

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 639**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2015** **PCT/NL2015/050048**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015** **WO15112017**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2015** **E 15703642 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018** **EP 3097189**

54 Título: **Proteínas quiméricas del tipo de la fosfatasa alcalina**

30 Prioridad:

24.01.2014 EP 14152526

08.10.2014 EP 14188158

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2018

73 Titular/es:

AM-PHARMA B.V. (100.0%)

Rumpsterweg 6

3981 AK Bunnik, NL

72 Inventor/es:

RAABEN, WILLEM;

JONK, LUIGI JOHANNES CORNELIUS;

VAN DEN BERG, ERIK JAN;

VAN ELSAS, ANDREA y

MILLÁN, JOSÉ LUIS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 684 639 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

Proteínas quiméricas del tipo de la fosfatasa alcalina

5 La invención se refiere a fosfatasas alcalinas con propiedades mejoradas, a composiciones farmacéuticas que comprenden fosfatasas alcalinas con propiedades mejoradas y al uso de fosfatasas alcalinas con propiedades mejoradas para prevenir, tratar o curar enfermedades.

10 Una fosfatasa es una enzima que desfosforila sus sustratos; 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 fosfatasas se pueden categorizar en dos categorías principales: fosfatasas dependientes de cisteína (CDP) y metalofosfatasas.

15 Las metalofosfatasas típicamente coordinan 2 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 podrían ser magnesio, manganeso, hierro, zinc o cualquier combinación de los mismos. Se cree que un ion hidroxilo que sirve de puente entre los dos iones metálicos participa en el ataque nucleofílico al grupo fosfato.

20 Las fosfatasas actúan en oposición a las quinasas/fosforilasas, que añaden grupos fosfato a las proteínas. La adición o eliminación de un grupo fosfato puede activar o desactivar una enzima (por ejemplo, rutas de señalización de quinasas) o permiten que se produzca una interacción proteína-proteína (por ejemplo, dominios SH3); por lo tanto, las fosfatasas 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. CDK, por ejemplo, puede activarse o desactivarse dependiendo del residuo de aminoácido específico que se fosforila. Los fosfatos 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 fosfatasas.

30 Un tipo de fosfatasa, la fosfatasa alcalina (ALP o AP) (EC 3.1.3.1), es una enzima hidrolasa responsable de eliminar los grupos fosfato de muchos tipos de moléculas, que incluyen, por ejemplo, nucleótidos, proteínas y alcaloides. Hasta hace poco, se pensaba que las fosfatasas alcalinas eran más efectivas en un ambiente alcalino, como su nombre indica.

35 Se cree en la técnica que un posible papel fisiológico de AP puede ser que interactúa con moléculas inflamatorias. Primero se había postulado que AP desfosforila las endotoxinas y, como tal, reduce la respuesta inflamatoria a estas moléculas altamente inflamatorias. Desde entonces, otros mecanismos de acción han sido postulados y buscados. Sin embargo, hasta ahora, a pesar de su papel beneficioso en una multitud de enfermedades inflamatorias y de otro tipo, el mecanismo de acción aún no se ha dilucidado por completo. En el pasado, la fosfatasa alcalina de origen bovino se ha utilizado en modelos animales y ensayos clínicos para el tratamiento, por ejemplo, de sepsis, lesión renal aguda, enfermedad inflamatoria del intestino, enterocolitis, daño por reperfusión isquémica u otras enfermedades inflamatorias (Riggle et al., J Surg Res. Marzo de 2013; 180 (1): 21-6; Peters et al., J Pharmacol Exp Ther. Enero de 2013; 344 (1): 2-7; Martínez-Moya et al., Pharmacol Res. Agosto de 2012; 66 (2): 144-53; Pickkers et al., Crit Care. 23 de enero de 2012; 16 (1); Ramasamy et al., Inflamm Bowel Dis. Febrero de 2011; 17 (2): 532-42; Lukas et al., Inflamm Bowel Dis. Julio de 2010; 16 (7): 1180-6; Bol-Schoenmakers et al., Eur J Pharmacol. 10 de mayo de 2010; 633 (1-3): 71-7; Heemskerk et al., Crit Care Med. Febrero de 2009; 37 (2): 417-23; Tuin et al., Gut. Marzo de 2009; 58 (3): 379-87; Su et al., Crit Care Med. Agosto de 2006; 34 (8): 2182-7; van Veen et al., Br J Surg. Abril de 2006; 93 (4): 448-56; van Veen, Infect Immun. Julio de 2005; 73 (7): 4309-14; Verweij et al., Shock. Agosto de 2004; 22 (2): 174-9).

50 Aunque en la actualidad, están disponibles las fosfatasas alcalinas, aisladas de fuentes naturales, así como modificadas de forma recombinante, que son útiles tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de enfermedades, existe la necesidad de fosfatasas alternativas, por ejemplo, con actividad, estabilidad alterada (por ejemplo, mejorada) (por ejemplo, $T_{1/2}$ *in vivo*, o estabilidad con respecto al almacenamiento (vida útil)) o especificidad del sustrato.

55 La presente invención proporciona tales fosfatasas modificadas, que tienen propiedades mejoradas en comparación con una fosfatasa alcalina recombinante quimérica que se describe extensamente en el documento WO2008/133511.

Sumario de la invención

60 En una primera realización, la invención proporciona una proteína aislada que tiene actividad de fosfatasa alcalina, en la que dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de 365 aminoácidos consecutivos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 como se indica en la Figura 1, una secuencia de aminoácidos de al menos 65 aminoácidos consecutivos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 como se indica en la Figura 1, y una secuencia de aminoácidos de al menos 54 aminoácidos consecutivos que tienen al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 como se indica en la Figura 1, donde la proteína de longitud completa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la SEQ ID NO: 1 como se indica en la Figura 1, con la condición de que el aminoácido

en la posición 279 sea leucina (L), el aminoácido en la posición 328 sea valina (V) y el aminoácido en la posición 478 sea leucina (L).

Con el término "correspondiente a" en la presente invención, se entiende la posición particular, con respecto al aminoácido N-terminal de la proteína madura, que se designa como "posición 1". El término "correspondiente a" explícitamente no se refiere al residuo de aminoácido particular en esa posición particular.

Los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren a compuestos que comprenden aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos y pueden usarse de forma intercambiable.

Como se usa en la presente invención, cuando se menciona "secuencia de aminoácidos" se refiere a una secuencia de aminoácidos de una proteína o molécula peptídica. Se puede deducir una "secuencia de aminoácidos" a partir de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína. Sin embargo, términos tales como "polipéptido" o "proteína" no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos deducida, sino que pueden incluir modificaciones postraduccionales de las secuencias de aminoácidos deducidas, tales como eliminaciones, adiciones y modificaciones de aminoácidos, tales como glicosilaciones y adición de porciones lipídicas. Además, el uso de aminoácidos no naturales, tales como D-aminoácidos para mejorar la estabilidad o el comportamiento farmacocinético, está dentro del alcance del término "secuencia de aminoácidos", a menos que se indique lo contrario.

Preferiblemente, parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de 65 aminoácidos consecutivos, que tiene al menos un 98% de identidad de secuencia con el dominio corona de longitud completa de PLAP humana. Para el propósito de la presente invención, la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio corona de longitud completa de la secuencia de referencia de PLAP humana está subrayada en la SEQ ID NO: 3, representada en la Figura 1 y corresponde a las posiciones 366-430 en la misma.

Preferiblemente, parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de 365 aminoácidos consecutivos que tienen al menos 98% de identidad de secuencia con la región N-terminal que flanquea el dominio corona de ALPI humana. Esta región N-terminal que flanquea el dominio corona se considera una de las dos partes del dominio catalítico.

Preferiblemente, parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de 54 aminoácidos consecutivos que tiene al menos un 98% de identidad de secuencia con la región C-terminal que flanquea el dominio corona de ALPI humana. Esta región C-terminal que flanquea el dominio corona se considera la segunda de dos partes del dominio catalítico.

Para el propósito de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de la secuencia de referencia de la proteína madura ALPI humana se representa en la Figura 1 (SEQ ID NO: 2). Con el fin de determinar las regiones flanqueantes N-terminales y C-terminales, designadas ambas como el dominio catalítico, el dominio corona de ALPI humana se subraya en la presente invención.

En una realización preferida particular, la invención proporciona una proteína de acuerdo con la invención, en la que dicha proteína comprende 65 aminoácidos consecutivos, que tiene al menos un 98% de identidad de secuencia con el dominio corona de longitud completa del PLAP humana, parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de 365 aminoácidos consecutivos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la región N-terminal que flanquea el dominio corona de ALPI humana, y parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de 54 aminoácidos consecutivos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la región C-terminal que flanquea el dominio corona de ALPI humana.

Con la región flanqueante N-terminal del dominio corona se entiende un tramo de aminoácidos adyacente (es decir, preferiblemente menos de 20 aminoácidos, más preferiblemente menos de 15, más preferiblemente menos de 10, más preferiblemente menos de 5, más preferiblemente menos de 3, más preferiblemente menos de 2, lo más preferiblemente ningún aminoácido por separado) a la secuencia del dominio corona (los aminoácidos correspondientes de los mismos subrayados en la figura 1), en el lado izquierdo del dominio corona, donde el lado izquierdo se define como la parte de la cadena peptídica que porta el grupo amino (NH₂) del primer aminoácido.

Con la región flanqueante C-terminal del dominio corona se entiende un tramo de aminoácidos correspondiente a las posiciones adyacentes (es decir, menos de 20 aminoácidos, preferiblemente menos de 15, más preferiblemente menos de 10, más preferiblemente menos de 5, más preferiblemente menos de 3, más preferiblemente menos de 2, lo más preferiblemente ningún aminoácido por separado) a la secuencia del dominio corona (los aminoácidos correspondientes de los mismos subrayados en la figura 1), en el lado derecho del dominio corona, donde el lado derecho se define como la parte de la cadena peptídica que porta el grupo carboxilo alfa libre del último aminoácido.

En humanos, hasta ahora se han identificado cuatro isoformas de fosfatasa alcalina. Estas son fosfatasa alcalina intestinal (ALPI), placentaria (ALPP), similar a la placentaria (GCAP) y de hígado/hueso/riñón (o tejido no específico) (TNAP). 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 la AP parece estar involucrada en una gran cantidad de procesos fisiológicos.

