiene el residuo de serina catalítica (Ser92 en ALPP) que sirve como un aceptor para el grupo fosfato que se escinde del sustrato en la reacción de desfosforilación. El dominio catalítico de la enzima contiene además uno o más iones metálicos. Los residuos de aminoácidos específicos contenidos en el dominio catalítico son responsables de la unión y coordinación de los iones metálicos que están implicados en la reacción de desfosforilación. En ALPP, los residuos de coordinación del metal son: Asp42, His153, Ser155, Glu311, Asp316, His320, Asp357, His358, His360 e His432.

La invención también describe una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una mutación en las proximidades de un residuo catalítico y/o en un bolsillo de unión a fosfato coordinador con iones metálicos. El experto en la técnica es muy capaz de identificar y mutar aminoácidos alrededor (es decir, en las cercanías, preferiblemente conformacionales) de un residuo catalítico y/o en un bolsillo de fosfato coordinador con iones metálicos. Como ya se ha descrito anteriormente, se conocen secuencias de fosfatasa. Como ejemplo, la Figura 1 muestra, entre otros, la secuencia de aminoácidos de cuatro fosfatasa alcalinas humanas.

La invención describe una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una mutación en las proximidades de un residuo catalítico y/o en un bolsillo de unión a fosfato coordinador con iones metálicos en el que dicha fosfatasa es una fosfatasa humana. Esto es especialmente útil si la fosfatasa modificada se usa posteriormente en terapia humana, por ejemplo en el tratamiento de sepsis, enfermedad inflamatoria del intestino u otra enfermedad inflamatoria o insuficiencia renal. Se espera que tales fosfatasa (genéticamente) modificadas de origen humano no sean o sean muy poco inmunogénicas. Sin embargo, es evidente para el experto en la materia que si una fosfatasa modificada se utiliza por ejemplo en diagnósticos "in vitro" o "ex vivo", una fosfatasa modificada puede estar compuesta, por ejemplo, de una fosfatasa alcalina humana y una *E. coli* o puede estar compuesta de una fosfatasa alcalina de *E. coli* y bovina.

Preferiblemente, dicha fosfatasa es una fosfatasa alcalina.

El bolsillo de unión a fosfato coordinador con iones metálicos es conservado, al menos para las isoformas de fosfatasa alcalina humana. Consiste en dos tramos de unión a Zn y un tramo de unión a Mg que contienen los aminoácidos Asp316, His320 e His432 para Zn1, Asp42, Asp 357 y Asp358 para Zn2 y Ser155 y Glu31 para Mg, respectivamente (se hace referencia a ALPP Figura 1).

Las mutaciones de los restos de aminoácidos coordinadores y/o residuos localizados en la vecindad de los restos de coordinación pueden afectar las propiedades catalíticas de la enzima mutante resultante de una manera positiva o negativa. Por ejemplo, en ALPP, los residuos de aminoácido 44, 87, 93, 322, 323 y 429 están situados en las proximidades de los residuos de coordinación. La mutagénesis de estos residuos por sustitución con uno, dos, tres o cuatro de los aminoácidos correspondientes de ALPI puede afectar las propiedades catalíticas de la enzima. Por el contrario, la sustitución de los residuos de aminoácidos 44, 87, 93, 322, 323 y 429 de ALPI con los aminoácidos correspondientes de ALPP puede afectar a las propiedades catalíticas de la enzima ALPI. Las tablas 4 y 5 muestran (combinaciones de) los aminoácidos que pueden estar sustituidos.

Por lo tanto, en una realización preferida, la invención proporciona una fosfatasa aislada o recombinante de acuerdo con las reivindicaciones, que comprende una mutación en las proximidades de un residuo catalítico y/o en un bolsillo de unión a fosfato coordinador con iones metálicos, donde dicha mutación es una mutación como se muestra en la Tabla 4, 5 o 6.

Está claro para los expertos en la materia que una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una mutación en las proximidades de un residuo catalítico y/o en un bolsillo de unión a fosfato que contiene iones metálicos puede modificarse adicionalmente para, por ejemplo, comprender una modificación en la secuencia de señal GPI. Tal mutante puede incluso modificarse adicionalmente por dominio del dominio catalítico y corona, es decir, tal dominio de corona y dominio catalítico que se obtienen a partir de diferentes fosfatasa.

Una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una mutación en las proximidades de un residuo catalítico y/o en un bolsillo de unión a fosfato que coordina un ion metálico también puede modificarse adicionalmente por intercambio de dominio del dominio catalítico y corona, es decir, de tal forma que dicho dominio de corona y dominio catalítico se obtienen de diferentes fosfatasa.

Además, la invención describe una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una mutación en las proximidades de un residuo catalítico y/o en un bolsillo de unión a fosfato coordinador con iones metálicos.

Las técnicas de biología molecular para llegar a cualquiera de las fosfatasa descritas (genéticamente) modificadas son bien conocidas por el experto en la técnica e incluyen técnicas tales como incubaciones de enzimas de restricción, ligaciones, PCR, introducción de mutaciones, etc.

En otra realización más, la invención proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una fosfatasa según la invención, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un mutante intercambiado en el

dominio, etc. La invención proporciona además un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una fosfatasa de acuerdo con la invención. Dicho vector preferiblemente comprende secuencias de ácidos nucleicos adicionales tales como elementos necesarios para la transcripción/traducción de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una fosfatasa (por ejemplo, secuencias promotoras y/o terminadoras). Dicho vector también puede comprender secuencias de ácidos nucleicos que codifican marcadores de selección (por ejemplo, un antibiótico) para seleccionar o mantener células huésped transformadas con dicho vector. Ejemplos de vectores adecuados son vectores de clonación o expresión. Cualquier vector adecuado para mediar la expresión en una célula huésped adecuada se puede usar de acuerdo con la invención, ya sea integrado o replicando episómicamente en una célula huésped. El vector puede ser un plásmido, un virus (que comprende un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, baculovirus), cósmido, un fago o un fagémido, un vector episómico o un cromosoma artificial.

Además, la invención también proporciona una célula huésped que comprende una secuencia o vector de ácido nucleico como se describe. La célula puede ser una célula eucariota, preferiblemente una célula de mamífero, una célula vegetal o una célula de levadura, que es adecuada para la producción de proteínas recombinantes. Las células huésped de levadura adecuadas comprenden *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Las células huésped preferidas son células derivadas de mamíferos (o más preferidas para los seres humanos) tales como BHK, HEK293, CHO o PerC6™.

Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una fosfatasa como se describe aquí o un vector que comprende dicha secuencia de ácidos nucleicos o una célula huésped que comprende dicha secuencia de ácidos nucleicos o un vector que comprende dicha secuencia de ácidos nucleicos son muy útiles en la producción de fosfatasas modificadas. Las fosfatasas comprenden sitios de glucosilación y, por lo tanto, las fosfatasas se producen preferiblemente en células que proporcionan el patrón de glicosilación deseado. En una realización preferida, el sistema de producción utilizado es una plataforma de producción in vitro de mamíferos (por ejemplo, humanos) e incluso más preferiblemente la producción implica una producción a gran escala. En otra realización preferida, el sistema de producción usado es una plataforma de planta o levadura o de mamífero (preferiblemente no humano) en la que se introduce un patrón artificial de glicosilación de tipo humano.

Después de probar diferentes métodos de producción, los inventores de la presente invención determinaron sorprendentemente que la presencia de iones Zn^{2+} durante la producción de una fosfatasa (alcalina) de tipo silvestre o mutante puede tener un impacto sobre la actividad específica de la fosfatasa producida. Por ejemplo, la actividad específica de ALPI se puede aumentar de 30 U/mg a 750 U/mg añadiendo Zn^{2+} al medio de crecimiento de la célula huésped utilizada. El medio normalmente usado para cultivar células huésped comprende 0.5-3 nM de Zn^{2+} . Tras la adición de Zn^{2+} hasta 1 mM, la actividad específica mejoró drásticamente. Por lo tanto, se concluye que ALPI es una fosfatasa dependiente de Zn^{2+} . Esto está en contraste con el mutante ALPIcat/ALPPcorona ya descrito que parece ser independiente de Zn^{2+} , es decir, la ausencia de Zn^{2+} durante el cultivo de las células huésped no influye significativamente en la actividad específica de la fosfatasa producida ni la ausencia de Zn^{2+} durante almacenamiento y durante la reacción disminuyen la actividad específica.

En aún otra realización, la invención proporciona un método para producir una fosfatasa de acuerdo con la invención que comprende cultivar una célula huésped capaz de expresar dicha fosfatasa en un medio que comprende Zn^{2+} y que permite a la célula producir dicha fosfatasa. En una realización preferida, dicha célula huésped es una célula de mamífero y en otra realización preferida, dicha fosfatasa es una fosfatasa humana. El método de la invención se puede usar para producir fosfatasa de tipo salvaje (o natural o no modificada genéticamente) y puede igualmente se usará para producir una fosfatasa genéticamente modificada, por ejemplo cualquiera de las fosfatasas descritas aquí.

En una realización preferida adicional, la invención proporciona un método para producir una fosfatasa según la invención que comprende cultivar una célula huésped capaz de expresar dicha fosfatasa en un medio que comprende Zn^{2+} y permitir que la célula produzca dicha fosfatasa, comprendiendo además dicho método aislar dicha fosfatasa. La invención describe además una fosfatasa que se puede obtener mediante un método para producir una fosfatasa que comprende cultivar una célula huésped capaz de expresar dicha fosfatasa en un medio que comprende Zn^{2+} y que permite que la célula produzca dicha fosfatasa.

Ya sea que las fosfatasas modificadas (genéticamente) descritas aquí tengan una cierta actividad específica, una cierta especificidad de sustrato o una cierta estabilidad (por ejemplo, pH, temperatura, tiempo de semivida in vivo) pueden ser fácilmente probadas por la persona experta utilizando sustratos comercialmente disponibles y midiendo con kits comercialmente disponibles la liberación de fosfato inorgánico tras la incubación con fosfatasa alcalina. Además, también es posible usar las pruebas descritas en este documento en la parte experimental para determinar si las fosfatasas modificadas tienen alguna actividad biológica relevante.

Como ya se mencionó, las fosfatasas modificadas (genéticamente) descritas aquí son útiles en diagnósticos y en terapia. En una de las realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una fosfatasa modificada de acuerdo con la invención. Ejemplos descritos por la invención:

una fosfatasa alcalina aislada o recombinante que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico y en la que dicho dominio de corona y dicho dominio catalítico se obtienen a partir de diferentes fosfatasas alcalinas o

una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia de señalización de glucosilfosfatidilinositol (GPI) y en la que dicha modificación da como resultado una fosfatasa secretada o

una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una mutación en las proximidades de un residuo catalítico;

o cualquier combinación de las mismas.

Dicha composición farmacéutica comprende opcionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica se puede presentar en cualquier forma, por ejemplo como una tableta, como un fluido inyectable o como un fluido de infusión, etc. Además, la fosfatasa (genéticamente modificada) se puede administrar a través de diferentes rutas, por ejemplo, por vía intravenosa, rectal, bronquialmente u oralmente. Otra vía de administración adecuada es el uso de un goteo duodenal.

En una realización preferida, la vía de administración usada es intravenosa. Está claro para la persona experta, que preferiblemente se administra una cantidad eficaz de una fosfatasa modificada (genéticamente). Como punto de partida se pueden usar 1-5000 U/kg/día. Si se usa la vía de administración intravenosa, se aplica preferiblemente una fosfatasa (genéticamente modificada) (al menos durante una cierta cantidad de tiempo) a través de una infusión continua.