- La secuencia de fosfatasa alcalinas humanas se conoce en la técnica y se puede encontrar fácilmente en las bases de datos relevantes. Para determinar el % de identidad de secuencia con el dominio corona de PLAP y el dominio catalítico de ALPI, se usan preferiblemente las respectivas secuencias de referencia. La secuencia de referencia de ALPI humana se representa como la SEQ ID NO: 2. La secuencia de referencia de ALPP humana se representa como la SEQ ID NO: 3. Dentro de esas secuencias de referencia en la Figura 1, la secuencia comúnmente conocida como dominio corona está subrayada.
- La fosfatasa alcalina placentaria se abrevia en la presente invención como ALPP o PLAP. Las abreviaturas ALPI o IAP se refieren a la fosfatasa alcalina intestinal. La fosfatasa alcalina tipo 2 placentaria se abrevia en la presente invención 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 pueden usar indistintamente en este documento.
- Desde un punto de vista conformacional, una fosfatasa alcalina consiste aproximadamente en dos dominios: un dominio corona y un dominio de sitio activo (Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology, José Luis Millan; Wiley, 2006). El dominio del sitio activo se puede dividir en partes separadas tal como el residuo catalítico y tres sitios de iones metálicos (Zn1, Zn2 y Mg3). Desde el punto de vista de la estructura primaria, está claro que el dominio corona está flanqueado por los aminoácidos que forman el dominio del 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 corona. Con referencia a SEQ ID NO: 1 que denota la secuencia de aminoácidos de una fosfatasa alcalina de acuerdo con la invención, que no limita la presente invención de ninguna manera, el dominio corona preferiblemente comprende los aminoácidos en la posición 366-430, mientras que el dominio catalítico se refiere preferiblemente a las secuencias restantes antes de la posición 366 y después de la posición 430 en las secuencias de proteína maduras como se representa en la Figura 1. La secuencia de aminoácidos de las fosfatasas alcalinas y las posiciones relativas del dominio catalítico y de la corona son conocidas por el experto en la materia (Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology, José Luis Millan, Wiley, 2006).
- En algunas realizaciones, una proteína de acuerdo con la invención comprende así una secuencia que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con el dominio corona de una ALPP humana y una secuencia que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con el dominio catalítico de una fosfatasa alcalina de intestino humano. Preferiblemente, dicha secuencia que tiene dicha identidad de secuencia con el dominio corona de ALPP está situada en una proteína de acuerdo con la invención aproximadamente en la misma posición que el dominio corona de ALPP en la proteína ALPP nativa, es decir, aproximadamente en la posición 366-430, en relación con la posición 1 como se indica en la Figura 1 (la secuencia que representa el dominio corona está subrayada).
- La secuencia que tiene identidad de secuencia con el dominio corona de ALPP preferiblemente tiene al menos 98%, lo más preferiblemente 100% de identidad de secuencia con la secuencia nativa del dominio corona de ALPP, que está representada por aminoácidos subrayados en las posiciones 366-430 en la SEQ ID NO: 3.
- El porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos, o el término "% de identidad de secuencia", se definen en la presente invención como el porcentaje de residuos en un aminoácido candidato o secuencia de ácido nucleico que es idéntico a los residuos en una secuencia de referencia después de alinear las dos secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad. En una realización preferida, el cálculo de dicho al menos porcentaje de identidad de secuencia se lleva a cabo sin introducir huecos. Los métodos y programas informáticos para la alineación son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, "Align 2" o el servicio BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).
- Preferiblemente, dicha secuencia que tiene una secuencia que es al menos idéntica en un 98% a la parte N-terminal que flanquea el dominio corona de ALPI está situada en una proteína de acuerdo con la solicitud aproximadamente en la misma posición que la parte de ALPI en la proteína ALPI nativa, es decir representada por las posiciones 1-365 en la SEQ ID NO: 1 en la Figura 1.
- Además, la secuencia que tiene identidad de secuencia con el dominio catalítico de ALPI preferiblemente tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la parte N-terminal que flanquea el dominio corona de ALPI, representada por las posiciones 1-365 en la Figura 1, SEQ ID NO: 2, con la condición de que el aminoácido en la posición 279 sea L y el aminoácido correspondiente a la posición 328 sea V. Más preferiblemente, la secuencia que tiene identidad de secuencia con esa parte N-terminal del dominio catalítico de ALPI es idéntica a la secuencia nativa del dominio catalítico de ALPI, con la excepción de que el aminoácido en la posición 279 es L y el aminoácido en la posición 328 es V.
- Preferiblemente, dicha secuencia que tiene una secuencia que es al menos 98% idéntica a la parte C-terminal que flanquea el dominio corona de ALPI está situada en una proteína de acuerdo con la invención aproximadamente en la misma posición que la parte de ALPI en la proteína ALPI nativa, es decir representada por las posiciones 431-484 en la SEQ ID NO: 1.
- La secuencia que tiene identidad de secuencia con la parte C-terminal que flanquea el dominio corona de ALPI

preferiblemente tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia C-terminal, flanqueando el dominio corona de ALPI y representada por las posiciones 431-484 en la SEQ ID NO: 2, con la condición de que el aminoácido en la posición 478 sea L. Más preferiblemente, la secuencia que tiene identidad de secuencia con esa parte C-terminal del dominio catalítico de ALPI es idéntica a la secuencia nativa del dominio catalítico de ALPI, con la excepción de que el aminoácido en la posición 478 es L.

Anteriormente, se demostró que una fosfatasa alcalina que tiene una secuencia de dominio corona que tiene identidad de secuencia con el dominio corona de ALPP y que tiene un dominio catalítico que tiene una identidad de secuencia con el dominio catalítico de ALPI (denominado en este documento catALPI/coronaALPP) retuvo su actividad específica inicial en medio bajo en Zn^{2+} . Estos resultados mostraron que la actividad in vivo es Zn^{2+} independiente. En comparación, ALPI perdió rápidamente su actividad bajo las mismas condiciones bajas de Zn^{2+} . Los inventores concluyeron que tal enzima cuya actividad es independiente de Zn^{2+} podría ser útil en enfermedades donde el agotamiento 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+} (como agente estabilizante en la fabricación) puede estar contraindicada (por ejemplo, fase aguda de la sepsis, enfermedades autoinmunes). Además de las ventajas de producción y aplicación, catALPI/coronaALPP también tenía ventajas con respecto a la estabilidad durante el almacenamiento. Las propiedades de catALPI/coronaALPP se describen en detalle en el documento WO2008/133511.

La aplicación actual muestra sorprendentemente que una proteína de acuerdo con la presente invención es incluso más estable a baja concentración de Zn^{2+} . Se muestra en la presente invención, que una modificación específica que implica tres posiciones con respecto a la secuencia catALPI/coronaALPP previamente descrita aumenta aún más la independencia de Zn^{2+} . En resumen, se ha demostrado que AP nativa, tal como ALPI, pierde su actividad enzimática en entornos con bajas concentraciones de Zn^{2+} , catALPI/coronaALPP (como se describe en el documento WO2008/133511) conserva su actividad en entornos con bajo contenido de Zn^{2+} pero pierde su actividad cuando, por ejemplo, se añaden agentes quelantes de Zn^{2+} , mientras que una proteína de acuerdo con la presente invención conserva gran parte de su actividad incluso en presencia de un quelante de zinc, tal como EDTA. Por lo tanto, en enfermedades en donde el agotamiento severo de Zn^{2+} es parte de la patología, dicha AP nativa es incapaz de desplegar su actividad enzimática en el sitio donde se cree que es el más beneficioso, por ejemplo, en el sitio de la inflamación. Por el contrario, una AP recombinante no susceptible a concentraciones muy bajas de Zn^{2+} , en particular una proteína de acuerdo con la invención conserva su actividad en un entorno con muy baja concentración de Zn^{2+} , por ejemplo, en un sitio de inflamación. Tal enzima es, por lo tanto, muy útil para el tratamiento de enfermedades que se deben a niveles bajos de Zn^{2+} o están acompañadas por ellos. Tales niveles reducidos de Zn^{2+} harían que otras fosfatasas alcalinas sean menos activas, en comparación con una proteína de acuerdo con la invención.

Varias enzimas en el cuerpo humano dependen de Zn^{2+} para su actividad y, por ejemplo, las respuestas inmunológicas son más eficaces si están presentes 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. En un individuo sano, los valores de referencia en suero de Zn^{2+} 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 . Además, la inflamación (sub)crónica, tal como la artritis reumatoide, la sepsis y la enfermedad de Crohn se presentan con deficiencia de zinc en suero. En tales entornos deficientes en Zn^{2+} , una proteína de acuerdo con la invención todavía es muy activa mientras que otras fosfatasas alcalinas conocidas pierden más o menos rápidamente su actividad de fosfatasa.

La invención proporciona así la idea de que una proteína de acuerdo con la invención es especialmente útil en el tratamiento de una enfermedad que está acompañada de deficiencia de Zn^{2+} local o sistémica. En comparación con otras fosfatasas alcalinas conocidas, una proteína de acuerdo con la invención es más activa en condiciones bajas de Zn^{2+} . La descripción proporciona una proteína de acuerdo con la invención para usar en la prevención o 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 tracto gastrointestinal, infección, sepsis, neurodermatitis, enfermedad inflamatoria del hígado, enfermedad pulmonar inflamatoria y enfermedad renal inflamatoria.

Con el término "deficiencia de zinc" o "deficiencia de Zn^{2+} " se quiere decir que la cantidad de zinc (localmente) disponible es insuficiente para permitir una actividad celular y/o enzimática sin impedimentos. La deficiencia de zinc puede ser absoluta o relativa, donde la deficiencia absoluta de zinc puede determinarse fácilmente haciendo referencia a valores de referencia en individuos sanos, conocidos en la técnica. La deficiencia relativa de zinc, por ejemplo, puede ocurrir cuando las concentraciones de zinc todavía están dentro de los límites establecidos por valores de referencia en individuos sanos, pero las concentraciones de zinc necesarias son más altas de lo normal, por ejemplo, durante la inflamación. En algunas realizaciones, la deficiencia de zinc significa que la concentración de zinc (local) del sujeto es inferior a 10 μM , más preferiblemente inferior a 5 μM , más preferiblemente inferior a 2 μM , más preferiblemente inferior a 1 μM , más preferiblemente inferior a 0,1 μM , más preferiblemente inferior a 0,05 μM , más preferiblemente inferior a 0,02 μM , más preferiblemente inferior a 0,01 μM , más preferiblemente inferior a 0,005 μM , más preferiblemente inferior a 0,002 μM . En algunas realizaciones, la deficiencia de zinc significa que la concentración de zinc (local) es menor que la necesaria para la actividad celular y/o enzimática sin impedimentos.

Con el término "enfermedad inflamatoria" se quiere indicar, cualquier enfermedad que se deba o esté acompañada por una respuesta protectora del tejido a la lesión o destrucción de los tejidos, que sirve para destruir, diluir o aislar tanto al agente causante de la lesión como a los tejidos lesionados. Los signos clásicos de inflamación aguda son padecimiento (dolor), acaloramiento (calor), enrojecimiento (rubor), hinchazón (tumor) y pérdida de función (función laesa). Típicamente, la inflamación se caracteriza por un aumento de los parámetros inflamatorios, tal como la proteína C reactiva, leucocitos y citoquinas (IL-6, TNF-alfa, etc.). Aunque la inflamación es inicialmente protectora por naturaleza, la enfermedad inflamatoria alterada, tal como la artritis reumatoide y (otras) enfermedades autoinmunes, también entran dentro de la definición de "enfermedad inflamatoria". En una realización preferida, la proteína de la presente invención es para uso en el tratamiento de dicha enfermedad inflamatoria alterada o nociva.

Además, durante el análisis farmacocinético estándar, los presentes inventores han observado inesperadamente que una proteína de acuerdo con la invención está dirigida a varios órganos, en particular a la piel, riñón, bazo, hígado, pulmones, cerebro, grasa, hueso y colon. Usando una proteína de la invención acoplada a yodo radioactivo, se ha observado que la relación en % en órgano/sangre para una proteína de acuerdo con la invención con respecto a aquella de catALPI/coronaALPP es especialmente favorable para la piel, riñón, bazo, hígado, pulmones, cerebro, grasa, hueso y colon, es decir, una proteína de acuerdo con la invención se dirige relativamente más a estos órganos que la proteína catALPI/coronaALPP conocida. En particular, una proteína de acuerdo con la invención reside en concentraciones más bajas en la sangre que catALPI/coronaALPP y reside en concentraciones más altas en los órganos mencionados. Cuando se trata una afección relacionada con estos órganos, como neurodermatitis hepática, lesión renal, fibrosis hepática, hipofosfatasa o similares, se necesita menos proteína para el tratamiento, lo que reduce los costes y/o aumenta la eficacia. Los experimentos que involucran enfermedades relacionadas con estos órganos ya se han realizado (hipofosfatasa), están en progreso (enfermedad renal) o están planificados. La invención proporciona, por lo tanto, una proteína que muestra una mayor independencia del zinc y un comportamiento farmacocinético en comparación con las fosfatasas alcalinas conocidas en la técnica.

Los inventores han mostrado, en diversas realizaciones de trabajo, que una proteína de acuerdo con la invención es útil como medicamento. Las enfermedades o afecciones que pueden tratarse con una proteína de acuerdo con la invención incluyen: función renal reducida, lesión renal, insuficiencia renal e hipofosfatasa. Además, debido a las características específicas de una proteína fosfatasa alcalina de acuerdo con la invención que constituyen mejoras frente a proteínas de fosfatasa alcalina conocidas que se han usado, la proteína de acuerdo con la invención es útil no solo para la función renal reducida, lesión renal, insuficiencia renal e hipofosfatasa, sino también para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal, infección, sepsis, neurodermatitis, enfermedad hepática inflamatoria, enfermedad pulmonar inflamatoria y enfermedad renal inflamatoria. Todas estas son enfermedades que afectan a órganos que son el objetivo de una proteína de acuerdo con la invención y/o están acompañados por deficiencia de zinc (relativa).

El término "prevención" o "que previene" se define en la presente invención como el (el acto de) administrar una proteína de acuerdo con la invención a un sujeto con la intención de evitar que dicho sujeto contraiga una enfermedad particular. Aunque la intención del tratamiento es evitar que dicho sujeto contraiga dicha enfermedad, no es necesario que el estado de enfermedad se prevenga completamente después de una o múltiples administraciones de una proteína de acuerdo con la invención, ya que los sujetos, por ejemplo, no son necesariamente susceptibles a un protocolo de tratamiento específico. Se prefiere que, en general, la eficacia de dicha prevención se logre porque un grupo de sujetos que ha recibido una proteína de acuerdo con la invención para prevenir una enfermedad particular muestre al menos un aumento reducido en la gravedad de la enfermedad o, por ejemplo, menos complicaciones de dicha enfermedad, en comparación con un grupo de sujetos que no ha recibido dicha proteína. Por ejemplo, en caso de enfermedad renal, se prefiere que los sujetos con riesgo de contraer enfermedad renal, después de ser tratados con una proteína de acuerdo con la invención, muestren menos disminución de la función renal, en relación con los sujetos que no han sido tratados con dicha proteína. Si un sujeto contrae una enfermedad para la que se administró una proteína para prevenir dicha enfermedad, se pueden realizar administraciones adicionales (en adelante denominadas como "tratamiento") para evitar el empeoramiento de dichos estados de enfermedad o como tratamiento con la intención de curar.

El término "tratamiento" o "tratar" se define en la presente invención como (el acto de) administrar una proteína de acuerdo con la invención a un sujeto con la intención de curar al sujeto de una enfermedad (esperada) o mejorar, reducir o eliminar los síntomas de una enfermedad en el sujeto. Aunque la intención del tratamiento es curar dicho sujeto, no es necesario que dicho sujeto se cure después de una o múltiples administraciones de una proteína de acuerdo con la invención, ya que los sujetos, por ejemplo, no necesariamente son susceptibles a un protocolo de tratamiento específico. Se prefiere que, en general, la eficacia de dicho tratamiento se consiga en la medida en que los sujetos que se han tratado con una proteína de acuerdo con la invención muestren al menos una mejoría de su estado de enfermedad o, por ejemplo, menos complicaciones de dicha enfermedad, en comparación con un grupo no tratado (o tratado con placebo). Por ejemplo, en el caso de enfermedad renal, se prefiere que los sujetos, después de ser tratados con una proteína de acuerdo con la invención, muestren una función renal mejorada o menor disminución de la función renal, con respecto a sujetos que no han sido tratados con dicha proteína.

La invención proporciona además un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de acuerdo con la invención.

Como se usa en este documento, los términos "secuencia de ácido nucleico" y "polinucleótido" también abarcan moléculas no naturales basadas en y/o derivadas de secuencias de ácido nucleico, tales como por ejemplo secuencias de ácido nucleico modificadas artificialmente, ácidos nucleicos peptídicos, como, así como secuencias de ácido nucleico que comprenden al menos un nucleótido modificado y/o un nucleótido no natural tal como, por ejemplo, inosina, LNA, morfolino y ARN 2'-O-metilo.

También se proporciona un vector que comprende dicho polinucleótido de acuerdo con la invención. Dicho vector preferiblemente comprende secuencias de ácido nucleico adicionales tales como elementos necesarios para la transcripción/traducción de la secuencia de ácido nucleico que codifica una fosfatasa (por ejemplo, secuencias promotoras y/o terminadoras). Dicho vector también puede comprender secuencias de ácido nucleico 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 de elección 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 (por ejemplo, un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, baculovirus y/o sus derivados), un cósmido, un fago o un fagémido, un vector episomal o un cromosoma artificial. Tal polinucleótido o vector es muy útil para la producción de una proteína de acuerdo con la invención, pero también se puede usar para terapia génica.

La invención proporciona así una proteína de acuerdo con la invención para uso como medicamento. También es posible tratar a un paciente que padece o que está en riesgo de padecer cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente para ser tratado con un polinucleótido de acuerdo con la invención, o con un vector de acuerdo con la invención, para expresar una proteína de acuerdo con la invención *in vivo*. La invención también proporciona un polinucleótido de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención para uso como medicamento, preferiblemente para la prevención o el tratamiento de la función renal reducida, lesión renal, insuficiencia renal, hipofosfatasa, enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal, infección, sepsis, neurodermatitis, enfermedad hepática inflamatoria, enfermedad pulmonar inflamatoria y enfermedad renal inflamatoria.

También se proporciona una proteína, un polinucleótido o un vector de acuerdo con la invención para usar en un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, una enfermedad renal o hipofosfatasa.

También se prevé el uso de una proteína, polinucleótido y/o vector de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento, preferiblemente para la prevención o el tratamiento de la función renal reducida, lesión renal, insuficiencia renal, hipofosfatasa, enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal, infección, sepsis, neurodermatitis, enfermedad hepática inflamatoria, enfermedad pulmonar inflamatoria y enfermedad renal inflamatoria.

Se describe adicionalmente el uso de una proteína de fosfatasa alcalina de acuerdo con la invención, de un polinucleótido de acuerdo con la invención, o de un vector de acuerdo con la invención, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que está acompañada por una deficiencia de Zn^{2+} local o sistémica, preferiblemente dicha enfermedad es una enfermedad inflamatoria, una enfermedad renal o hipofosfatasa, 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 tracto gastrointestinal, infección, sepsis, neurodermatitis, enfermedad hepática inflamatoria, enfermedad pulmonar inflamatoria y enfermedad renal inflamatoria.

La divulgación describe además un método para tratar un sujeto (preferiblemente un ser humano) para tratar una enfermedad que está preferiblemente acompañada por deficiencia de Zn^{2+} , que comprende administrar una cantidad eficaz de una fosfatasa de acuerdo con la invención, en donde dicha enfermedad preferiblemente 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 tracto gastrointestinal, infección, sepsis, neurodermatitis, enfermedad hepática inflamatoria, enfermedad pulmonar inflamatoria y enfermedad renal inflamatoria.

La invención proporciona por lo tanto una proteína, un polinucleótido y/o un vector de acuerdo con la invención para usar en una variedad de enfermedades. Una proteína de acuerdo con la invención es especialmente útil, debido a su distribución en los órganos, para su uso en el tratamiento de una enfermedad que implica el tracto gastrointestinal, riñón, piel, hígado, pulmón, cerebro, tejido graso, o hueso.

En una realización preferida, la invención proporciona una proteína, un polinucleótido y/o un vector de acuerdo con la invención para usar en el tratamiento de una enfermedad renal.

Aunque existe una comprensión cada vez mayor de la fisiopatología de la lesión renal y que hay terapias que mejoran la función renal [Lameire NH, Acute kidney injury: an increasing global concern. Lancet. 13 de julio de 2013; 382 (9887): 170-9], subsiste la necesidad de tratamientos alternativos para tratar la lesión renal y/o mejorar la función renal. La

presente invención proporciona dicho tratamiento alternativo proporcionando una proteína, un polinucleótido y/o un vector para su uso de acuerdo con la invención.

5 En una realización preferida, la invención proporciona una proteína, un polinucleótido y/o un vector para su uso de acuerdo con la invención, en donde dicha enfermedad renal se selecciona del grupo de insuficiencia renal, lesión renal aguda, enfermedad renal crónica, enfermedad renal isquémica.

10 El término lesión renal aguda (AKI), anteriormente llamada insuficiencia renal aguda, significa que la función renal se pierde rápidamente. La AKI se diagnostica con base en los hallazgos característicos de laboratorio, tales como el nitrógeno ureico elevado en sangre y la creatinina, o la incapacidad de los riñones para producir cantidades suficientes de orina. AKI se puede subdividir en AKI prerrenal, AKI intrínseca y AKI postrenal.

15 La AKI prerrenal es causada por una disminución del flujo sanguíneo efectivo al riñón. Los hallazgos típicos de laboratorio para AKI prerrenal son: $U_{osm} > 500$, $U_{Na} < 10$, $Fe_{Na} < 1\%$ y la relación BUN/Cr: > 20 .

El término AKI intrínseca se usa cuando las fuentes de daño al riñón son causadas por el riñón mismo. Los hallazgos típicos de laboratorio para AKI intrínseca son: $U_{osm} < 350$, $U_{Na} > 20$, $Fe_{Na} > 2\%$ y la relación BUN/Cr: < 15 .

20 El término AKI postrenal se reserva para aquellas afecciones en las que la obstrucción del tracto urinario es la causa de AKI. Los hallazgos típicos de laboratorio para AKI postrenal son: $U_{osm} < 350$, $U_{Na} > 40$, $Fe_{Na} > 4\%$ y la relación BUN/Cr: > 15 .

25 En todo el mundo, hay varias pautas para la clasificación de la enfermedad renal crónica. Como un ejemplo, los criterios de clasificación de la National Kidney Foundation (2002) "Guías de práctica clínica para la enfermedad renal crónica de la K/DOQI" se describen a continuación. El experto puede seleccionar diferentes poblaciones de pacientes, basándose en otras pautas.

30 Típicamente, todos los individuos con una tasa de filtración glomerular (GFR) < 60 mL/min/1,73 m² durante 3 meses se clasifican como pacientes con enfermedad renal crónica, independientemente de la presencia o ausencia de daño renal. El motivo para incluir a estos individuos es que la reducción de la función renal a este nivel o inferior representa la pérdida de la mitad o más del nivel de función renal normal en el adulto, lo que puede estar asociado con una serie de complicaciones. En general, las personas con daño renal crónico se clasifican como personas con enfermedad renal crónica, independientemente del nivel de GFR. La razón para incluir individuos con GFR > 60 mL/min/1,73 m² es que la GFR puede mantenerse a niveles normales o elevados a pesar del daño renal sustancial y que los pacientes con daño renal tienen un mayor riesgo de tener los dos principales resultados de la enfermedad renal crónica: pérdida de la función renal y desarrollo de enfermedades cardiovasculares, que pueden conducir a morbilidad y mortalidad.

40 La pérdida de proteína en la orina se considera un marcador independiente del empeoramiento de la función renal y la enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, las pautas británicas agregan la letra "P" a la etapa de la enfermedad renal crónica si hay una pérdida significativa de proteína.

Las 5 etapas de la enfermedad renal crónica se clasifican típicamente de la siguiente manera:

45 Etapa 1: Función levemente disminuida; daño renal con GFR normal o relativamente alta (≥ 90 mL/min/1,73 m²). El daño renal se define como anomalías patológicas o marcadores de daño, incluidas anormalidades en análisis de sangre u orina o estudios de imágenes.

Etapa 2: Reducción leve de la GFR (60-89 mL/min/1,73 m²) con daño renal. El daño renal se define como anomalías patológicas o marcadores de daño, incluidas anormalidades en análisis de sangre u orina o estudios de imágenes.