Las composiciones pueden comprender opcionalmente excipientes, estabilizantes, activadores, vehículos, permeadores, propelentes, desinfectantes, diluyentes y conservantes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes adecuados son comúnmente conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica y pueden ser fácilmente encontrados y aplicados por el experto en la materia, referencias, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia PA, 17th ed. 1985.

Para la administración oral, el AP secretable puede, por ejemplo, administrarse en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, tabletas (preferiblemente con un recubrimiento entérico) y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes, y suspensiones. La AP puede encapsularse en cápsulas de gelatina junto con ingredientes inactivos y vehículos en polvo, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato de magnesio y similares. Ejemplos de ingredientes inactivos adicionales que se pueden añadir para proporcionar el color, sabor, estabilidad, capacidad reguladora, dispersión deseable u otras características deseables conocidas son óxido de hierro rojo, gel de sílice, lauril sulfato de sodio, dióxido de titanio, tinta blanca comestible y similares. Diluyentes similares se pueden usar para hacer tabletas comprimidas. Tanto las tabletas como las cápsulas se pueden fabricar como productos de liberación sostenida para proporcionar la liberación continua de medicamentos durante un período de horas. Las tabletas comprimidas pueden recubrirse con azúcar o recubrirse con una película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger la tableta de la atmósfera, o recubrirse entéricamente para una desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas de dosificación líquidas para la administración oral pueden contener colorantes y saborizantes para aumentar la aceptación del paciente.

En una realización preferida, las composiciones que comprenden una fuente de una fosfatasa modificada (genéticamente) son adecuadas para la administración oral y comprenden un revestimiento entérico para proteger a la AP de los efectos adversos de los jugos gástricos y el pH bajo. Las formulaciones de recubrimiento entérico y liberación controlada son bien conocidas en la técnica. Las composiciones de revestimiento entérico en la técnica pueden comprender una solución de un polímero de revestimiento entérico soluble en agua mezclado con el/los ingrediente(s) activo(s) tal como una fosfatasa (modificada genéticamente) y otros excipientes, que se dispersan en una solución acuosa y que pueden posteriormente secarse y/o conformarse en pellas. El revestimiento entérico formado ofrece resistencia al ataque de una fosfatasa modificada (genéticamente) por la humedad atmosférica y el oxígeno durante el almacenamiento y por los fluidos gástricos y bajo pH después de la ingestión, mientras se descompone fácilmente bajo las condiciones alcalinas que existen en el tracto intestinal inferior.

Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente son muy útiles en el tratamiento de, por ejemplo, sepsis, enfermedad inflamatoria del intestino u otra enfermedad inflamatoria, y/o insuficiencia renal.

Por lo tanto, en otra realización, la invención proporciona una fosfatasa (genéticamente) modificada de acuerdo con la invención para uso como medicamento, preferiblemente para tratar sepsis, enfermedad inflamatoria del intestino, insuficiencia renal e inflamaciones preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, sepsis, neurodermitis y enfermedades representadas en la Tabla 10.

En aún otra realización, la invención proporciona el uso de una fosfatasa (modificada genéticamente) de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de sepsis, enfermedad inflamatoria del intestino u otra enfermedad inflamatoria, y/o insuficiencia renal.

5 La sepsis se considera presente si la infección es altamente sospechada o está demostrada y se cumplen dos o más de los siguientes criterios del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS):

- Frecuencia cardíaca >90 latidos por minuto

10 • Temperatura corporal <36 (96.8°F) o >38°C (100.4°F)

- Hiperventilación (frecuencia respiratoria alta) >20 respiraciones por minuto o, en gasometría, una P_aCO_2 menor de 32 mm Hg

15 • Recuento de glóbulos blancos <4000 células/mm³ o >12000 células/mm³ (<4 x 10⁹ o >12 x 10⁹ células/L), o más del 10% en forma de banda (glóbulos blancos inmaduros).

20 Sin embargo, las definiciones de consenso continúan evolucionando con la última expansión de la lista de signos y síntomas de sepsis para reflejar la experiencia clínica de cabecera. Los subconjuntos más críticos de la sepsis son la sepsis grave (sepsis con disfunción orgánica aguda) y el choque séptico (sepsis con hipotensión arterial refractaria). Alternativamente, cuando se cumplen dos o más de los criterios del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica sin evidencia de infección, los pacientes pueden ser diagnosticados simplemente con "SIRS". Los pacientes con SIRS y disfunción orgánica aguda pueden denominarse "SIRS grave". Los pacientes se definen como con "sepsis grave" si tienen sepsis más signos de hipoperfusión sistémica, ya sea disfunción del órgano final o un lactato sérico mayor a 4 mmol/dL. Se define a los pacientes con choque séptico si tienen sepsis más hipotensión después de un bolo de fluido apropiado (típicamente 20 ml/kg de cristaloides). La invención proporciona la idea de que una fosfatasa (genéticamente modificada) de acuerdo con la invención es especialmente adecuada para el tratamiento de la sepsis. En el caso de la sepsis, una fosfatasa modificada (genéticamente) como se describe en este documento preferiblemente se administra por vía intravenosa.

30 La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un grupo de afecciones inflamatorias del intestino grueso y, en algunos casos, del intestino delgado. Las principales formas de EII son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (CU). En muchos menos casos hay otras formas de EII: colitis colágena, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por desviación, síndrome de Behçet, colitis infecciosa, colitis indeterminada. La principal diferencia entre la enfermedad de Crohn y la CU es la ubicación y la naturaleza de los cambios inflamatorios en el intestino. La enfermedad de Crohn puede afectar cualquier parte del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano, aunque la mayoría de los casos comienzan en el íleon terminal. La colitis ulcerosa, en cambio, está restringida al colon y al ano. Microscópicamente, la colitis ulcerativa se restringe a la mucosa (revestimiento epitelial del intestino), mientras que la enfermedad de Crohn afecta toda la pared intestinal. Finalmente, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa se presentan con manifestaciones extraintestinales (como problemas hepáticos, artritis, manifestaciones de la piel y problemas oculares) en diferentes proporciones. En casos raros, los pacientes han sido diagnosticados tanto con la enfermedad de Crohn como con la colitis ulcerosa, aunque es incierto si es una combinación o simplemente no identificable como una u otra. Aunque las enfermedades son muy diferentes, ambas pueden presentarse con alguno de los siguientes síntomas: dolor abdominal, vómitos, diarrea, hematoquecia, pérdida de peso y diversas dolencias o enfermedades asociadas (artritis, pioderma gangrenoso, colangitis esclerosante primaria). El diagnóstico generalmente es por colonoscopia con biopsia de lesiones patológicas. En el caso de la EII, una fosfatasa (modificada genéticamente) como se describe en el presente documento se administra preferiblemente a través de una tableta con recubrimiento entérico o mediante goteo duodenal.

50 Junto al grupo de la enfermedad inflamatoria del intestino, la invención proporciona la idea de que una fosfatasa según la invención es adecuada para tratar otras enfermedades inflamatorias. Las enfermedades inflamatorias pueden afectar diversos órganos, como los pulmones, las articulaciones, el hígado, el páncreas, la piel o incluso el tejido nervioso. La Tabla 10 proporciona una lista no limitante de órganos que pueden ser afectados por la inflamación. Se ha demostrado que una amplia variedad de agentes etiológicos causa o mantiene tales enfermedades inflamatorias. Ejemplos no limitantes de dichos agentes etiológicos son microbios (bacterias, hongos, virus), alérgenos, autoinmunes, traumatismos e isquemia/reperfusión. Aunque el agente causal y la etiología pueden ser muy diversos, la inflamación (sub)crónica resulta de una reacción inmune alterada. Comúnmente se piensa que tal reacción inmune alterada se sostiene a través de una espiral viciosa que incluye daño tisular inducido por la inflamación que a su vez activa el sistema inmune. Entre otros, se ha demostrado que el ATP desempeña un papel en la espiral viciosa antes mencionada. La invención proporciona la idea de que una fosfatasa (modificada genéticamente) tal como se describe en el presente documento, es capaz de desfosforilar ATP y así romper dicha espiral viciosa, lo que es beneficioso para el individuo que padece dicha enfermedad inflamatoria. Cuando se trata una enfermedad inflamatoria de este tipo, una fosfatasa (genéticamente modificada) de acuerdo con la invención se administra preferiblemente por vía intravenosa o, si es factible localmente, por ejemplo, intraarticular en el caso de la artritis reumatoide, intratecal en el caso de la inflamación del sistema nervioso (central), intrabronquial en el caso de asma (alérgica) o tópica en el caso de, por ejemplo, neurodermitis. Además, se ha descrito que las reacciones

inflamatorias (sub)crónicas, tales como la sepsis, la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoide y similares, están acompañadas por deficiencias de zinc (en suero). Una fosfatasa según la invención, en la que dicha fosfatasa no pierde su actividad enzimática cuando se proporciona en un entorno deficiente en zinc, es especialmente adecuada para tratar dichas enfermedades inflamatorias. La invención proporciona la idea de que una fosfatasa según la invención, en la que dicha fosfatasa comprende un dominio catalítico de ALPI y un dominio de corona de ALPP retiene su actividad a concentraciones subfisiológicas de Zn^{2+} tan bajas como 0.01 μM .

Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona el uso de una fosfatasa que comprende un dominio catalítico de ALPI y un dominio de corona de ALPP para la desfosforilación de un sustrato, preferiblemente un fosfato de adenosina, en un ambiente que comprende una concentración de Zn^{2+} menor de 10 μM , preferiblemente una concentración de Zn^{2+} inferior a 1 μM , más preferiblemente una concentración de Zn^{2+} inferior a 0.1 μM .

La insuficiencia renal aguda (IRA) se define como una pérdida aguda de la función renal que da como resultado un aumento del nivel de creatinina sérica. En la insuficiencia renal aguda, la tasa de filtración glomerular disminuye durante días o semanas. Como resultado, se reduce la excreción de residuos nitrogenados y no se pueden mantener los equilibrios de fluidos y electrolitos. Los pacientes con insuficiencia renal aguda a menudo son asintomáticos y la afección se diagnostica por las elevaciones observadas del nitrógeno ureico en sangre (BUN) y los niveles séricos de creatinina. La parada renal completa está presente cuando el nivel de creatinina sérica aumenta en al menos 0.5 mg por dL por día y la producción de orina es menos de 400 mL por día (oliguria). Las fosfatasas modificadas (genéticamente) descritas aquí no solo pueden usarse en el tratamiento de la insuficiencia renal sino también para mejorar la función renal, especialmente en los casos en que la función renal está al menos en parte alterada/reducida. En una realización preferida, la vía de administración utilizada es intravenosa. Está claro para la persona experta, que preferiblemente se administra una cantidad eficaz de una fosfatasa modificada (genéticamente). Como punto de partida se pueden usar 1-5000 U/kg/día. Si se usa la vía de administración intravenosa, se aplica preferiblemente una fosfatasa (genéticamente modificada) (al menos durante una cierta cantidad de tiempo) a través de una infusión continua.

En aún otra realización, la invención se refiere a un método para tratar a un sujeto que padece sepsis, enfermedad inflamatoria del intestino u otra enfermedad inflamatoria, y/o insuficiencia renal que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las fosfatasas modificadas aquí descritas.

Además del hecho de que una fosfatasa (modificada genéticamente) como se describe en este documento puede incorporarse en una composición farmacéutica, dicha fosfatasa también puede ser parte de una composición nutricional.