50 Etapa 3: Reducción moderada en GFR (30-59 mL/min/1,73 m²). Las pautas británicas distinguen entre la etapa 3A (GFR 45-59) y la etapa 3B (GFR 30-44) con fines de detección y remisión.

Etapa 4: Reducción severa de la GFR (15-29 mL/min/1,73 m²) Preparación para la terapia de reemplazo renal.

Etapa 5: Insuficiencia renal establecida (GFR < 15 mL/min/1,73 m²), terapia de reemplazo renal permanente (RRT) o enfermedad renal en etapa terminal (ESRD).

55 El término falla renal ahora denota una condición médica en la cual los riñones no filtran adecuadamente los productos de desecho de la sangre. Las dos formas principales son la lesión renal aguda, que a menudo es reversible con un tratamiento adecuado, y la enfermedad renal crónica, que a menudo no es reversible.

60 La enfermedad renal isquémica se reserva para aquellas afecciones en las que una reducción clínicamente importante en la tasa de filtración glomerular o pérdida de parénquima renal es causada por estenosis de la arteria renal hemodinámicamente significativa u otras causas que dan como resultado baja presión sanguínea en los riñones, como, por ejemplo, shock hemodinámico o el uso de una pinza arterial para la interrupción temporal del flujo sanguíneo.

65 Los inventores también han demostrado que una proteína de acuerdo con la invención es útil en el tratamiento de hipofosfatasa (HPP). Esto fue bastante inesperado, ya que los experimentos previos que utilizaron TNAP para el tratamiento de la hipofosfatasa no demostraron la eficacia de la terapia de reemplazo enzimático. En consecuencia, se

desarrolló una proteína de fusión artificial entre una enzima TNAP y un péptido de asentamiento en los huesos (Whyte et al., N Engl J Med. 8 de marzo de 2012; 366 (10): 904-13). Sorprendentemente, la proteína de acuerdo con la presente invención no necesita dicho péptido de asentamiento en los huesos y es capaz de reducir eficazmente los signos de los síntomas de hipofosfatasa en un modelo de ratón. En otra realización preferida, la invención proporciona así una proteína, un polinucleótido y/o un vector de acuerdo con la invención para usar en el tratamiento de la hipofosfatasa.

La base metabólica de la hipofosfatasa proviene de un defecto molecular en el gen que codifica para la fosfatasa alcalina no específica del tejido (TNAP). TNAP es una ectoenzima anclada a la superficie externa de las membranas celulares de los osteoblastos y los condrocitos. TNAP normalmente hidroliza varias sustancias, incluido el pirofosfato inorgánico (PPI) y el 5'-fosfato de piridoxal (PLP), una forma importante de vitamina B6.

Cuando la TNAP es baja, el pirofosfato inorgánico (PPI) se acumula extracelularmente e inhibe potentemente la formación de hidroxiapatita (mineralización), causando raquitismo en bebés y niños y osteomalacia (huesos blandos) en adultos. El PLP es la principal forma de vitamina B6 y debe ser desfosforilado por TNAP hasta piridoxal (PL) para atravesar la membrana celular. La deficiencia de vitamina B6 en el cerebro afecta la síntesis de neurotransmisores, que pueden causar convulsiones. En algunos casos, la deposición de cristales de pirofosfato de calcio deshidratado (CPPD) en la articulación puede causar una pseudogota.

No hay terapias aprobadas para HPP hoy. El tratamiento actual consiste en aliviar los síntomas, mantener el equilibrio de calcio y aplicar intervenciones físicas, ocupacionales, dentales y ortopédicas según sea necesario. La administración de bisfosfonato (análogo sintético de pirofosfato) en un bebé no tuvo un efecto discernible en el esqueleto, y la enfermedad del bebé progresó hasta la muerte a los 14 meses de edad.

El trasplante de médula ósea en dos recién nacidos gravemente afectados produjo mejoría radiográfica y clínica, aunque el mecanismo de eficacia no se conoce completamente y permaneció una morbilidad significativa. La terapia de reemplazo enzimático con suero normal o con suero rico en ALP de pacientes con enfermedad ósea de Paget no fue beneficiosa [Whyte MP, Valdes R, Ryan LM, McAlister WH (septiembre de 1982). "Infantile hypophosphatasia: enzyme replacement therapy by intravenous infusion of alkaline phosphatase-rich plasma from patients with Paget bone disease". J. Pediatr. 101 (3): 379-86] [Whyte MP, McAlister WH, Patton LS, et al., (diciembre de 1984). "Enzyme replacement therapy for infantile hypophosphatasia attempted by intravenous infusions of alkaline phosphatase-rich Paget plasma: results in three additional patients". J. Pediatr. 105 (6): 926-33]. Se pensó que estas terapias de reemplazo enzimático eran ineficaces porque se supone que la función de la fosfatasa alcalina está en la superficie del hueso y no en la sangre. Por lo tanto, se desarrollaron otros intentos para mejorar la eficacia de la terapia de reemplazo de enzimas alrededor de una enzima TNAP dirigida al hueso con resultados prometedores [Whyte et al. N Engl J Med. 8 de marzo de 2012; 366 (10): 904-13]. Sorprendentemente, la presente invención muestra que, sin introducir una porción artificial dirigida al hueso, una proteína de acuerdo con la invención es beneficiosa en un modelo murino de hipofosfatasa. Una ventaja de la presente proteína sobre la descrita en Whyte et al y Millan et al [J. Bone Miner. Res. 2008; 23 (6): 777-787] es que, debido a la ausencia de la porción artificial dirigida al hueso, se espera que la presente proteína sea mucho menos inmunogénica. La presente proteína consiste en una proteína que tiene una alta identidad de secuencia con proteínas de fosfatasa alcalina humana de origen natural. Además, la proteína de la presente invención tiene una ventaja sobre la fosfatasa alcalina dirigida al hueso con respecto a la facilidad y el coste de producción.

En una realización preferida, se proporciona una proteína, polinucleótido y/o vector de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento de hipofosfatasa, en donde dicha hipofosfatasa se selecciona de hipofosfatasa perinatal, hipofosfatasa en bebés, hipofosfatasa en niños e hipofosfatasa en adultos.

La hipofosfatasa perinatal es la forma más perniciosa de hipofosfatasa. En el útero, la hipomineralización profunda da como resultado una ausencia de osificación de la membrana craneal, extremidades deformadas o acortadas durante la gestación y al nacer, y muerte rápida por insuficiencia respiratoria.

La hipofosfatasa en niños se presenta en los primeros 6 meses de vida. El desarrollo después del nacimiento a menudo parece normal hasta el inicio de una alimentación deficiente y un aumento de peso inadecuado, y se reconocen las manifestaciones clínicas del raquitismo. La hipercalcemia y la hipercalciuria también son comunes y pueden explicar la nefrocalcinosis, el compromiso renal y los episodios de vómitos recurrentes. Se estima que la mortalidad es del 50% en el primer año de vida.

La hipofosfatasa en la infancia tiene una expresión clínica variable. Como resultado de la aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental, ocurre la pérdida prematura de dientes deciduos (es decir, antes de los 5 años). Con frecuencia, los incisivos se desprenden primero; ocasionalmente casi toda la dentición primaria se exfolia prematuramente. Las radiografías dentales a veces muestran las cámaras de pulpa agrandadas y los conductos radicales característicos de los "dientes de concha" del raquitismo. Los pacientes también pueden experimentar caminar de forma retardada, una marcha característica de pato, quejarse de rigidez y dolor y tener una debilidad muscular apendicular (especialmente en los muslos) consistente con una miopatía no progresiva. Típicamente, las radiografías muestran deformidades raquílicas y defectos óseos característicos cerca de los extremos de los huesos largos principales (es decir, "lenguas" de radiolucencia que se proyectan desde la placa de crecimiento raquílica a la metafisis). El retraso del crecimiento, las fracturas frecuentes y la osteopenia son comunes. En los lactantes y niños pequeños gravemente afectados no es raro,

a pesar de la aparición de fontanelas ampliamente "abiertas" en los estudios radiográficos, que se produzca sinostosis funcional de las suturas craneales. La ilusión de fontanelas "abiertas" es el resultado de grandes áreas de calvario hipomineralizado. Posteriormente, la verdadera fusión ósea prematura de suturas craneales puede elevar la presión intracraneal.

La hipofosfatasa en adultos puede asociarse con raquitismo, pérdida prematura de dientes deciduos o pérdida temprana de dentición adulta seguida de una salud relativamente buena. La osteomalacia se manifiesta en pies dolorosos como resultado de fracturas recurrentes de estrés metatarsal con escasa cicatrización y molestias en los muslos o caderas por pseudofracturas femorales que, cuando aparecen en el estudio radiográfico, se distinguen de la mayoría de otros tipos de osteomalacia (que ocurren medialmente) por su ubicación en las cortezas laterales del fémur proximal. Algunos pacientes sufren deposiciones de cristales de dihidrato de pirofosfato cálcico con ocasionales ataques manifiestos de artritis (pseudogota), que parece ser el resultado de niveles elevados de pirofosfato inorgánico endógeno (PPi). Estos pacientes también pueden sufrir degeneración del cartílago articular y artropatía por pirofosfato. Las radiografías pueden revelar pseudofracturas en las cortezas laterales del fémur proximal, fracturas por estrés, y los pacientes pueden experimentar osteopenia, condrocalcinosis, características de la artropatía por pirofosfato y periartitis calcificada.

En una realización preferida, se proporciona una proteína, un polinucleótido y/o un vector para uso en el tratamiento de la hipofosfatasa de acuerdo con la invención, en donde el tratamiento da como resultado una supervivencia prolongada; aumento de peso corporal; fenotipo esquelético mejorado (tal como inducción de centros de osificación secundarios, mejora de la mineralización ósea, por ejemplo, en hueso trabecular y/o cortical, o inducción de osteoide); atenuación de defectos craneofaciales (tal como anomalías de forma y fusión de sutura coronal); mejora del fenotipo dentoalveolar (tal como la mejora de la altura y la forma de los molares, el grosor de la dentina y la mineralización ósea); y/o reducción de los niveles de PPi en plasma del paciente.

También se proporciona el uso de una proteína, un polinucleótido y/o un vector de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la hipofosfatasa, en donde el tratamiento da como resultado una supervivencia prolongada; aumento de peso corporal; fenotipo esquelético mejorado (tal como inducción de centros de osificación secundarios, mejora de la mineralización ósea, por ejemplo, en hueso trabecular y/o cortical, o inducción de osteoide); atenuación de defectos craneofaciales (tal como anomalías de forma y fusión de sutura coronal); mejora del fenotipo dentoalveolar (como la mejora de la altura y la forma de los molares, el grosor de la dentina y la mineralización ósea); y/o reducción de los niveles de PPi en plasma de un paciente.

También se proporciona un método para tratar un sujeto que sufre o está en riesgo de padecer hipofosfatasa, en donde el tratamiento da como resultado una supervivencia prolongada; aumento de peso corporal; fenotipo esquelético mejorado (tal como inducción de centros de osificación secundarios, mejora de la mineralización ósea, por ejemplo, en hueso trabecular y/o cortical, o inducción de osteoide); atenuación de defectos craneofaciales (tal como anomalías de forma y fusión de sutura coronal); mejora del fenotipo dentoalveolar (tal como la mejora de la altura y la forma de los molares, el grosor de la dentina y la mineralización ósea); y/o reducción de los niveles de PPi en plasma en dicho sujeto.

En una realización más preferida, se proporciona una proteína, un polinucleótido y/o un vector para uso en el tratamiento de la hipofosfatasa de acuerdo con la invención, en el que dicha hipofosfatasa se selecciona de hipofosfatasa en bebés, en niños o en adultos. Más preferiblemente, la hipofosfatasa es hipofosfatasa en niños.

A lo largo de la memoria descriptiva, 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 1 a continuación, se enumeran los nombres y abreviaturas comúnmente utilizados o utilizados en esta solicitud.

Tabla 1: Sinónimos y abreviaturas utilizados en la presente solicitud de patente o generalmente conocidos para los diferentes tipos de fosfatasas alcalinas

Fosfatasas alcalinas	Abreviaturas
Fosfatasa alcalina placentaria	ALPP, PLAP,
Fosfatasa alcalina placentaria secretable	shPLAP, sALPP
Fosfatasa alcalina intestinal	ALPI, IAP hIAP
Fosfatasa alcalina intestinal secretable	shIAP, sALPI
Fosfatasa alcalina similar a la placentaria	GCAP
Fosfatasa alcalina no específica del tejido	TNAP, BLK, ALPL, TNSALP
Fosfatasa alcalina recombinante que comprende el dominio catalítico de ALPI y el dominio corona de ALPP	catALPI/coronaALPP, RecAP, Xinlap, sALPI-ALPP-CD
Proteína de acuerdo con la invención	LVL-RecAP, RecAP mejorado

Con el término "secretable" se entiende que no se ha unido ningún ancla de Glicosilfosfatidilinositol (GPI) postraducciona a la proteína madura, permitiendo que la proteína se secrete y no se una a la membrana. Un ancla de GPI es un glicolípido que se puede unir al C-terminal de una proteína durante la modificación postraducciona. Está compuesta de un grupo fosfatidilinositol unido a través de un enlazador que contiene carbohidratos (glucosamina y manosa con el residuo de inositol a través de un enlace glucósido) y a través de un puente de fosfato de etanolamina (EtNP) con el aminoácido C-

terminal de una proteína madura. Los dos ácidos grasos dentro del grupo fosfatidilinositol hidrófobo anclan la proteína a la membrana celular. Es ventajoso para la producción y el procesamiento posterior, y de este modo se prefiere que una proteína de acuerdo con la invención no incluya un ancla de GPI.

Está claro que cualquiera de las fosfatasa modificadas secretables descritas (y por lo tanto también una proteína secretable de acuerdo con la invención) pueda 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 que permiten a dicha célula huésped expresar dicha fosfatasa secretable y opcionalmente aislar la fosfatasa producida a partir del medio en el que crecen y/o se mantienen las células huésped. Sin embargo, aparte de las mutaciones en la secuencia de unión de GPI mencionada anteriormente, existen otros métodos que hacen proteínas secretadas, sin el ancla de GPI, por ejemplo:

1) Después de la expresión como proteínas ancladas a la membrana, las fosfolipasas pueden usarse para escindir el ancla de GPI. Por lo tanto, la invención también proporciona un método para producir una fosfatasa secretada que comprende cultivar una célula huésped capaz de expresar una fosfatasa anclada a la membrana, permitiendo que dicha célula huésped produzca dicha fosfatasa e incubando las células obtenidas con una fosfolipasa y aislando opcionalmente la fosfatasa liberada.

2) La interferencia con la producción del ancla de GPI o el uso de una célula (tipo) que es deficiente en la producción del ancla 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. En otra realización más, la invención proporciona 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 ácido nucleico que codifica cualquiera de las fosfatasa (alcalinas) secretados modificadas mencionadas), permitiendo a dicho huésped producir dicha fosfatasa secretable y aislar opcionalmente la fosfatasa producida, en donde dicha célula huésped no es capaz de biosíntesis de proteínas funcionales ancladas a GPI. Sin embargo, la célula huésped también puede producir una fosfatasa con una secuencia señal funcional de GPI.

3) La interferencia con o el uso de una célula deficiente en transamidasa se puede usar para inhibir la unión de un ancla de GPI a la proteína, haciendo que la proteína no sea anclada y secretable. Dicha célula deficiente se ha obtenido mediante mutagénesis en CHO.

Un vector de acuerdo con la invención preferiblemente comprende secuencias de ácido nucleico adicionales tales como elementos necesarios para la transcripción/traducción de la secuencia de ácido nucleico que codifica una fosfatasa (por ejemplo, secuencias promotoras y/o terminadoras). Dicho vector también puede comprender secuencias de ácido nucleico que codifican marcadores de selección (por ejemplo, un antibiótico) para seleccionar o mantener células huésped transformadas con dicho vector. Preferiblemente, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de anclaje de GPI está ausente en un polinucleótido y/o vector de acuerdo con la invención. 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 (por ejemplo, un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, baculovirus o derivados de los mismos), un cósmido, un fago o un fagémido, un vector episomal o un cromosoma artificial.

Además, la invención también proporciona una célula huésped que comprende una proteína, una secuencia de ácido nucleico o vector de acuerdo con la invención 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, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Las células huésped preferidas son células derivadas de mamíferos (o más preferiblemente humanas) tales como BHK, HEK293, CHO o PerC6^{MR}. En una realización preferida particular, la célula huésped es una célula CHO.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de acuerdo con la invención, un vector que comprende dicha secuencia de ácido nucleico, y/o una célula huésped que comprende dicha secuencia de ácido nucleico son muy útiles en la producción de una proteína de acuerdo con la invención. Una proteína de acuerdo con la invención comprende sitios de glicosilación y, por lo tanto, la proteína se produce 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 mamífero (por ejemplo, humana) e incluso más preferiblemente la producción implica una producción a gran escala. En otra realización preferida, el sistema de producción usado es una plataforma vegetal o de levadura o de mamífero (preferiblemente no humana) en la que se introduce un patrón artificial de glicosilación de tipo humano.

En una realización, la invención proporciona así un método para producir una proteína de acuerdo con la invención, comprendiendo el método cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención y permitir que la célula huésped produzca dicha proteína. Las células huésped preferidas son células derivadas de mamífero (o más preferiblemente humanas) tales como BHK, HEK293, CHO o PerC6^{MR}. En una realización preferida particular, la célula huésped es una célula CHO. Preferiblemente, un método para producir una proteína de acuerdo con la invención comprende adicionalmente cosechar y opcionalmente purificar dicha proteína de dicho cultivo.

Como ya se mencionó, una proteína descrita en la presente invención de acuerdo con la invención es útil en terapia. En

una realización, la invención proporciona una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que comprende una proteína de acuerdo con la invención. Dicha composición farmacéutica comprende opcionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 La composición se puede presentar en cualquier forma, por ejemplo, como un comprimido, como un fluido inyectable o como un fluido de infusión, etc. Además, la composición, proteína, nucleótido y/o vector de acuerdo con la invención se puede administrar a través de diferentes rutas, por ejemplo, por vía intravenosa, rectal, bronquial u oral. Otra vía de administración adecuada es el uso de un goteo duodenal.

10 En una realización preferida, la ruta de administración utilizada es la ruta intravenosa. Está claro para el experto en la materia que, preferiblemente, se administra una cantidad eficaz de una proteína de acuerdo con la invención. Como punto de partida, se pueden usar 1-50.000 U/kg/día. Otra ruta adecuada, por ejemplo, para HPP, es la ruta subcutánea. Si se usa la vía de administración intravenosa, se puede aplicar una proteína de acuerdo con la invención (al menos durante una cierta cantidad de tiempo) a través de una infusión continua.

15 Dicha composición de acuerdo con la invención puede comprender opcionalmente excipientes, estabilizadores, 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, véase, por ejemplo, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Filadelfia PA, decimo séptima edición, 1985.

25 Para la administración oral, la proteína puede, por ejemplo, administrarse en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, comprimidos (por ejemplo, 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. Los ejemplos de ingredientes inactivos adicionales que se pueden añadir para proporcionar color, sabor, estabilidad, capacidad amortiguadora, dispersión 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 elaborar tabletas comprimidas. Tanto los comprimidos 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 el comprimido 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.

35 En una realización preferida, una composición que comprende una proteína de acuerdo con la invención es adecuada para la administración oral y comprende un recubrimiento entérico para proteger 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 recubrimiento entérico en la técnica pueden comprender una solución de un polímero de recubrimiento entérico soluble en agua mezclado con el o los ingredientes activos y otros excipientes, que se dispersan en una solución acuosa y que posteriormente pueden secarse y/o peletizarse. El recubrimiento entérico formado ofrece resistencia al ataque de una proteína de acuerdo con la invención por la humedad atmosférica y el oxígeno durante el almacenamiento y por los fluidos gástricos y bajo pH después de la ingestión, aunque se descompone fácilmente bajo las condiciones alcalinas que existen en el tracto intestinal inferior.

La invención proporciona una composición de acuerdo con la invención para uso como medicamento, preferiblemente para tratar enfermedades inflamatorias, una enfermedad renal o hipofosfatasa. La enfermedad inflamatoria preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal, infección, sepsis, neurodermatitis, enfermedad hepática inflamatoria, enfermedad pulmonar inflamatoria y enfermedad renal inflamatoria. La enfermedad renal se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en insuficiencia renal, lesión renal aguda, enfermedad renal crónica y enfermedad renal isquémica. La hipofosfatasa preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en hipofosfatasa perinatal, hipofosfatasa en bebés, hipofosfatasa en niños e hipofosfatasa en adultos.

55 Además del hecho de que una proteína de acuerdo con la invención puede incorporarse en una composición farmacéutica, dicha fosfatasa también puede ser parte de una composición nutritiva o un nutraceutico.

60 Una proteína de acuerdo con la invención se puede añadir a un nutriente (tal como leche) pero también se puede producir dentro de dicho nutriente (por ejemplo, mediante ingeniería molecular). Además, se pueden preparar comprimidos y/o cápsulas que posteriormente se agregan a un nutriente o que pueden ser tomadas directamente por un ser humano.

65 Se describe adicionalmente un método para tratar un sujeto que padece una enfermedad inflamatoria, una enfermedad renal o hipofosfatasa, que comprende administrar una cantidad eficaz de una proteína de acuerdo con la solicitud, por ejemplo, una proteína aislada o recombinante que tiene actividad fosfatasa, en donde parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 50 aminoácidos consecutivos, que tiene al menos un 90% de identidad de

secuencia con el dominio corona de longitud completa de PLAP humana, parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 200 aminoácidos consecutivos que tienen 90% de identidad de secuencia con la región N-terminal que flanquea el dominio corona de ALPI humana, y parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 40 aminoácidos consecutivos que tienen 90% de identidad de secuencia con la región C-terminal que flanquea el dominio corona de ALPI humana, en el que la proteína de longitud completa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la SEQ ID NO: 1, con la condición de que el aminoácido en la posición 279 sea leucina (L), el aminoácido en la posición 328 sea valina (V) y el aminoácido en la posición 478 sea leucina (L), o una cantidad efectiva de un polinucleótido de acuerdo con la solicitud o una cantidad efectiva de un vector de acuerdo con la solicitud.

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

Leyendas de la Figuras

Figura 1: Secuencias de aminoácidos de la proteína madura LVL-RecAP, hIAP y hPLAP. Los dominios putativos de la corona de las diferentes proteínas están subrayados.

Figura 2: Distribución en el órgano de LVL-RecAP comparado con catALPI/coronaALPP. Se representa la distribución en el órgano con respecto a la sangre de LVL-RecAP dividido por la distribución en el órgano con respecto a la sangre de catALPI/coronaALPP (= relación del eje y). Un valor más alto es indicativo del direccionamiento de LVL-RecAP al respectivo órgano cuando se compara con catALPI/coronaALPP.

Figura 3: Supervivencia de ratones *Akp2*^{-/-} tratados con cualquier vehículo, 1 mg de LVL-RecAP/kg/día, 8 mg de LVL-RecAP/kg/día o 16 mg de LVL-RecAP/kg/día.