En una realización preferida de la presente invención, la fuente de una fosfatasa (genéticamente) modificada de acuerdo con la invención es una fosfatasa (genéticamente) modificada que preferiblemente se produce o aísla de la leche, preferiblemente leche bovina. La leche puede obtenerse de animales que han sido criados o genéticamente modificados para producir niveles elevados de una fosfatasa modificada (genéticamente) en su leche, en comparación con los animales salvajes. La preparación de fracciones enriquecidas con fosfatasa (modificada genéticamente) a partir de leche es conocida en la técnica. Por ejemplo, la fracción enriquecida en la membrana del glóbulo de la grasa láctea es la fracción preferida de la leche enriquecida con fosfatasa (modificada genéticamente) y puede obtenerse de forma rutinaria mediante el desnatado convencional de la leche cruda. Una fosfatasa (modificada genéticamente) aislada de leche puede formularse en composiciones farmacéuticas y en composiciones alimenticias o en nutracéuticos.

En una realización preferida, una composición que contiene fosfatasa (genéticamente) modificada para la administración oral de una fosfatasa modificada (genéticamente) a la mucosa del tracto gastrointestinal de acuerdo con la presente invención es un producto alimenticio o nutracéutico enriquecido para una (genéticamente) modificada fosfatasa. En una realización, el producto alimenticio puede ser una planta, fruta o vegetal, opcionalmente modificado genéticamente para contener un nivel potenciado de una fosfatasa modificada (genéticamente). En otra realización, un producto alimenticio o nutracéutico que contiene fosfatasa (modificada genéticamente) es un producto lácteo. En particular, las preparaciones y composiciones que contienen leche no pasteurizada o fracciones de las mismas, preferiblemente leche bovina, contienen altos niveles de una fosfatasa modificada (genéticamente) y son particularmente adecuadas para administración oral como fuente de una fosfatasa (genéticamente) modificada de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también se refiere a un método para la preparación de un producto lácteo enriquecido con fosfatasa (genéticamente) modificado, preferiblemente leche, una fracción de leche o producto lácteo. El método comprende el fraccionamiento de la leche cruda, preferiblemente leche bovina, la pasteurización de las fracciones que no contienen o no son ricas en una fosfatasa modificada genéticamente y la reformulación de dichas fracciones con las fracciones no pasteurizadas, modificadas genéticamente (fosfatasa modificada genéticamente), para obtener una menor percedero y un producto lácteo enriquecido con fosfatasa (genéticamente) modificado. Las fracciones ricas en fosfatasa no modificadas genéticamente (no modificadas genéticamente) se pueden esterilizar por otros medios, tales como, entre otros, irradiación con rayos ultravioleta, rayos X o gamma, filtración, presión, presión osmótica, productos químicos o antibióticos, lo que garantiza que la una enzima fosfatasa (genéticamente

modificada) permanece sustancialmente activa y que la fracción láctea se vuelve sustancialmente estéril. Este producto lácteo puede usarse en composiciones o administrarse directamente a sujetos que padecen o están en riesgo de desarrollar sepsis, IBD o insuficiencia renal. Sin embargo, un producto lácteo enriquecido con fosfatasa (genéticamente) modificado también se puede ofrecer a sujetos sanos como un producto farmacéutico o nutracéutico para la preservación de la integridad estructural intestinal.

Además, una fosfatasa modificada de la invención también se puede añadir a un nutriente (tal como leche) en lugar de producirse en dicho nutriente. Además, se pueden preparar tabletas y/o cápsulas que posteriormente se agregan a un nutriente o que pueden tomarse directamente por un ser humano.

La invención se explicará con más detalle en los siguientes ejemplos no limitativos.

Parte experimental

Materiales y métodos

Ejemplo 1

Desfosforilación del sustrato ATP biológicamente activo por diferentes fosfatasas

Kit ATPlite™ obtenido de Perkin Elmer que contiene los siguientes reactivos: solución de lisis de mamífero, solución de regulador de sustrato, solución de sustrato liofilizado y estándar de ATP liofilizado.

Preparación de estándar de ATP liofilizado: reconstituir un vial de solución estándar de ATP liofilizada con MiliQ de manera que se obtenga una solución madre de 10 mM. Después de la adición de MiliQ, se permite que el ATP se disuelva por completo rotando durante un minuto.

Determinación de la actividad de desfosforilación de ATP:

Se preparan 6 curvas estándar con una concentración inicial de 20 μM de ATP y se realiza una dilución en serie. El volumen final debe ser de 100 μl por pozo.

Se prepara una actividad de la enzima fosfatasa de 1 U/ml. Se preparan 3 curvas estándar con concentración de inicio de 1 U/ml y se realiza una dilución en serie. El volumen final debe ser de 50 μl.

Se prepara una solución de ATP 40 μM

Se agregan juntos 50 μl de la curva patrón de solución de enzima fosfatasa 1U/ml y 50 μl de la solución de ATP 40 μM en un Optiplat™ negro de 96 pozos (Perkin Elmer). El volumen final en cada pozo será de 100 μl.

Se agita la placa y se incuba por 90 minutos a 37°C.

Se permite que los reactivos se equilibren a temperatura ambiente

Se reconstituye un vial de solución de sustrato liofilizado agregando la cantidad adecuada de solución amortiguadora de sustrato, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se agita suavemente hasta que la solución sea homogénea.

Se añaden 50 μl de la solución de lisis de células de mamífero y se agita la placa durante 5 minutos a 700 rpm.

Se agregan 50 μl de la solución de sustrato al pozo y agita la placa durante 5 minutos a 700 rpm.

Se eliminan las burbujas de aire asperjando alcohol al 70% sobre la placa.

Se adapta la placa en la oscuridad durante 10 minutos y se mide la luminiscencia en el lector de etiquetas múltiples Viktor3™ (Perkin Elmer)

Ejemplo 2

Ensayo de sección hepática usando diferentes isoformas de fosfatasa alcalina

Se sacrificaron ratas bajo anestesia con O₂/N₂O/Foreno y se extrajeron los hígados y se almacenaron en la solución de preservación de órganos (UW) de la Universidad de Wisconsin hasta la preparación de la sección. Los núcleos (diámetro, 5 mm) se hicieron a partir de los trozos de tejido hepático y se almacenaron en solución UW enfriada en hielo hasta el corte. El corte se realizó con una máquina de cortar Krumdieck. Se usó KHB helado complementado con glucosa hasta una concentración final de 25 mM como regulador de corte. Se prepararon secciones de hígado

de rata (grosor, 200-250 μm , peso húmedo, ± 3 mg) con ajustes estándar (velocidad del ciclo, 30, modo interrumpido). Después de seccionar, las secciones de hígado de rata se almacenaron en solución UW hasta el inicio del experimento.

5 Se incubaron las secciones individualmente a 37°C en placas de 12 pozos (Greiner, Alphen a/d Rijn, Países Bajos) en 1.3 ml de medio Williams suplementado con Glutamax I (Gibco BRL, Paisly), Escocia). Se agregó gentamicina de 50 mg/ml (Gibco BRL) y saturada con 95% de $\text{O}_2/5\%$ de CO_2 . Las secciones se incubaron durante 24 horas con o sin LPS de 10 $\mu\text{g/ml}$ y con o sin isoformas diferentes de AP en diferentes concentraciones. El medio de las secciones se almacenó a -80°C hasta la medición de NO_x .

10 Se midió NO_x (la suma de NO , NO_2 y NO_3) añadiendo 5 μl de una mezcla de 0.275 μl de NADPH 100 mM, 2.2 μl de nitrato reductasa 10 U/ml y 0.055 μl de FAD 10 mM, que se diluyó 2 veces en agua, a 110 μl de sobrenadante. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, se agregaron 5 μl de una segunda mezcla; se añadieron 2.2 μl Napirovato 0.5 M y 0.55 μl de LDH 5 mg/ml, diluido 1:0.82 en agua. Después de 5 minutos de incubación a 37°C, se añadieron 5 μl de ZnSO_4 al 30% y las muestras se centrifugaron a 2000 rpm. Luego se transfirieron 100 μl del sobrenadante a una placa nueva y se mezclaron con 100 μl de reactivo de Griess que contenía 0.1% de sulfanilamida, 0.01% de n-Naftiletilendiamina y 2.5% de ácido fosfórico. Finalmente, la absorbancia se midió a 550 nm en un lector de microplacas. La absorbancia estaba relacionada con la absorbancia de una curva estándar de nitrato de sodio.

20 Ejemplo 3

Efecto biológico de la desfosforilación de ATP extracelular

25 Se obtuvieron la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 y líneas celulares epiteliales humanas T84 (carcinoma colorrectal) de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, Estados Unidos) y se mantuvieron en medio DMEM/F12 (1:1) y DMEM que contenía 4.5 g/l de glucosa, respectivamente. Ambos medios se obtuvieron de Invitrogen Corp. (Breda, Países Bajos), contenían Glutamax I y se suplementaron con FBS al 10% activado por calor (Wisent Inc. (Quebec, Canadá), 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina (ambos de Invitrogen Corp.). La línea celular T84 se subcultivó en la confluencia mediante el uso de tripsina-EDTA, las células RAW264.7 se rasparon usando un policía de caucho.

35 Se sembraron en placa 4×10^5 células T84 en placas de 12 pozos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 2 ml de medio. Al alcanzar la confluencia, el medio se renovó y las células se incubaron con (Figura 3) sin (Figura 2) 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS durante 2 horas en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de ATP y/o AP como se muestra en las Figuras (tablero de ajedrez). Después de 2 horas, el sobrenadante se recogió y se transfirió a placas de 24 pozos que contenían células RAW264.7. Estas células RAW264.7 se sembraron el día anterior en placas de 24 pozos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a una densidad de 2×10^5 en un ml de medio. Antes de la transferencia de 1 ml de los sobrenadantes de las células T84, el sobrenadante del RAW se aspiró y descartó.

40 Las células RAW se incubaron con los sobrenadantes de T84 durante 24 horas a 37°C con 5% de CO_2 , antes de recoger los sobrenadantes y comprobar el contenido de quitocina (IL-6, $\text{TNF}\alpha$) usando un ELISA comercial disponible (Biosource Europe SE, Nivelles, Bélgica).

45 Ejemplo 4

Preparación de mutantes

50 Los mutantes como se describen en la presente invención y más específicamente, los mutantes que se describen en las Tablas 4, 5 y 6 se prepararon usando técnicas de biología molecular convencionales.

55 Las posiciones de aminoácidos que se mencionan en las Tablas 4 a 6 corresponden a las secuencias como se representa en la Figura 1. Solo se indican las posiciones mutadas, es decir, solo se dan las desviaciones de las secuencias de tipo salvaje. Por ejemplo, el mutante 1 de la Tabla 4 es, si se compara con la secuencia de tipo silvestre dada, sin cambios en las posiciones 87, 93 y 429, es decir, la posición 87 es una K, la posición 93 es una G y la posición 429 es una E.

60 Los mutantes se prepararán y comprobarán mediante técnicas estándar de biología molecular, tales como mutagénesis dirigida a sitios de PCR, análisis de enzimas de restricción y análisis de secuencias.

Ejemplo 5

65 En $t=0$ diferentes fosfatasa alcalinas recombinantes que contienen 450 ± 50 Unidades se diluyeron 4000x en regulador diluyente (glicina/NaOH 0.025 M, pH 9.6/MgCl₂ 1 mM/manitol al 1%/BSA al 0.05%) con diferentes concentraciones de Zn^{2+} . En un segundo ejemplo, se omitió BSA como posible fuente de Zn^{2+} del. Dentro de 1 minuto después de la dilución ($T=0$), se tomó una muestra y se midió la actividad de fosfatasa alcalina usando el

ensayo de pNPP descrito a continuación. 90 minutos (T=1½ h), 180 minutos (T=3 h) y 22 horas (T=22 h) más tarde, cada vez que se tomó una muestra y se midió directamente la actividad de fosfatasa alcalina utilizando el ensayo pNPP como se describe a continuación. La actividad en U/ml se volvió a calcular mediante la actividad específica (U/mg) dividiendo el resultado obtenido en U/ml a través del contenido de proteína previamente obtenido usando un kit de BCA comercialmente disponible (Pierce).