Figura 4: Concentraciones de creatinina en suero en lechones que sufren daño renal por isquemia/reperfusión. Los animales de simulación se sometieron al procedimiento quirúrgico durante el cual se extrajo el riñón izquierdo. Sin embargo, la oclusión renal y la reperfusión no se realizaron. En el grupo que recibió 0,32 mg/kg/día, en el día 0, la mitad de la dosis se administró antes de la reperfusión y la mitad restante de la dosis se administró a las 8 ± 2 horas después de la reperfusión. Se administró una dosis completa diariamente durante el resto del período de vida.

Figura 5: Concentraciones de AP en lechones que sufren daño renal por isquemia/reperfusión. Los animales de simulación se sometieron al procedimiento quirúrgico durante el cual se extrajo el riñón izquierdo. Sin embargo, la oclusión renal y la reperfusión no se realizaron. En el grupo que recibió 0,32 mg/kg/día (200 U/kg/día), el día 0, la mitad de la dosis se administró antes de la reperfusión y la mitad restante se administró a las 8 ± 2 horas después de la reperfusión. Se administró una dosis completa diariamente durante el resto del período de vida.

Figura 6: Mejora de la supervivencia y el peso corporal de ratones *Alpl*^{-/-} por tratamiento con LVL-RecAP. A) 16 ratones con LVL-RecAP sobrevivieron hasta el final del experimento. El promedio de supervivencia fue p19, p22 y p42,5 para el vehículo, LVL-RecAP1 y LVL-RecAP8, respectivamente. B) Los ratones *Alpl*^{-/-} tratados con vehículo son más livianos que los compañeros de camada TS; el tratamiento con LVL-RecAP1 mejora el peso corporal parecido a los TS en p18. Los ratones tratados con vehículo no sobreviven más tiempo y los ratones tratados con LVL-RecAP8 son todavía más livianos que los compañeros de camada de TS en p53. Mientras que los ratones tratados con LVL-RecAP16 presentan un peso corporal no significativamente diferente de sus compañeros de camada de ST en p53.

Figura 7: el tratamiento con LVL-RecAP mejora el fenotipo esquelético de ratones *Alpl*^{-/-}. Radiografías de columna vertebral, extremidad anterior, caja torácica, extremidad posterior y patas de ratones *Akp2*^{-/-} tratados con vehículo, LVL-RecAP1, LVL-RecAP8, LVL-RecAP16, y los controles de TS no tratados (aumento 5X). A) Ratones *Akp2*^{-/-} muestran una osteomalacia severa (flechas) en vértebras, huesos largos y caja torácica. Los centros de osificación secundarios faltan en los ratones *Akp2*^{-/-} (asterisco). El tratamiento con LVL-RecAP1 corrige ligeramente ese fenotipo (puntas de flecha) en comparación con los de TS no tratados en p18. B) El tratamiento con LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 corrige claramente el fenotipo óseo en vértebras, huesos largos y caja torácica. Específicamente, la mayoría de las extremidades distales se mejoran a medida que se demuestra el desarrollo de los centros de osificación secundarios en la región del metatarso (puntas de flecha).

Figura 8: Mejora de la mineralización en ratones *Alpl*^{-/-} tratados con LVL-RecAP. A) Análisis histológico de fémures de ratones *Alpl*^{-/-} tratados con vehículo (p18), con LVL-RecAP8 (p51), LVL-RecAP16 (p53) y ratones TS no tratados (p53). La tinción de Von Kossa reveló una mejor mineralización ósea con dosis aumentadas de LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16. Los centros de osificación secundarios y la región ósea cortical muestran una notable mejoría en la mineralización (negro) en comparación con los no tratados. Hay menos hueso trabecular en LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 en comparación con TS, pero una mayor mineralización en la región trabecular así como más osteoide, que se espera se convierta en hueso trabecular. B/C) El análisis de BV/TV y OV/BV para LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 demostró menos volumen óseo y mayor volumen de osteoide que los controles de la misma edad.

Figura 9: Mejora de osteomalacia y los niveles de PPI en plasma en ratones *Alpl*^{-/-} tratados con LVL-RecAP. A) Análisis histológico de fémur de ratones *Alpl*^{-/-} tratados con vehículo (p18), con LVL-RecAP8 (p51), LVL-RecAP16 (p53) y TS no

tratados (p53). La tinción tricrómica de Goldner de las secciones del fémur muestran una severa osteomalacia en ratones *Alpl^{-/-}* y una mineralización mejorada en el área cortical y en la osificación secundaria con dosis aumentadas de LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16. La presencia de áreas agrandadas de osteoide sugiere una deposición de hueso, pero aún no mineralizado. B/C) Concentraciones de PP_i en el plasma de ratones *Akp2^{-/-}* que recibieron LVL-RecAP1, LVL-RecAP16 y de TS. El tratamiento con LVL-RecAP1 conduce a una reducción significativa de los niveles elevados de PP_i en ratones *Alpl^{-/-}* en p18. En p53 el tratamiento con LVL-RecAP16, produjo una corrección de los niveles de PP_i en plasma comparable a los controles de TS.

Figura 10: Ausencia de defectos craneofaciales en ratones *Alpl^{-/-}* tratados con LVL-RecAP. Imágenes isosuperficiales por μ CT de cráneos de ratones TS (A, D), *Alpl^{-/-}* tratados con vehículo (B, E) y con LVL-RecAP16 (C, F) en p21 y p53, respectivamente. Ni los huesos frontales ni parietales de los ratones *Alpl^{-/-}* tratados fueron significativamente diferentes de aquellos ratones TS. Los cráneos adultos de o ratones *Alpl^{-/-}* tratados con LVL-RecAP16- no parecían diferentes de los de TS en términos de tamaño y forma.

Figura 11: El tratamiento con LVL-RecAP rescata parcialmente el fenotipo dentoalveolar en ratones *Alpl^{-/-}*. En comparación con (A) radiografía y (D) análisis de μ CT de controles de tipo silvestre en p25-26, (B, F) mandíbulas de ratón *Alpl^{-/-}* sin tratar presentan hueso alveolar hipomineralizado y reducido (AB), molares cortos (M1, M2 y M3) con dentina delgada (DE) y cámaras de pulpa anchas, y dentina incisiva (INC) defectuosa (asterisco sin relleno). En comparación con (E) histología de los tejidos periodontales de control, (G) los ratones *Alpl^{-/-}* no muestran cemento acelular (AC), y el osteoide del hueso alveolar invade el espacio PDL, creando anquilosis hueso-diente (asterisco). (C, H) Los ratones *Alpl^{-/-}* tratados con LVL-RecAP8 muestran una mejor apariencia radiográfica de la altura molar, el grosor de la dentina y la mineralización ósea, aunque los dientes incisivos permanecen defectuosos. (I) Histológicamente, LVL-RecAP no restablece el cemento acelular en la superficie de la raíz. En comparación con (J, L) los controles en p53, (K, M) los ratones *Alpl^{-/-}* tratados con LVL-RecAP16- presentan una mineralización ósea alveolar reducida alrededor de los dientes molares. La forma molar y la mineralización parecen ser relativamente normales en los ratones *Alpl^{-/-}* tratados, mientras que los dientes incisivos permanecen severamente afectados en el análogo de la raíz (asterisco sin relleno). En comparación con la histología de (N) molares de control de TS, (P) los ratones *Alpl^{-/-}* tratados con LVL-RecAP16 presentan una mezcla de hueso alveolar mineralizado y osteoide (asteriscos), y un espacio PDL reducido pero mantenido. La escasa adherencia periodontal se evidencia por la falta de cemento, la desorganización y desprendimiento de PDL y el crecimiento hacia abajo del epitelio de unión. Se observaron pequeñas regiones de unión de PDL (cheurón) al diente. En comparación con la organización fuerte y paralela de las fibras de colágeno de PDL en (O) tejidos de control, indicados por tinción de picosirius bajo luz polarizada, (Q) los ratones *Alpl^{-/-}* tratados con LVL-RecAP 16 presentan PDL menos organizada, aunque existe organización y unión adyacente a las áreas de avance de unión de la raíz del diente (cheurón sin relleno).

Figura 12: el tratamiento con RecAP atenúa la producción de citoquinas inducida por LPS en células epiteliales tubulares proximales humanas (ciPTEC). Las CiPTEC fueron tratadas previamente con recAP (1-5-10 U/mL) seguido por incubación con LPS (10 μ g/mL) durante 24 horas y posteriormente se midió la producción de TNF- α , IL-6 e IL-8 (A) a nivel del gen en las células mediante qPCR (10 U/mL de recAP) y (B) a nivel de proteína en el sobrenadante por ELISA. (C) se administró recAP (10 U/mL) 2 horas antes de la exposición a LPS, simultáneamente con LPS o 2 horas después de la exposición a LPS, seguido por la medición del contenido de proteína TNF- α , IL-6 e IL-8. (D) ciPTEC se trataron previamente con AP inactiva durante 2 horas, que carece de propiedades hidrolizantes, seguido por incubación con LPS (10 μ g/mL) durante 24 horas, después de lo cual se midió el contenido de proteína TNF- α , IL-6 e IL-8. Las células de control se incubaron con medio de cultivo. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n = 5), # p < 0,05 en comparación con el control, *p < 0,05 en comparación con LPS.

Figura 13: Los efectos de recAP no se limitan a la inflamación inducida por LPS y son específicos de los riñones. CiPTEC se trataron previamente con recAP (10 U/mL) durante 2 horas, seguido de una incubación de 24 horas con (A) TNF- α (10 ng/mL) o (B) sobrenadante de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con LPS (PBMC, 1 ng/mL de LPS), después de lo cual se midió la producción de IL-6 e IL-8 a nivel de proteína mediante ELISA. (C) Las PBMC se incubaron previamente durante 2 horas con recAP (10 U/mL) seguido de exposición con LPS (1 ng/mL) durante 24 horas. La producción de IL-6 y TNF- α se midió por ELISA. Las células de control se incubaron con medio de cultivo. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n = 5), # p < 0,05 en comparación con el control, *p < 0,05 en comparación con LPS.

Figura 14: El efecto de recAP en la liberación de ATP inducida por LPS *in vitro*. Se trataron previamente las ciPTEC con recAP (10 U/mL) seguido de incubación con LPS (10 μ g/mL o 100 μ g/mL). Después de 30 minutos, se recogió el sobrenadante para determinar la liberación de ATP celular por bioluminiscencia. Las células de control se incubaron con medio de cultivo. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM (n = 5), # p < 0,05 en comparación con el control.

Figura 15: RecAP previene el deterioro inducido por LPS de la función renal *in vivo*. La función renal se evaluó mediante la medición transcutánea del t_{1/2} con FITC-sinistrina. AKI fue inducido en ratas por LPS (0,3 mg/kg de peso corporal, t = 0), seguido por tratamiento con recAP (1.000 U/kg de peso corporal) a t = 2. Las mediciones de t_{1/2} se realizaron a t = 2 horas y t = 21,5 horas (A, B: ejemplos de cinética de FITC-sinistrina obtenida para una rata en los dos puntos de tiempo respectivos). La orina se recolectó entre t = 5 y t = 16 y el plasma se muestreó en t = 1,5 y t = 24 h, permitiendo el cálculo de (C) excreción fraccional de urea y (D) eliminación de creatinina con el valor en plasma promedio de t = 1,5 y t = 24. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM (Placebo, LPS n = 6; LPS + recAP n = 5), # p < 0,05 en comparación con placebo.