Medición de la actividad de la fosfatasa pNPP:

Sustrato de trabajo:

La temperatura de los reactivos, sustratos, muestras y la cámara de incubación se ajustaron a 25°C. El espectrofotómetro se ajustó a una longitud de onda de 405 nm y la trayectoria de la luz fue de 1 cm.

En una cubeta desechable, se pipetearon 50 µl de la sustancia de prueba y 1450 µl del sustrato de trabajo, se mezcló e inmediatamente se colocó la cubeta en el espectrofotómetro y se registró el aumento de la absorbancia a 405 nm durante 3 minutos.

La actividad por volumen se calculó usando la siguiente ecuación:

Actividad (U/ml) = $\Delta E_{405}/\text{min} \times 1.6 \times \text{factor de dilución}$

Nota: el rango de medición debe estar entre 0.04 y 0.4 U/ml

Ejemplo 6

Efecto del pH en la estabilidad de diferentes fosfatasas.

Se investigó la estabilidad del pH de las fosfatasas alcalinas expresadas transitoriamente en células HEK293. Se analizó un rango de pH de 4.0-9.0 utilizando 5 diferentes reguladores 0.1M (acetato de sodio, MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), ácido MOPS (3-N-morfolino)propanosulfónico), Tris(2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) y glicina) ajustados en su pH específico a 25°C. Se usó BiAP estabilizado con 1% de manitol como referencia. Las soluciones de fosfatasa alcalina se diluyeron en los reguladores respectivos hasta aproximadamente 100 U/ml, se almacenaron durante 24 h a temperatura ambiente y se determinó la actividad enzimática usando el ensayo de actividad de fosfatasa de pNPP como se describió anteriormente.

Ejemplo 7

Efecto del zinc en la expresión de las diferentes fosfatasas.

Se investigó la influencia de diferentes sales de zinc sobre la actividad de fosfatasas alcalinas expresadas transitoriamente en células HEK293 usando transfecciones a pequeña escala en medio de cultivo suplementado con MgCl₂ 1 mM + sal de Zinc 0.1 mM (ZnCl₂ o ZnSO₄ o ZnAc₂). Las células HEK293 se transfectaron con shIAP, shPLAP, Xinlap (ALPcat/ALPPcorona) y sALPP-ALPI-CD (catALPP/coronaALPI) y en t=144 h se tomaron muestras y se analizaron para determinar su actividad enzimática utilizando el ensayo de actividad de fosfatasa pNPP como se describió anteriormente.

Ejemplo 8

Efecto del zinc en la estabilidad de las diferentes fosfatasas.

Se prepararon soluciones que contenían aproximadamente 20 U/ml de diferentes isoformas (recombinantes) de fosfatasa alcalina en presencia o ausencia de 100 µM de ZnCl₂ para la prueba de estabilidad de la temperatura. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente, 37°C y 56°C y se determinó la actividad enzimática (pNPP) a t=0, 2 h y 24 h usando el ensayo de actividad de fosfatasa de pNPP como se describe anteriormente.

Ejemplo 9

Generación de proteínas de fusión y mutantes de fosfatasa alcalina.

Para seleccionar un sistema de expresión adecuado, el ADNc del intestino humano (hIAP) y de la placenta humana (hPLAP), que codifica las proteínas maduras, con o sin la secuencia de anclaje de GPI, se clonaron en varios vectores. Después de infecciones a pequeña escala, el vector de expresión utilizado fue dirigido por CMV, contenía la secuencia de señalización de cistatina y albergaba la etiqueta HIS N-terminal para facilitar la purificación. Después de expresar con éxito tanto hIAP como hPLAP secretables, se construyeron dos fosfatasas alcalinas secretables humanas de fusión en silico, una basada en la estructura de AP intestinal que contiene el dominio de corona de placenta (aa 360-430 de la secuencia madura) y la segunda basada en la estructura de la AP placentaria con el

dominio de corona de la AP intestinal (la primera se denomina RecAP o ALPIcat/ALPPcorona y la segunda se denomina shPLAP-shIAP-CD o catALPP/coronaALPI). Los dos genes se sintetizaron conteniendo la secuencia de señalización de cistatina humana y se clonaron en el vector de expresión que contenía el promotor de CMV.

5 Ejemplo 10

Efecto del ancla GPI sobre la actividad específica de la fosfatasa

10 Se produjeron varias formas recombinantes de AP, se purificaron y se evaluaron para determinar la actividad enzimática usando el ensayo de actividad de fosfatasa de pNPP como se describió anteriormente. Además, la cantidad de proteína en las muestras se midió usando SDS-PAGE y el software GelEval. La actividad específica se calculó dividiendo la actividad (U/ml) por la concentración de proteína (mg/ml) y se expresó como U/mg.

15 Parte experimental

Resultados

Ejemplo 1

20 Desfosforilación del sustrato de ATP biológicamente activo por diferentes fosfatasas

25 Se incubó ATP a una concentración final de 20 μ M con diferentes concentraciones de BIAP, sALPP, sALPI o la quimera ALPIcat/ALPPcorona. De la Tabla 9, es obvio que la actividad química de pNPP no está relacionada con la actividad hacia un sustrato biológico 1:1, por ejemplo ATP. Mientras BIAP y sALPI muestran más del 50% de desfosforilación de ATP después de 90 minutos a 37°C a concentraciones de pNPP de 0.031 y 0.004 unidades, respectivamente, ALPP y catALPP/ALPPcorona solo pueden desfosforilar esta cantidad en concentraciones de unidades de pNPP de 0.125 y 0.0625, respectivamente.

30 Ejemplo 2

Ensayo de corte hepático usando diferentes isoformas de fosfatasa alcalina

35 Tras la estimulación con LPS (10 μ g/ml), las secciones de hígado producen NOx. La Figura 6 muestra que en presencia de diferentes fosfatasas alcalinas humanas recombinantes (sALPI, sALPP, ALPI ancladas a GPI, ALPIcat/ALPPcorona) a diferentes concentraciones, la producción de NOx se inhibió significativamente. En este experimento, se utilizó ALPI derivado de bovino como control positivo y disolvente como control negativo.

40 Sin la adición de LPS, la producción de NOx por las secciones de hígado fue menor que 10 μ M y no se alteró significativamente por la presencia de las diferentes fosfatasas durante la incubación (datos no mostrados). A partir de esto, se concluye que todas las isoformas recombinantes ensayadas de fosfatasas alcalinas humanas, independientemente de la presencia de un anclaje de GPI, tienen actividad hacia un sustrato biológico que está implicado en la producción de NOx inducida por LPS.

45 Ejemplo 3

Efecto biológico de la desfosforilación de ATP extracelular

50 La producción de IL-6 por células RAW264.7 tras la incubación con sobrenadante de T84 fue dependiente de LPS. Sin LPS (Figura 2), se produjeron niveles bajos de IL-6. El ATP y la AP no pueden alterar los niveles de IL-6 producidos por las células RAW264.7. Por el contrario, cuando estaba presente LPS, la producción de IL-6 por RAW264.7 incubado con sobrenadante de T84 aumentaba con concentraciones crecientes de ATP. Este aumento en la producción de citoquinas por el ATP podría verse completamente disminuido por concentraciones de AP de 0.1 U/ml y superiores (Figura 3).

55 Se obtuvieron resultados similares (no mostrados) para TNF α usando el mismo protocolo y para TNF α e IL-6 usando HT29 en lugar de T84 como fuente de células epiteliales.

60 Se concluye que AP desfosforila el ATP y por lo tanto disminuye su efecto potenciador de LPS. Es poco probable que AP desfosforile LPS ya que no se observó ningún efecto de AP en LPS. La combinación de ATP y LPS solo podría reducirse mediante AP a niveles iguales a LPS solo.

Ejemplo 5

Determinación de la dependencia de Zn²⁺ de diferentes fosfatasas

65

Como se representa en la Figura 4 y la Tabla 7, el Zn^{2+} estabilizó significativamente la actividad específica de sALPI, mientras que sALPP y la quimera ALPIcat/ALPPcorona conservaron su actividad específica inicial independiente de la presencia de Zn^{2+} en el medio. En este experimento, el BSA, utilizado de forma rutinaria en el ensayo de actividad de fosfatasa pNPP, puede ser una fuente de trazas de Zn^{2+} . Por lo tanto, se realizó un segundo experimento. La Tabla 8 y la Figura 5 muestran que en ausencia de BSA y en presencia de EDTA quelante con pérdida de Zn^{2+} , todas las isoformas pierden su actividad específica después de 22 h. Sin embargo, la adición de concentraciones fisiológicas (0.5-10 nM) de Zn^{2+} durante el almacenamiento y durante la reacción conservaron más de 60, respectivamente, el 75% de la actividad específica inicial de sALPP y ALPIcat/ALPPcorona, mientras que se perdió más del 95% de la actividad específica inicial de sALPI. Fueron necesarias concentraciones no fisiológicamente altas de Zn^{2+} para preservar la actividad específica de sALPI.

Por lo tanto, se concluye que la quimera ALPIcat/ALPPcorona muestra una actividad específica alta, comparable con la de sALPI, combinada con actividad específica independiente de Zn^{2+} , comparable con la de sALPP. Se concluye que la dependencia de Zn^{2+} se encuentra en el dominio de corona sALPI, mientras que la actividad específica alta se encuentra en el dominio catalítico sALPI.

Ejemplo 6

Efecto del pH en la estabilidad de diferentes fosfatasas.

Se diluyeron BiAP, shIAP, shPLAP, RecAP y se almacenaron en 0.1 M (acetato de sodio, MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), ácido MOPS (3-N-morfolino)propanosulfónico), Tris (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) y glicina) reguladores con valores de pH de 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0 a temperatura ambiente durante 24 h. Para cada valor de pH, la actividad enzimática inicial y la actividad enzimática después del almacenamiento se determinaron de acuerdo con el ensayo de pNPP estándar. Como se esperaba y lo indica su nombre, la actividad de la fosfatasa alcalina es óptima en el rango de pH alto (ambiente alcalino). Sin embargo, como muestra la Figura 7, el tipo de placenta es más estable que las isoformas intestinales. Además, los resultados demuestran que esta estabilidad, especialmente en el rango de pH alto, está determinada por el dominio de corona y no por el dominio catalítico, ya que ALPIcat/ALPPcorona (recAP) sigue el perfil de estabilidad de la shPLAP y es estable entre pH 5-9, mientras que la estabilidad de BIAP y shIAP está restringida a pH 7-8. Por el contrario, catALPP/coronaALPI (shPLAP-hIAP-CD) es menos estable que el tipo placentario AP y ALPIcat/ALPPcorona a pH 9. Esto demuestra que ALPIcat/ALPPcorona conserva su actividad en un rango mucho más amplio de valores de pH que las AP nativas o la quimera inversa (catALPP/coronaALPI) probadas.

Ejemplo 7

Efecto del zinc en la expresión de diferentes fosfatasas.

Usando transfecciones a pequeña escala en células HEK293, se investigó la influencia de diferentes sales de zinc sobre la actividad de las fosfatasas alcalinas expresadas transitoriamente. Para ello, se transfectaron shIAP, shPLAP, Xinlap (ALPIcat/ALPPcorona) y sALPP-ALPI-CD (catALPP/coronaALPI) y en $t=144$ h se tomaron muestras y se analizaron para determinar la actividad enzimática. Los resultados obtenidos revelaron que había una dependencia de la concentración de iones Zn^{2+} con respecto a la actividad enzimática, pero que el aumento de la actividad observada era independiente para el tipo de sal de zinc utilizada.

De los resultados presentados en la figura 8 se concluye que la actividad enzimática obtenida depende del zinc, pero que es independiente del tipo de sal de zinc que se use. Además, se demostró que la adición de zinc es más favorable para la producción de shIAP con un factor de inducción para actividad enzimática de >30 . Para sALPP y Xinlap, la mejora de la actividad fue <2 y >4 , respectivamente. La quimera inversa (sALPP-ALPI-CD, también llamada ALPPcat/ALPIcorona) mostró una actividad insignificante si se producía en ausencia de zinc, mientras que obtenía una actividad comparable con sALPP en presencia de zinc.

Además, Xinlap mostró una actividad enzimática mucho más alta sin la adición de iones de Zn/Mg que cualquiera de las otras AP analizadas (factor 5) y es menos dependiente de Zn/Mg en comparación con shIAP o la quimera inversa, ALPPcat/ALPIcorona.

Ejemplo 8

Efecto del zinc en la estabilidad de las diferentes fosfatasas.

La Figura 9 muestra el perfil de estabilidad de diferentes AP en el tiempo a diferentes temperaturas y en presencia o ausencia de $100 \mu M$ de $ZnCl_2$. De los resultados se deduce que, en ausencia de zinc, las isoformas intestinales (sALPI y BIAP) de la fosfatasa alcalina son altamente sensibles a la temperatura con respecto a la actividad de la enzima. A $37^\circ C$, la BIAP perdió el 20% de su actividad en 2 horas y después de 24 h solo queda un 20% de actividad enzimática. shIAP muestra una disminución en la actividad del 30% después de 24 horas de almacenamiento a $37^\circ C$. La Figura 9C muestra que la presencia de zinc durante la prueba de estabilidad a $37^\circ C$

protege la enzima de la degradación. Sin embargo, a 56°C, el zinc ya no protege las isoformas intestinales y ambos pierden su actividad enzimática casi por completo en las primeras 2 horas. Por el contrario, RecAP (ALP_Icat/ALPP_{corona}) y shPLAP (sALPP) muestran una excelente estabilidad en presencia o ausencia de 100 µM hasta 22 horas, incluso a 56° C.

5

Ejemplo 9

Generación de proteínas de fusión y mutantes de fosfatasa alcalina.

10 La hIAP secretable y la hPLAP secretable se expresaron en HEK293 usando un vector que contiene la secuencia de señal de cistatina dirigida por un promotor CMV y que contenía una etiqueta HIS en la parte N-terminal de la proteína. Las proteínas expresadas se purificaron a través de la etiqueta HIS y se analizaron mediante SDS PAGE (ver figura 10). El rendimiento de proteína a partir de 1 litro de cultivo en suspensión para hIAP y hPLAP secretables fue de 38 y 16 mg, respectivamente, y mostró una pureza >95%. La actividad específica de hIAP y hPLAP fue 21 y 100 U/mg, respectivamente.

15

20 Con base en estas dos fosfatasas recombinantes secretables, se diseñaron dos variantes de intercambio de dominio in silico, y se expresaron en células HEK293. Se obtuvo un resultado notable para RecAP, que consiste en un esqueleto de fosfatasa alcalina intestinal con el dominio de corona de la fosfatasa alcalina placentaria. RecAP mostró una actividad enzimática cinco veces mayor en comparación con hIAP secretable (14 U/ml frente a 2.7 U/ml) en condiciones de cultivo convencionales. Sin embargo, la adición de sal de zinc hasta 100 µM durante el cultivo celular y la expresión de fosfatasa tiene una influencia menor sobre la actividad enzimática de RecAP (18.8 U/ml frente a 14.0 U/ml sin adición de zinc), mientras que mejora significativamente la actividad de hIAP secretable (37.9 U/ml frente a 2.7 U/ml sin adición de zinc). La variante de cambio de dominio basada en el esqueleto de AP placentaria con el dominio de corona de AP intestinal (catALPP/coronaALPI) por otro lado, muestra una dependencia del zinc comparable con la forma intestinal y una actividad máxima comparable con el PLAP secretable. El aumento observado en la actividad de shIAP y catALPP/coronaALPI no se pudo lograr si se añadió zinc a la enzima después de la expresión y la purificación. Por lo tanto, se concluye que la adición de 100 µM de zinc durante la expresión de fosfatasas alcalinas, preferiblemente aquellas que comprenden un dominio de corona de la forma intestinal, da como resultado un mayor rendimiento de actividad de fosfatasa alcalina.

25

30

Ejemplo 10

Efecto del ancla GPI sobre la actividad específica de la fosfatasa

35

Se produjeron varias formas recombinantes de AP y se evaluó su actividad enzimática. Los resultados presentados en la Figura 11 demuestran que la fosfatasa alcalina intestinal bovina (BIAP) y el recAP (ALP_Icat/ALPP_{corona}) muestran una actividad específica similar que es superior a la de la hIAP secretable, la hPLAP secretable y la hIAP anclada a GPI. La pureza de la enzima es importante para la actividad enzimática específica. Por lo tanto, debe observarse que las cuatro enzimas humanas se purificaron en un laboratorio, mientras que la BIAP se obtuvo como un lote de GMP ultrapuro. Además, debe tenerse en cuenta que la hIAP secretable tiene una actividad específica que es aproximadamente 2 veces mayor que la de la hIAP anclada a GPI. Sin limitarse a la teoría, la mayor actividad específica puede estar relacionada estructuralmente o relacionada con la pureza, ya que el AP secretable se purifica más fácilmente que el AP anclado a GPI (unido a membrana).

40

45

Tablas

Tabla 1: Niveles de expresión de HEK293 (U/ml) de fosfatasas alcalinas después de t=144 h y el efecto sobre la actividad después de la incubación durante la noche con ZnCl₂ 0.1 mM

50

Constructo	Unidades/ml	Unidades/ml después de o/n con 0.1mM de ZnCl ₂
Etiqueta sALPP N-his	3.34	3.55
Etiqueta sALPP C-his	3.75	3.97
Etiqueta sALPI N-his	1.55	1.92
Etiqueta sALPI C-his	7.52	8.07
sALPI nativa	2.84	4.94

Tabla 2: Niveles de expresión de HEK 293 (U/ml) de fosfatasas alcalinas después de t=144 h y el efecto sobre la actividad de diferentes concentraciones de ZnCl₂ y/o MgCl₂ en medio de cultivo

Constructo	Actividad enzimática en unidades/ml					
	Sin adición	0.05mM Zn ²⁺	0.1mM Zn ²⁺	1mM Mg ²⁺	5mM Mg ²⁺	0.1mM Zn ²⁺ /1mM Mg ²⁺
sALPI	2.2	55.8	56.6	6.4	5.9	61.3
sALPP	6.8	8.7	8.9	6.1	5.4	7.7

Tabla 3: Niveles de expresión de HEK 293 (U/ml) de fosfatasas alcalinas quiméricas después de t=96 h y el efecto sobre la actividad de ZnCl₂ en medio de cultivo

5

Constructo	Actividad enzimática en unidades/ml	
	Sin adición	0.1mM Zn ²⁺ /1mM Mg ²⁺
ALPIcat/ALPPcorona	3.72	2.43

Tabla 4: Sitios de mutaciones en ALPP con cambios de aminoácidos propuestos

Nombre	Posición en ALPP maduro				Nombre Alternativo
	44	87	93	429	
wt	M	K	G	E	-
mut 1	L				M44L
mut 2		R			K87R
mut 3			A		G93A
mut 4				S	E429S
mut 5	L	R			M44L, K87R
mut 6	L		A		M44L, G93A
mut 7	L			S	M44L, E429S
mut 8		R	A		K87R, G93A
mut 9		R		S	K87R, E429S
mut 10			A	S	G93A, E429S
mut 11	L	R	A		M44L, K87R, G93A
mut 12	L	R		S	M44L, K87R, E429S
mut 13	L		A	S	M44L, G93A, E429S
mut 14		R	A	S	K87R, G93A, E429S
mut 15	L	R	A	S	M44L, K87R, G93A, E429S

10

Tabla 5: Sitios de mutación en ALPI con cambios de aminoácidos propuestos

Nombre	Posición en ALPP maduro				Nombre Alternativo
	44	87	93	429	
wt	L	R	A	S	-
mut 16	M				L44M
mut 17		K			R87K

ES 2 656 405 T3

Posición en ALPP maduro					
mut 18			G		A93G
mut 19				E	S429E
mut 20	M	K			L44M, R87K
mut 21	M		G		L44M, A93G
mut 22	M			E	L44M, S429E
mut 23		K	G		R87K,A93G
mut 24		K		E	R87K,S429E
mut 25			G	E	A93G,S429E
mut 26	M	K	G		L44M, R87K, A93G
mut 27	M	K		E	L44M, R87K, S429E
mut 28	M		G	E	L44M, A93G, S429E
mut 29		K	G	E	R87K, A93G, S429E
mut 30	M	K	G	E	L44M, R87K, A93G, S429E

Tabla 6: Mutaciones dobles propuestas en ALPP y ALPI en las proximidades del sitio activo

Mutantes adicionales		
mut 31	ALPP	S322G, R323V
mut 32	ALPI	G322S, V323R

5. Tabla 7: sALPI, pero no sALPP y la quimera ALPIcat/ALPPcorona es dependiente de Zn^{2+} para retener su actividad específica in vitro.

sALPP	T= 0	T= 1½ h	T= 3 h	T= 22 h
Zn^{2+} 0 ^a μ M	122	103	105	100
Zn^{2+} 10 μ M	162	123	117	110
Zn^{2+} 100 μ M	131	128	150	132
Zn^{2+} 1000 μ M	126	135	125	114
sALPI	T= 0	T= 1½ h	T= 3 h	T= 22 h
Zn^{2+} 0 μ M	650	500	413	116
Zn^{2+} 10 μ M	717	648	953	746
Zn^{2+} 100 μ M	785	733	868	750
Zn^{2+} 1000 μ M	752	762	770	989
ALPIcat/ALPPcorona	T= 0	T= 1½ h	T= 3 h	T= 22 h
Zn^{2+} 0 μ M	426	407	455	429
Zn^{2+} 10 μ M	443	500	479	462
Zn^{2+} 100 μ M	543	560	456	442
Zn^{2+} 1000 μ M	452	452	441	465

^a Sin adición de sal de Zn, sin embargo, el ensayo se realizó en presencia de albúmina (0.05%), que tal vez sea una fuente natural de zinc; véase la sección de resultados.

Tabla 8: La actividad específica de sALPI disminuye en más de 95% después de 22 h a concentraciones fisiológicas (0.01 μM) de Zn^{2+} en ausencia de albúmina, mientras que sALPP y la quimera ALPIcat/ALPPcorona retienen más de 60, respectivamente 75% de su actividad inicial específica bajo las mismas condiciones.