Figura 16: RecAP previene la lesión renal durante AKI inducido por LPS *in vivo*. (A) excreción de KIM-1 en orina y (B) excreción de NGAL, (C) niveles de NGAL en plasma ($t = 24$) y (D) contenido de proteína KIM-1 renal se determinaron mediante ELISA. (E) Las secciones de riñón en parafina se tiñeron con anti-KIM-1 para visualizar la expresión de la proteína KIM-1. Barras de escala: 400 μm (panel izquierdo), 200 μm (panel derecho). Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM (Placebo, LPS $n = 6$; LPS + recAP $n = 5$; parámetros urinarios: Placebo $n = 5$), # $p < 0,05$ en comparación con placebo.

Figura 17. No hay efecto de recAP en las citoquinas inducidas por LPS en el sobrenadante. Se recolectó el sobrenadante de ciPTEC incubado con LPS durante 24 horas (10 $\mu\text{g/mL}$) o incubadas con medio (Control), incubadas con o sin recAP (10 U/mL) durante otras 24 horas seguido por la medición de TNF- α , IL-6 e IL-8 mediante ELISA. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM, # $p < 0,05$ en comparación con el control, * $p < 0,05$ en comparación con LPS.

Figura 18. Correlación entre la actividad enzimática de RecAP en suero humano a 25°C y a 37°C.

Figura 19. Correlación entre la actividad enzimática de LVL-RecAP en suero humano a 25°C y a 37°C.

La Figura 20 muestra la actividad/ μg de proteína a 25°C y a 37°C para RecAP y LVL-RecAP. Los valores representan la media de Δ de actividad entre 25°C y 37°C para una concentración de proteína dada.

Ejemplos

Ejemplo 1

Estabilidad de LVL-RecAP en regulador

Materiales:

Fosfatasas alcalinas recombinantes humanas:

1. sALPI-ALPP-CD (SEQ ID NO: 4) (DOM: 4 de agosto de 2008)
2. LVL-recAP (SEQ ID NO: 1) (DOM: 14 de octubre de 2011)

Métodos:

Dependencia del zinc:

Se determinó la actividad enzimática y el contenido de proteína de ambos lotes de fosfatasa alcalina recombinante humana. Posteriormente, se prepararon soluciones de proteína de 100 $\mu\text{g/mL}$ para cada condición para determinar la dependencia del zinc para los lotes sALPI-ALPP-CD y LVL-recAP como se describe en la Tabla 2.

Las muestras preparadas se almacenaron a TA y se analizaron para actividad enzimática a $T = 0$, $T = 2$ h y $T = 24$ h.

Tabla 2: Condiciones de los lotes de fosfatasa alcalina recombinante sALPI-ALPP-CD y LVL-recAP para determinar su estabilidad (actividad retenida) en presencia y ausencia de zinc y la influencia de un quelante (EDTA).

Condición	Zn (mM)	BSA (%)	Mg (mM)	Manitol (%)	EDTA (mM)
1	0	0	1	1	0
2	0,01	0	1	1	0
3	10	0	1	1	0
4	100	0	1	1	0
5	1.000	0	1	1	0
6	0	0	1	1	2
7	0	0	1	1	5
8	0	0	1	1	10
9	0	0	1	1	100
10	50	0,025	1	1	0

Las determinaciones de las actividades enzimáticas se realizaron de acuerdo con procedimientos estándar, como se indica en SOP PC001.

Las concentraciones de proteína se determinaron mediante mediciones a una OD_{280} ($\epsilon_{\text{recAP}} 1,01 \text{ mL/mg/cm OD}_{280}$)

Resultados

Tabla 3: actividad de las diferentes fosfatasas alcalinas en las condiciones especificadas en la Tabla 2.

Diluyente	sALPI-ALPP-CD			LVL-RecAP		
	t = 0	t = 2	t = 24	t = 0	t = 2	t = 24
1	45,7	53,3	50	60,7	59,8	57,4
2	48,2	53,8	51,6	57,7	57,2	58,1
3	47,3	54,4	51,6	57,7	54,2	52,9
4	46,1	52	53,4	55,3	53,7	55,7
5	48,2	51,2	52,2	56,7	56,3	54,7
6	46,9	24,2	18,7	57,6	54,2*	37,7*
7	47	23,6	20,4	57,6	52,1*	38,9*
8	45	23,2	17,2	56,8	50,3*	35,8*
9	50,9	22,5	16,2	55,6	46,5*	31,2*
10	47,3	55,1	53,6	62,7	57,5	55,4

Como se muestra claramente en la Tabla 3, LVL-RecAP es considerablemente más estable (es decir, muestra más actividad enzimática residual, indicada por valores con asteriscos) en presencia de un agente quelante metálico (EDTA) que CD sALPI-ALPP, implicando menos dependencia de Zn^{2+} para su actividad.

Ejemplo 2

Estabilidad de LVL-RecAP en regulador

Materiales:

Fosfatasas alcalinas recombinantes humanas:

1. sALPI-ALPP-CD (DOM: 4 de Agosto de 2008)
2. LVL-recAP (DOM: 14 de octubre de 2011)

Métodos

En un segundo experimento independiente, se probaron la estabilidad de sALPI-ALPP-CD y LVL-recAP para varias condiciones como se indica en la tabla 4.

Para ambos lotes de AP recombinante en este experimento, se prepararon soluciones de proteína de 100 µg/mL en regulador de glicina 0,025 M, pH 9,6, suero humano y plasma de citrato humano para cada condición de regulador para determinar la estabilidad.

Todas las muestras AP recombinantes preparadas se incubaron a 37°C y se analizaron para actividad enzimática a T = 0, T = 0,5 h, T = 1 h, T = 2 h y T = 24 h.

Tabla 4: Condiciones de los lotes de fosfatasa alcalina recombinante sALPI-ALPP-CD y LVL-recAP en regulador de glicina para determinar su estabilidad (actividad retenida) en presencia/ausencia de zinc y la influencia de un quelante (EDTA o citrato).

Condición	Zn (mM)	BSA %	Mg (mM)	Manitol (%)	EDTA (mM)
1	0	0	1	1	0
2	0	0	1	1	2
3	0	0	1	1	10
4	0	0	1	1	100
8	50	0,025	1	1	0

Resultados

Tabla 5 -actividad de las diferentes fosfatasas alcalinas en las condiciones que se especifican en la Tabla 4.

Condición	LVL-recAP					sALPI-ALPP-CD				
	t = 0	t = 0,5	t = 1	t = 2	t = 24	t = 0	t = 0,5	t = 1	t = 2	t = 240
1	55,1	57,7	54,9	55,2	55,8	63	52,5	53,8	53,8	55,2
2	59,5	52,5	52	51,6*	37,7*	56,5	48	51,6	36,3	23,3
3	50,9	53,5	51,6	49,2*	35,2*	3,3	44,7	43,7	32,9	18,9
4	49,3	43,9	48,7	41,3*	24,2*	49,8	37,9	34,6	29,4	13,3
8	12,2	49,3	53,9	53,1	52,1	55,9	56	57,9	57,5	56

Las determinaciones de las actividades enzimáticas se realizaron de acuerdo con SOP PC001. Las concentraciones de

proteína se determinaron mediante mediciones de OD₂₈₀ (ε_{recAP} 1,01 mL/mg/cm OD₂₈₀).

Como se muestra claramente en la Tabla 5 y en línea con los resultados en la Tabla 3, LVL-RecAP es considerablemente más estable en presencia de un agente quelante metálico (EDTA) que CD sALPI-ALPP (como se indica mediante valores con asteriscos), implicando menos dependencia de Zn²⁺ para su actividad.

Ejemplo 3

Estabilidad al calor y cinética de PLP de LVL-RecAP

Métodos

Expresión de proteína

Se construyeron plásmidos de expresión que contenían sALPI-PLAP-CD y LVL-RecAP secretados marcados con epítipo FLAG como se describió previamente (Kozlenkov et al., J Biol Chem 277, 22992-22999 (2002) y Kozlenkov et al., J. Bone Miner. Res. 19, 1862-1872 (2004)). Las enzimas marcadas con FLAG se transfectaron transitoriamente en células COS-1 mediante electroporación, luego se cultivaron en medio DMEM durante 24 h, como se describió previamente (Narisawa et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 293, G1068-1077 (2007)) cuando el medio fue reemplazado por Opti-MEM libre de suero (Life Technologies). Las proteínas secretadas que contenían Opti-MEM se recogieron 60 horas después de la transfección, luego se filtraron a través de un filtro de acetato de celulosa de 2 µm y se dializaron frente a TBS que contenía MgCl₂ 1 mM y ZnCl₂ 20 µM.

Cinética enzimática

Para medir las actividades catalíticas relativas de las enzimas marcadas con FLAG, las placas de microtitulación se recubrieron con anticuerpo anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich) a 0,2-0,6 µg mL⁻¹. Estas placas se incubaron con concentraciones saturantes de LVL-RecAP o sALPI-PLAP marcadas con FLAG durante 3 horas a temperatura ambiente, después de lo cual las placas se lavaron con PBS, que contenía 0,008% de Tween-80 y las actividades relativas para PLP se compararon para las enzimas saturadas con M2

Se midió la hidrólisis del sustrato fisiológico piridoxal-5'-fosfato (PLP) (Sigma-Aldrich) a pH 7,4 en regulador de ensayo estándar (regulador Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM y ZnCl₂ 20 µM). La concentración de fosfato liberado se determinó usando P_i ColorLock Gold (Innova Biosciences) midiendo la absorbancia a 650 nm (A₆₅₀). Las curvas estándar construidas para concentraciones crecientes de fosfato fueron lineales entre 0-50 µM y todos los experimentos se diseñaron para estar dentro de este rango de concentraciones de fosfato hidrolizado. Se calcularon las velocidades de reacción molares, expresadas como [P_i]_s⁻¹ para el intervalo de concentración de sustrato indicado y se ajustaron a un modelo del sitio de unión única (GraphPad Prism) frente a [sustrato] para calcular K_m (no se aplicaron los gráficos de Lineweaver-Burk, debido a la falta de precisión de las conversiones recíprocas a concentraciones de sustrato muy bajas).

Se usó una concentración de sustrato para PLP de 400 µM. La concentración de enzima soluble fue aproximadamente 1 nM y los tiempos de incubación variaron entre 15 y 30 minutos, dependiendo de la eficacia catalítica para cada enzima. Para asegurar las condiciones de estado estacionario y corregir las señales de sustrato no específicas en el método P_i ColorLock Gold, se resta una lectura temprana (a 5 min) de la lectura posterior, y se midió ΔA₆₅₀ en la curva estándar P_i correspondiente, construida para cada experimento por separado. Todos los experimentos se llevaron a cabo de tres a cinco veces y las constantes derivadas se informaron como la media ± SE.

Para medir la estabilidad térmica, las enzimas marcadas con FLAG se incubaron a 65°C en DEA 1 M (pH 9,8) que contenía MgCl₂ 1 mM y ZnCl₂ 20 µM. Las muestras se removieron en diferentes momentos y se colocaron en hielo, luego se midió la actividad residual usando pNPP de acuerdo con el siguiente método: la actividad de las enzimas unidas se midió como la absorbancia a 405 nm (A₄₀₅) en función del tiempo a 25°C, usando pNPP (10 mM) como sustrato, a pH 7,4 en regulador Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, que contiene MgCl₂ 1 mM y ZnCl₂ 20 µM. Las enzimas también se incubaron en este regulador durante 10 min a temperaturas crecientes (25-100°C) y la actividad residual se midió de la misma manera.

Resultados

Producción de enzimas marcadas con FLAG

Para comparar las propiedades cinéticas de LVL-RecAP con sALPI-PLAP, se añadió una secuencia de marcación con FLAG a ambos ADNc, como se hizo previamente para estudiar comparativamente PLAP y TNAP (Kozlenkov et al., J Biol Chem 277, 22992-22999 (2002) y Kozlenkov et al., J. Bone Miner. Res. 19, 1862-1872 (2004)). Los ADNc se expresaron en células COS-1 y se recuperó el sobrenadante del cultivo que contenía enzimas secretadas. El éxito de la expresión y la recuperación se confirmaron mediante análisis de transferencia Western del anticuerpo anti-FLAG.