5

sALPP	T= 0	T= 1½ h	T= 3 h	T= 22 h
0 Zn + EDTA 100 mM	29	0	0	0
Zn^{2+} 0.01 μM	123	74	76	78
Zn^{2+} 10 μM	131	94	88	92
Zn^{2+} 1000 μM	118	6	6	3
sALPI	T= 0	T= 1½ h	T= 3 h	T= 22 h
0 Zn + EDTA 100 mM	290	4	10	0
Zn^{2+} 0.01 μM	693	384	211	31
Zn^{2+} 10 μM	785	541	386	324
Zn^{2+} 1000 μM	737	505	382	232
ALPIcat/ALPPcorona	T= 0	T= 1½ h	T= 3 h	T= 22 h
0 Zn + EDTA 100 mM	161	8	5	0
Zn^{2+} 0.01 μM	330	374	316	252
Zn^{2+} 10 μM	543	386	315	266
Zn^{2+} 1000 μM	531	306	299	196

Tabla 9: Propiedades de desfosforilación de diferentes fosfatasa alcalinas hacia el sustrato biológico ATP.

Curva estándar		Unidades pNPP	BiAP		sALPP		sALPI		ALPIcat/ALPPcorona	
ATP (μM)	LFI		LFI	ATP (μM)	LFI	ATP (μM)	LFI	ATP (μM)	LFI	ATP (μM)
20.000	38845	0.5000	761	0.25	2273	1.01	213	0	530	0.13
10.000	20978	0.2500	390	0.06	7490	3.67	18	0	2366	1.06
5.000	10902	0.1250	1481	0.61	13633	6.79	24	0	7650	3.75
2.500	5714	0.0625	4893	2.35	21124	10.60	286	0.00	15642	7.81
1.250	2811	0.0313	11008	5.46	24450	12.29	707	0.22	22061	11.07
0.625	1422	0.0156	20401	10.23	31233	15.74	3762	1.77	30911	15.57
0.313	656	0.0078	24100	12.11	32382	16.32	9431	4.65	34178	17.23
0.156	342	0.0039	30479	15.35	37546	18.95	16197	8.09	37735	19.04
0.078	163	0.0020	36232	18.28	38418	19.39	22571	11.33	39841	20.11
0.039	80	0.0010	34902	17.60	40772	20.59	21065	10.57	40324	20.36
0.020	40	0.0005	39927	20.16	37848	19.10	34216	17.25	41683	21.05

ES 2 656 405 T3

Curva estándar		Unidades pNPP	BiAP		sALPP		sALPI		ALPIcat/ALPPcorona	
ATP (μM)	LFI		LFI	ATP (μM)	LFI	ATP (μM)	LFI	ATP (μM)	LFI	ATP (μM)
0.000	4	0	41929	21.17	41299	20.85	41242	20.83	40177	20.28
coeficiente corr. = 0.9981										
ecuación: $y=1967.1x + 275.9$										

Tabla 10

Lista no limitante de enfermedades inflamatorias y órganos afectados

Inflamación	Parte del cuerpo
Apendicitis	Apéndice
Arteritis	Arterias
Artritis	Articulación
Blefaritis	Párpados
Bronquiolitis	Bronquiolos
Bronquitis	Bronquios
Bursitis	Bursa
Cervicitis	Cérvix
Colangitis	Conducto biliar
Colecistitis	Vesícula biliar
Corioamnionitis	corion y amnion (saco amniótico)
Colitis	Colon
Conjuntivitis	Conjuntiva
Cistitis	Vejiga
dacrioadenitis	Glándula lacrimal
Dermatitis	Piel
Dermatomiositis	Piel y músculos
Encefalitis	Cerebro
Endocarditis	Endocardio
Endometritis	Endometrio

Inflamación	Parte del cuerpo
Enteritis	Intestino delgado
Enterocolitis	Intestino delgado e Intestino grueso
Epicondilitis	Epicóndilo
Epididimitis	Epidídimo
Fascitis	Fascia
Fibrositis	Tejido fibroso conectivo
Gastritis	Estómago
Gastroenteritis	Estómago e intestino delgado
Gingivitis	Gíngiva
Glositis	Lengua
Hepatitis	Hígado
Hidradenitis supurativa	Glándula sudorípara apocrina
Ileitis	Íleon
Iritis	Iris
Laringitis	Laringe
Mastitis	Glándula mamaria
Meningitis	Meninges
Mielitis	médula espinal
Miocarditis	Miocardio
Miositis	Músculo
Nefritis	Riñón
Onfalitis	Cordón umbilical
Ooforitis	Ovarios
Orquitis	Testículo
Osteítis	Hueso
Otitis	Oído
Pancreatitis	Páncreas
Parotitis	Glándula parótida

Inflamación	Parte del cuerpo
Pericarditis	Pericardio
Peritonitis	Peritoneo
Faringitis	Faringe
Pleuritis	Pleura
Flebitis	Venas
Neumonitis	Pulmones (también neumonía)
Proctitis	Recto
Prostatitis	Próstata
pielonefritis	Riñón
Rinitis	revestimiento nasal
Salpingitis	trompas de Falopio
Sinusitis	Seno del cráneo
Estomatitis	Boca
Sinovitis	Membrana sinovial
Tendinitis	Tendón
Amigdalitis	Amígdalas
Uveitis	Uvea
Uretritis	Uretra
Vaginitis	Mucosa vaginal
Vasculitis	Vasos sanguíneos y vasos linfáticos
Vulvitis	Vulva

Descripción de las figuras

Figura 1

5 Secuencias de las cuatro isoenzimas de fosfatasa alcalina humana. Nota: estas son las secuencias de las proteínas maduras (es decir, sin secuencia señalización) pero antes de la adición del ancla de GPI y el procesamiento concomitante de los aminoácidos C-terminales con la excepción de las AP quiméricas

10 Figura 2

TP solo no es suficiente para estimular la producción de IL-6 en células RAW tras la incubación con sobrenadante de T84. No se observa ningún efecto sobre la producción de IL-6 al agregar AP

15 Figura 3

El aumento de las concentraciones de ATP amplifica la producción de IL-6 inducida por LPS en células RAW tras la incubación con sobrenadante de T84. La fosfatasa alcalina inhibe el efecto amplificador del ATP, pero no la producción de IL-6 inducida por LPS.

- 5 Figura 4
La actividad específica de ALPIcat/ALPPcorona es independiente de Zn
- 10 Figura 5
La actividad específica de ALPI pero no ALPIcat/ALPPcorona disminuye en el tiempo
- 15 Figura 6
La producción de NOx inducida por LPS por cortes de hígado es inhibida por diferentes isoformas secretables de fosfatasa alcalina humana
- 20 Figura 7
actividades enzimáticas relativas de diferentes fosfatasas alcalinas recombinantes humanas secretables y fosfatasa intestinal bovina (BIAP) almacenadas durante 24 h en reguladores 0.1M de diferentes valores de pH.
- 25 Figura 8
Influencia de diferentes sales de zinc añadidas al medio de cultivo durante la producción de diferentes fosfatasas alcalinas recombinantes en la actividad enzimática.
- 30 Figura 9
Estabilidad de la actividad enzimática de diferentes fosfatasas alcalinas determinadas después del almacenamiento en presencia de zinc a: A temperatura ambiente, C 37°C y E 56°C o en ausencia de zinc a B temperatura ambiente, D 37°C y F 56°C
- 35 Figura 10
SDS-PAGE: perfil de proteína de hIAP secretable purificada y hPLAP secretable. Carril 1) marcador MW, 4+5) hIAP secretable 10 y 25 veces diluida, 12+13) hPLAP secretable 10 y 25 veces diluida.
- 40 Figura 11
Actividades enzimáticas específicas de 4 AP humanas y una bovina contra para-nitrofenilfosfato (pNPP), el sustrato químico estándar para la determinación de la actividad AP.

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una fosfatasa alcalina aislada o recombinante que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, en la que dicho dominio de corona es el dominio de corona de una fosfatasa alcalina placentaria (ALPP) y en la que dicho dominio catalítico es el dominio catalítico de una fosfatasa alcalina intestinal (ALPI).
2. Una fosfatasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos una de dichas fosfatasas es una fosfatasa humana.
- 10 3. Una fosfatasa aislada o recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende una mutación en las proximidades de un residuo catalítico y/o en un bolsillo de unión a fosfato coordinador con iones metálicos, en la que dicha mutación es una mutación como se representa en la Tabla 4, 5 o 6.
- 15 4. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una fosfatasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4.
- 20 6. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 o un vector de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Un método para producir una fosfatasa como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende cultivar una célula huésped, preferiblemente una célula de mamífero, capaz de expresar dicha fosfatasa en un medio que comprende Zn^{2+} y permitir que la célula produzca dicha fosfatasa.
- 25 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además aislar dicha fosfatasa.
9. Una composición farmacéutica que comprende una fosfatasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 30 10. Uso de una fosfatasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de sepsis, enfermedad inflamatoria del intestino, inflamación del revestimiento epitelial del intestino y/u otra enfermedad inflamatoria, y/o insuficiencia renal.
- 35 11. Uso de una fosfatasa de acuerdo con la reivindicación 1 para la desfosforilación in vitro de un sustrato, preferiblemente un fosfato de adenosina, en un entorno que comprende una concentración de Zn^{2+} inferior a $10 \mu M$, preferiblemente una concentración de Zn^{2+} inferior a $1 \mu M$, más preferiblemente una concentración de Zn^{2+} menor que $0.1 \mu M$.
- 40 12. Una fosfatasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso como medicamento, preferiblemente para el tratamiento de sepsis, enfermedad inflamatoria del intestino, inflamación del revestimiento epitelial del intestino y/u otra enfermedad inflamatoria y/o insuficiencia renal.

Fig. 1

NP_001623 ALPP (Placenta)

1 IIPVEEENPDFWNRQAAEALGAAKKLQPAQTAANKLII FLGDGMGVSTVTAARILKGQKK 60
 61 DKLGPETPLAMDRFPYVALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQITIGLSAAARFNQ 120
 121 CNTTRGNEVISVMNRRAKAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADVPASARQ 180
 181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAK 240
 241 HQGARYVWNRTELMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDPPLMEMTEAALRLLS 300
 301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGSRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTLTADHSH 360
 361 VFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYR 420
 421 QOSAVPLDEETHAGEDVAVFARGPQAHVHGQVQEQTFIAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
 481 GTTDAAHPRGSVVPALLPLLAGTLLLLLETATAP 513

AAI32679 ALPI (Intestinal)

1 VIPAEENPAFWNRQAAEALDAAKKLQPIQKVAKNLILFLGDGLGVPTVTATRILKGQKN 60
 61 GKLGPETPLAMDRFPYLALSKTYNVDRQVPSAATATAYLCGVKANFQITIGLSAAARFNQ 120
 121 CNTTRGNEVISVMNRRAKQAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADMPASARQ 180
 181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPADASQNGIRLDGKNLVQEWLAK 240
 241 HQGARYVWNRTELMQASLDQSVTHLMGLFEPGDTKYEIHRDPTLDPPLMEMTEAALRLLS 300
 301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGVAYQALTEAVMFDDAIERAGQLTSEEDTLTADHSH 360
 361 VFSFGGYTLRGSSIFGLAPSKAQDSKAYTSILYGNGPGYVFNQSGVPRPDVNESESGSPDYQ 420
 421 QQAAVPLSSETHGGEDVAVFARGPQAHVHGQVQEQSFVAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
 481 CTTDAAHVPAASLPLLAGTLLLLGASAAP 509

P10696 GCAP (Célula germinal o similar a placenta)

1 IIPVEEENPDFWNRQAAEALGAAKKLQPAQTAANKLII FLGDGMGVSTVTAARILKGQKK 60
 61 DKLGPETPLAMDRFPYVALSKTYSVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQITIGLSAAARFNQ 120
 121 CNTTRGNEVISVMNRRAKAGKSVGVVTTTRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSADVPASARQ 180
 181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAK 240
 241 HQGARYVWNRTELLQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDPPLMEMTEAALLLS 300
 301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGSRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTLTADHSH 360
 361 VFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYR 420
 421 QOSAVPLDGETHAGEDVAVFARGPQAHVHGQVQEQTFIAHVMAFAACLEPYTACDLAPRA 480
 481 GTTDAAHGPSVVPALLPLLAGTLLLLGTATAP 513

AAI10910 (Tejido no específico)

1 LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTAARILKGQL 60
 61 HHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAATERS 120
 121 RCNTTQONEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHADRWDYSDNEMPPEAL 180
 181 SQGCKDIAYQLMHNIRIDVIMGGGRKYMYPKNKTDVEYESDEKARGTRLDGLDLVDTWK 240
 241 SFKPRHKHSHFIWNRTELLTDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRRNVTDPSLSEMVVVAI 300
 301 QILRNPKGFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSEEDTLTVVTA 360
 361 DHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPMLSDTDKPKPFTAILYGNGPGYKVVGGGERENVSMVDYA 420
 421 HNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMAHLLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGH 480
 481 APASSAGSLAAGPLLLALALYPLSVLF 507

Fig. 1 continuación

ALPI que puede ser segregado con dominio Crown de PLAP (químico)

```

1 VIPAEENPAFWNRQAAEALDAAKLLQPIQKVAKNLILFLGDGLGVPTVTATRILKGQKN 60
61 GKLGPETPLAMDRFPYLALSKTYNVDRQVPDSAAATATAYLCGVKANFQTI GLSAAARFNQ 120
121 CNTTRGNEVISVMNRAKQAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADAMPASARQ 180
181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFPMPGTPDPEYPADASQNGIRLDGKNLVQEWLAK 240
241 HQGAWYVWNRTELMQASLDQSVTHLMGLFEPGDTKYEIHRDPTLDPSLMEATEAALRLLS 300
301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGVAYQALTEAVMFDDAIERAGQLTSEEDTLTLVTADHSH 360
361 VFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYR 420
421 QSAVPLDEETHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQSFAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
481 CTTD 484
    
```

ALPP que puede ser segregado con dominio Crown de ALPI (químico)

```

1 IIPVEEENPDFWNRQAAEALGAACKLQPAQTAAKNLIIFLDGDMGVSTVTAARILKGQKK 60
61 DKLGPETPLAMDRFPYVALSKTYNVDRQVPDSAAATATAYLCGVKANFQTI GLSAAARFNQ 120
121 CNTTRGNEVISVMNRAKQAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADVPASARQ 180
181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTDPPEYRDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAK 240
241 RQGARYVWNRTELMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEATEAALRLLS 300
301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHESRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTLTLVTADHSH 360
361 VFSFGGYTLRGSSIFGLAPSKAQDSKAYTSILYNGNGPGYVFNNGVVRPDVNESESGSPDYQ 420
421 QAAVPLSSETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
481 GTTD 484
    
```

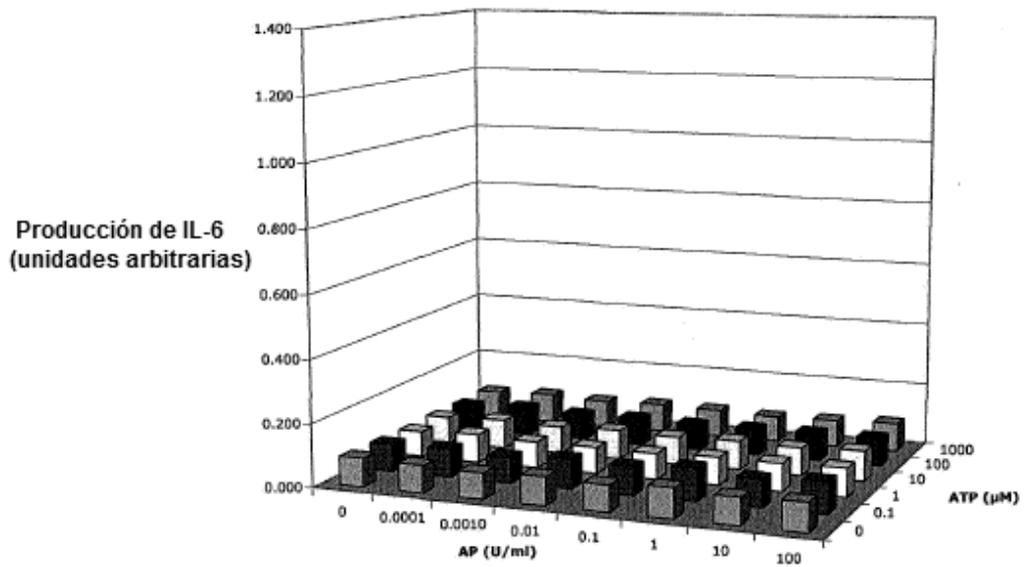


Fig. 2

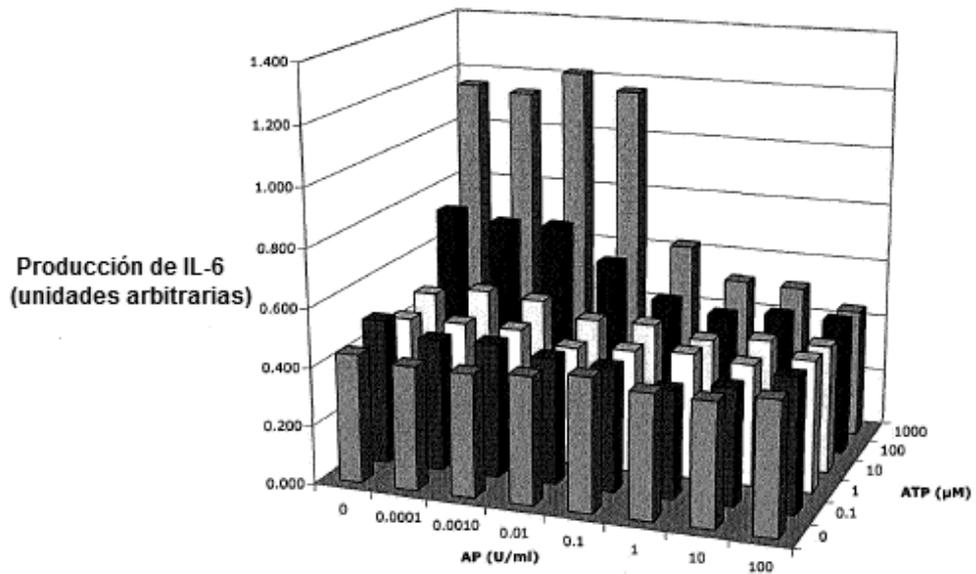


Fig. 3

Fig. 4 Actividad específica de catALPI/ALPPcorona es independiente de Zn

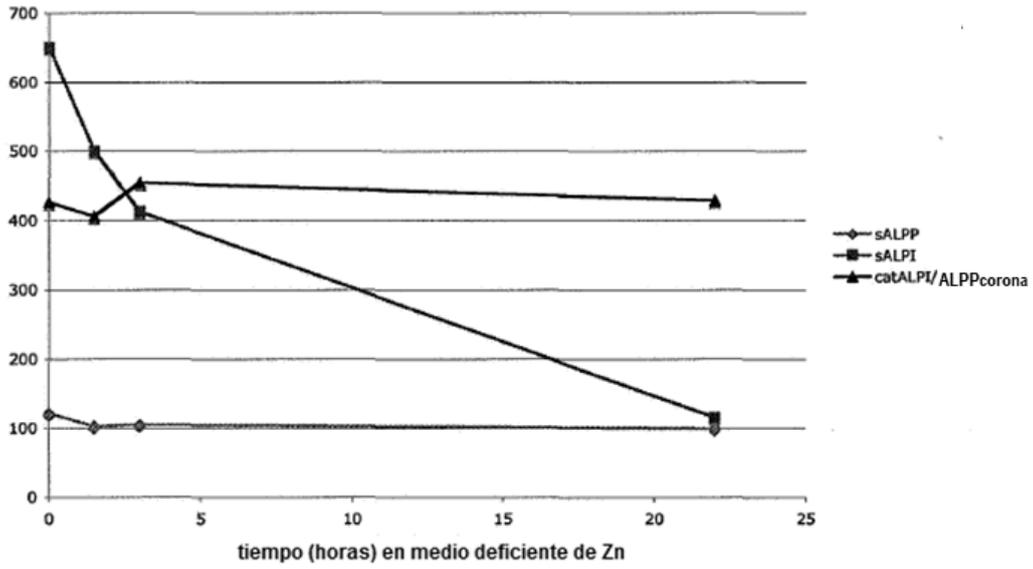


Fig. 5 Actividad específica de ALPI pero no disminuye en el tiempo catALPI/ALPPcorona

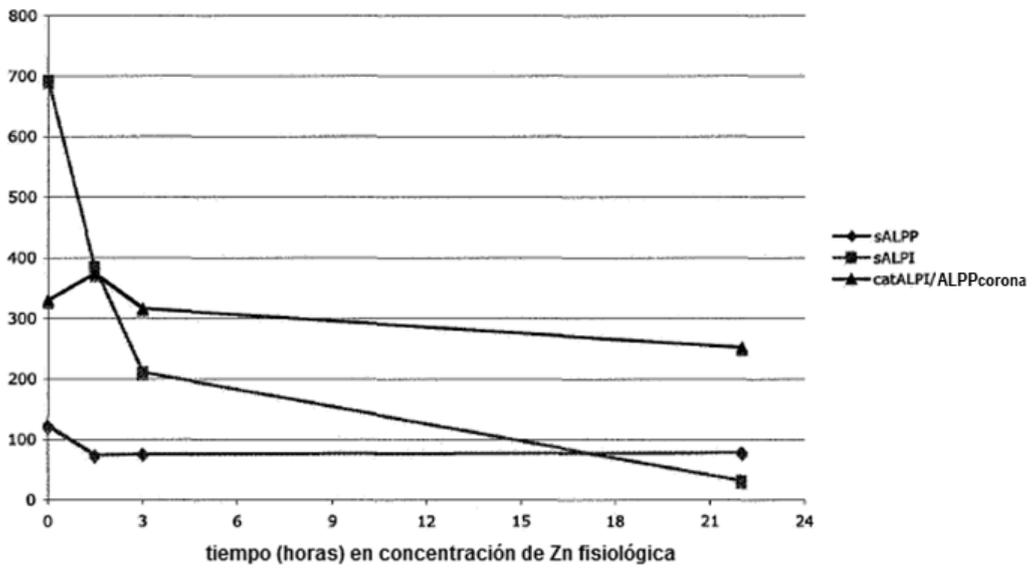


Fig. 6 Ensayo en porción de hígado

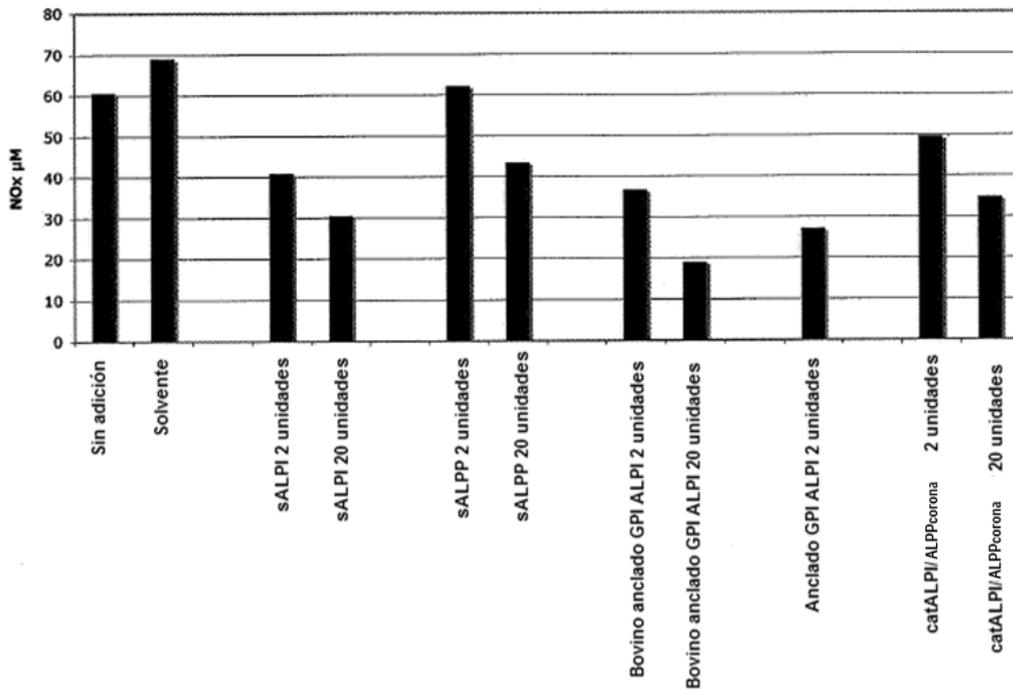


Figura 7

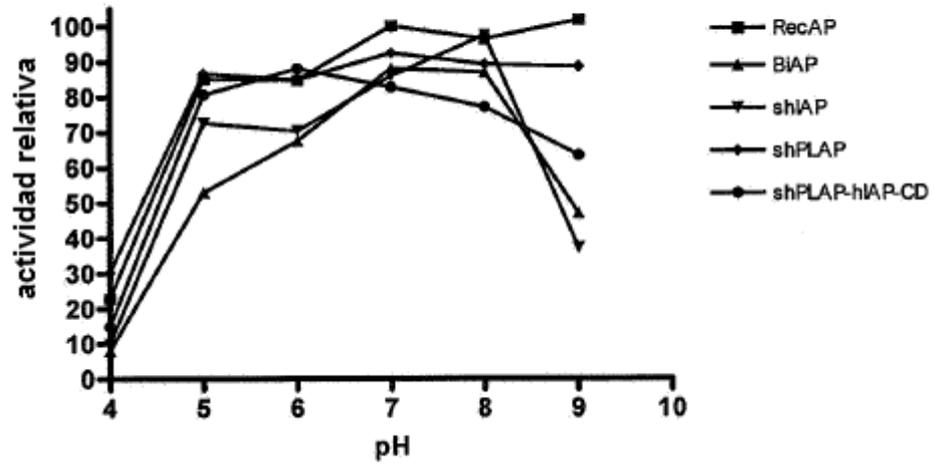


Figura 8

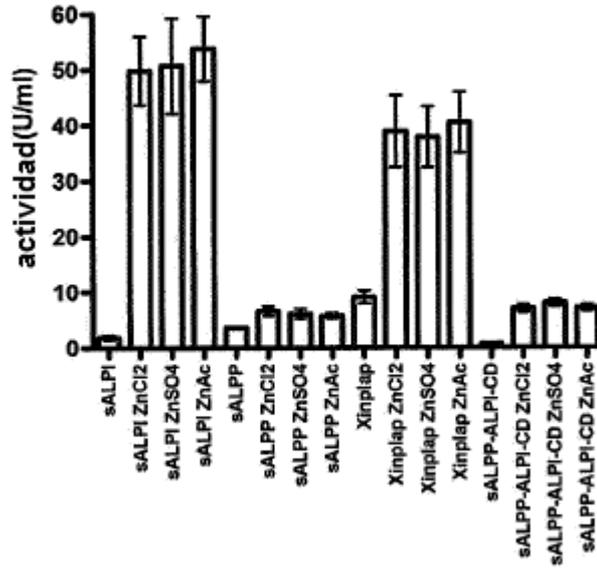
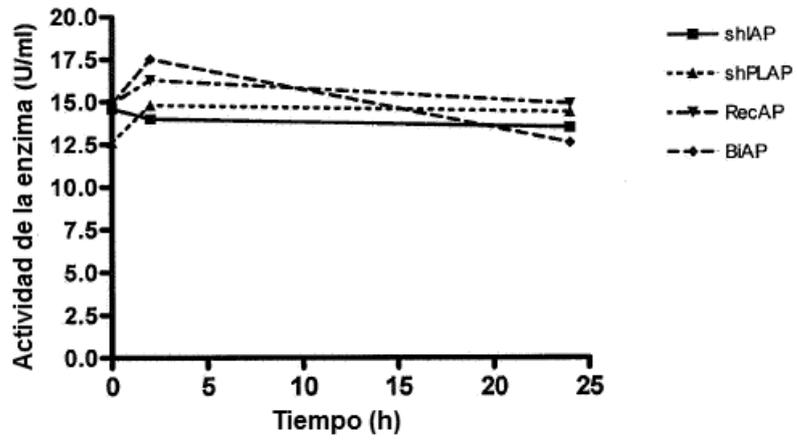
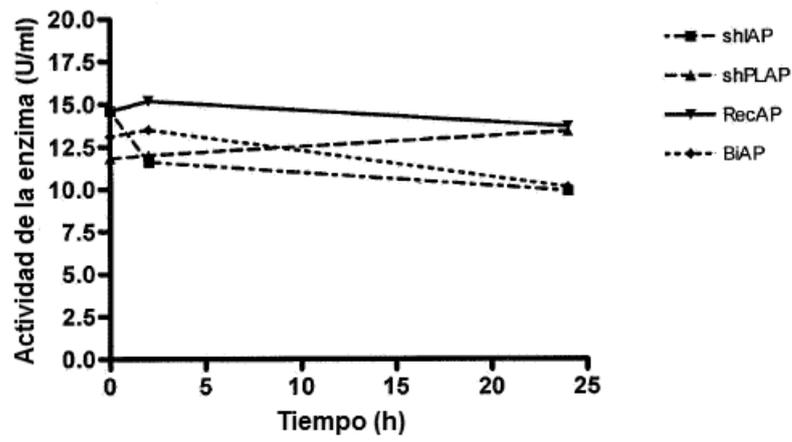


Figura 9

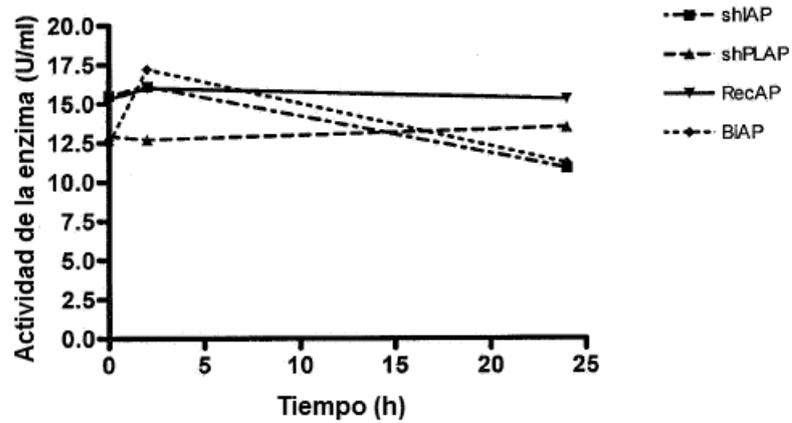
A Temperatura ambiente con Zn^{2+}



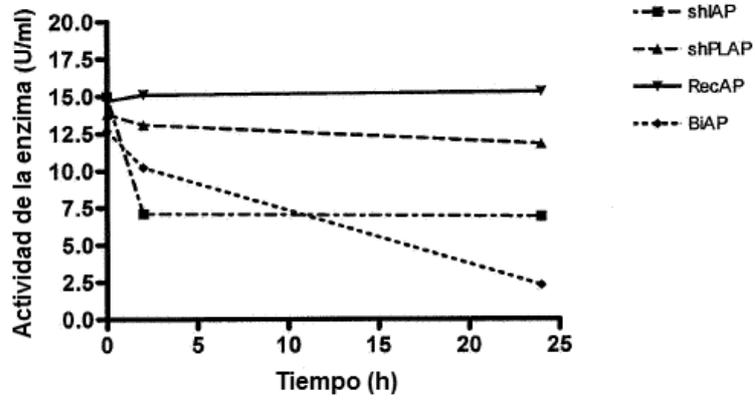
B Temperatura ambiente sin Zn^{2+}



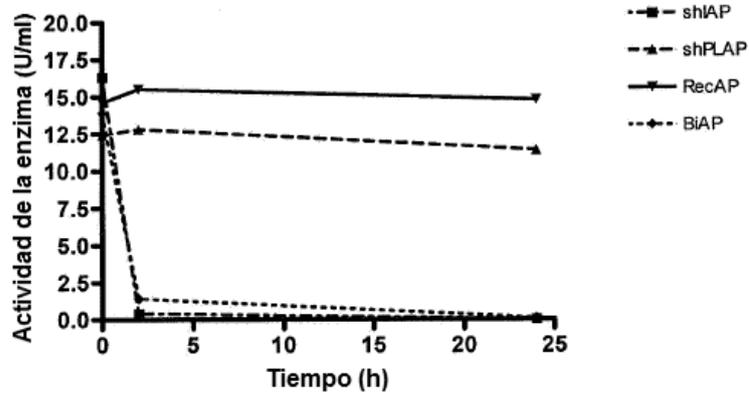
C 37°C con Zn^{2+}



D 37°C sin Zn²⁺



E 56°C con Zn²⁺



F 56° sin Zn²⁺

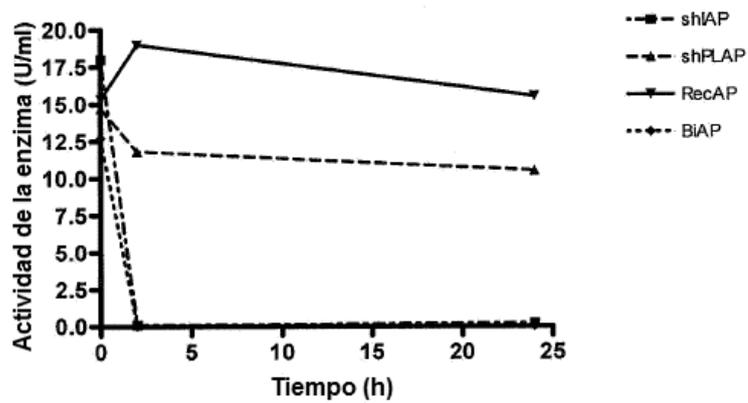


Figura 10

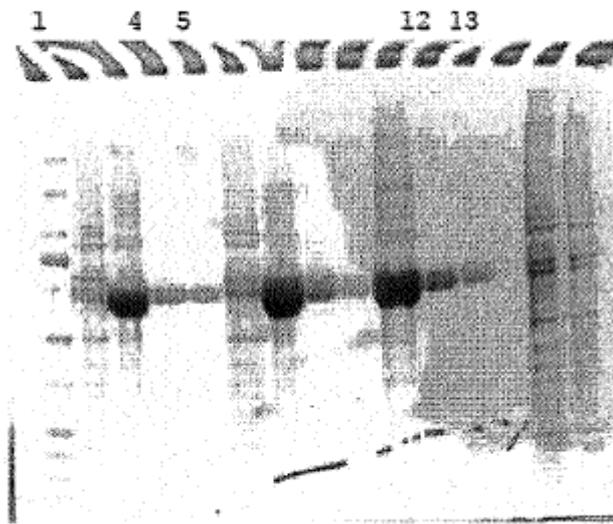


Figura 11