Parámetros cinéticos con sustratos fisiológicos

Se investigaron las propiedades fosfohidrolasa de LVL-RecAP y sALPI-PLAP para sustratos fisiológicos implicados en

inflamación y convulsiones, específicamente la vitamina B6 vitámero PLP. LVL-RecAP mostró un K_m más bajo que sALPI-PLAP (30,1 μM frente a 60,7 μM) a pH fisiológico (7,4), lo que indica que el LVL-RecAP mejorado tiene mayor afinidad por PLP que sALPI-PLAP a pH fisiológico.

5 Estabilidad enzimática

El impacto de las mutaciones de aminoácidos en LVL-RecAP sobre la estabilidad global de la enzima se investigó mediante estudios de inactivación térmica. Aunque sALPI-PLAP ya ha mejorado altamente la resistencia al calor (50% de inactivación a 77,8°C), LVL-RecAP fue incluso más resistente a la inactivación por calor (50% de inactivación a 80,6°C).

10

Ejemplo 4

Distribución farmacocinética de LVL-RecAP en ratas

15 Parte A: radiomarcado con yodo 125

La proteína sALPI-PLAP-CD y la proteína LVL-RecAP se marcaron radiactivamente con yodo 125 usando el procedimiento de cloramina-T como lo describe Greenwood et al. * El principio de marcación se basa en la oxidación "*in situ*" de yoduro a yodo atómico y su sustitución nucleofílica en anillos de fenol en posición orto del grupo hidroxilo de los residuos de tirosina.

20

La proteína sALPI-PLAP se marco radioactivamente con yodo usando la técnica de Cloramina-T con el fin de obtener una actividad específica final de ~0,5 mCi/mg y una concentración final de ~1 mg/mL (NaCl al 0,9%).

* F.C Greenwood, V.M Hunter, H.G Glover, The preparation of ^{131}I labelled growth hormone of high specific radioactivity, Biochem. J. 89 (1963) 114-123.

25

A.1 Materiales

- Fosfatasa alcalina sALPI-PLAP (496,7 U/mg) y LVL-RecAP (624 U/mg) proporcionadas por AM-Pharma a una concentración de 6,34 mg/mL en 25% de glicerol p/v, Tris 5 mM, MgCl_2 2 mM, ZnCl_2 50 μM , pH 8,0. La proteína sALPI-PLAP y la proteína LVL-RecAP se almacenaron a 4°C.
- El radionúclido de yodo 125 se adquirió de Perkin Elmer como yoduro de sodio en hidróxido de sodio 10^{-5} N (actividad específica: 643,8 GBq/mg, pureza del radionúclido: 99,95%).
- Cloramina-T (N-cloro-p-toluenosulfonamida, PM 227,6 g/mol), ácido tricloroacético, metabisulfito de sodio (PM 190,1 g/mol) y tirosina se adquirieron a través de Sigma.

35

Se preparó regulador Tris 5 mM pH 8 en el laboratorio Chelatec.

- NaCl al 0,9% fue proporcionado por Versol®.

40 A.2 Método

Se añadieron sucesivamente 850 μg de proteína, aproximadamente 600 μCi de Na^{125}I , 50 μL de regulador Tris y 10 μL de cloramina-T (404,8 nmol, 50 equivalentes/proteína) en un tubo Eppendorf Lo-Bind de 1,5 mL. La reacción se dejó en agitación durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se mezclaron 2 μL del medio de radiomarcación con solución de MBS al 5% y se evaluó la eficiencia de radiomarcación mediante cromatografía en capa fina instantánea (ITLC) con TCA al 10% como eluyente (fosfatasa alcalina en el fondo de la tira y se eluye el 125 yodo libre en la parte superior de la tira).

45

Después de añadir 30 μL de solución de tirosina (10 mg/mL en agua) a la mezcla cruda, se purificaron sALPI-PLAP yodada y LVL-RecAP yodada mediante filtración en gel (G10, GE Healthcare) eluido con NaCl al 0,9%. Se recogieron fracciones de 0,2 mL de volumen en tubos de ensayo. La radioactividad en cada fracción se midió en un contador Gamma automático calibrado para el radionúclido yodo 125 (Wallace Wizard 2470-Perkin Elmer). Las fracciones que contienen el producto radioyodado deseado se combinaron. La pureza radioquímica del compuesto radiomarcado se verificó por ITLC.

50

A.3 Resultados y características de la proteína sALPI-PLAP radiomarcada

55

La eficacia de la radiomarcado determinada por ITLC fue superior al 85% para ambas proteínas. Después de la purificación con G10, la pureza radiográfica de la reacción de marcación es superior al 97% para ambas proteínas.

Las características de la solución de sALPI-PLAP radiomarcada después de la purificación con G10 se resumen en la Tabla 6.

60

Tabla 6: Características de la solución de ^{125}I -sALPI-PLAP después de purificación

	^{125}I -sALPI-PLAP	^{125}I -LVL-RecAP
Eficiencia de marcación (ITLC)	86,36%	85,64%

(continuación)

	¹²⁵ I-sALPI-PLAP	¹²⁵ I-LVL-RecAP
Purificación con G10		
Concentración (mg/mL)	1,149	1,145
Actividad específica (mCi/mg)	0,669	0,544
Actividad volumétrica (mCi/mL)	0,791	0,637
Pureza radiográfica (%)	97,23	97,8

A.4 Actividad de la fosfatasa alcalina

5 La actividad enzimática de sALPI-PLAP radiomarcada se evaluó mediante ELISA.

Materiales

- 10 - Kit de ensayo colorimétrico de fosfatasa alcalina (referencia ab83369- lote número: GR118166-3).
 - Fosfatasa alcalina humana recombinante no marcada diluida a 0,25 mg/mL en NaCl al 0.9%
 - Fosfatasa alcalina humana recombinante radiomarcada diluida a 0,25 mg/mL en NaCl al 0.9%

Protocolo

15 El kit Abcam usa fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) como sustrato de fosfatasa que se torna amarillo (Lambda máxima = 405 nm) cuando se desfosforila mediante AP. El kit puede detectar 10-250 µU de AP en muestras.

El ensayo colorimétrico de fosfatasa alcalina se realizó en sALPI-PLAP sin marcar y radioyodado. El ensayo se realizó como se describe en el protocolo proporcionado por Abcam.

20 Brevemente, se generó una curva estándar de 0 a 20 nmol/pozo de patrón de pNPP (volumen final: 120 µL). Se añadieron 10 µL de solución de enzima AP en cada pozo. En paralelo, la muestra de prueba de sALPI-PLAP se diluyó 15.000 y 8.000 veces en regulador de ensayo. Se añadieron 10 y 20 µL de cada dilución y el volumen final se llevó a 80 µL con regulador de ensayo. Luego, se añadieron 50 µL de solución de pNPP a cada pozo que contenía la muestra de prueba.

25 Las reacciones estándar y de muestra se incubaron 60 minutos a 25°C en la oscuridad. Todas las reacciones se detuvieron luego con 20 µL de solución de detención. La OD a 405 nm se midió en un lector de microplacas.

30 Se trazó la curva estándar de pNP. Las lecturas de muestra se aplicaron a la curva estándar para obtener la cantidad de pNP generada por la muestra de AP. Se puede calcular la actividad de AP de las muestras de prueba:

$$\text{Actividad de sALPI-PLAP (U/mL)} = A / V / T \times \text{factor de dilución de la muestra de prueba}$$

A: cantidad de pNP generada por las muestras (en µmol)

35 V: volumen de muestra agregado en el pozo de ensayo (en mL)

T: tiempo de reacción en minutos

$$\text{Actividad de sALPI-PLAP (U/mg)} = \text{actividad de sALPI-PLAP (U/mL)} / \text{concentración de sALPI-PLAP (mg/mL)}$$

40 Resultados

La Tabla 7 resume los resultados.

Tabla 7: Actividad enzimática de sALPI-PLAP no marcada y ¹²⁵I-ALPI-PLAP

	Actividad de sALPI-PLAP (U/mg)		
	Dilución 1/15.000	Dilución 1/8.000	Media
sALPI-PLAP	474,6	471,6	473,1
¹²⁵ I-sALPI-PLAP	482,6	475,3	479,0
LVL-RecAP	501,3	530,2	515,8
¹²⁵ I-LVL-RecAP	539,2	588,5	563,8

45 La actividad enzimática de sALPI-PLAP no marcada y radiomarcada es similar a aproximadamente 475 U/mg. Por lo tanto, la actividad de sALPI-PLAP no se ve comprometida por la radioyodación utilizando cloramina-T como oxidante.

Parte B: estudio de biodistribución de la proteína ¹²⁵I-sALPI-PLAP en ratas saludables

50

B.1 Materiales

Las características de la cepa de rata utilizada en este estudio se presentan a continuación:

Especie: Ratas Sprague Dawley
 Cepa: CrI CD® (SD) IGS BR
 Fuente: Charles River Francia
 Número y sexo: 15 machos
 Rango de peso corporal/edad: Aproximadamente 250 g al comienzo del estudio
 Periodo de aclimatación: Cinco días antes del tratamiento
 Método de identificación: Identificación de la jaula con el grupo (tiempo de sacrificio).

Manejo de animales

Cría: Las ratas se alojaron en instalaciones para animales antes del tratamiento y en la sala de radioactividad después del tratamiento.
 Alimentación: dieta para ratas libremente disponible. Sin período de ayuno antes del tratamiento.
 Agua: el agua del grifo fue suministrada por una botella de polipropileno y a placer.
 Alojamiento: antes del tratamiento, los animales fueron alojados en grupos de tres en jaulas de policarbonato en condiciones estándar, identificados por una tarjeta que indica el número de estudio, el número de animal, el sexo y las fechas de inicio y final del estudio. Los animales designados para el equilibrio de excreción se transfirieron a jaulas de metabolismo (uno por jaula) después del tratamiento.
 Datos ambiente: la temperatura se registró todos los días. La temperatura de la habitación estaba entre 22 y 24°C. El ciclo de luz artificial se controló usando un temporizador automático (10 horas de luz, 14 horas de oscuridad).
 Personal: los asociados involucrados fueron debidamente calificados y capacitados.
 Selección: los animales fueron examinados en la recepción por el director del estudio. Solo se seleccionaron animales sanos. Se prestó especial atención a cualquier signo de reacción inflamatoria en los animales (por ejemplo, absceso, inflamación de la piel, etc.).

B.2 Solución de dosificación de ^{125}I -sALPI-PLAP y ^{125}I -LVL-RecAP

Las soluciones yodadas de sALPI-PLAP y LVL-RecAP se diluyeron a 0,25 mg/mL en NaCl al 0,9% justo antes de la administración *in vivo*.

B.3 Diseño del estudio

El diseño del estudio se presenta en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8: Diseño del estudio para la distribución *in vivo* de ^{125}I -sALPI-PLAP

Grupo	Número de animales	Tiempo de recolección de sangre	Tiempo sacrificio	Biodistribución
A1	3 machos	2 min, 10 min	30 min	Sangre y órganos
A2	3 machos	5 min, 45 min	2 h	Sangre y órganos
A3	3 machos	15 min, 4 h	6 h	Sangre y órganos
A4	3 machos	1 h, 3 h, 18 h	24 h	Sangre y órganos
A5*	3 machos	NA	48 h	Sangre y órganos

* alojado individualmente en jaulas de metabolismo con recolección de orina y heces a las 24 h y 48 h

Tabla 9: Diseño del estudio para la distribución *in vivo* de ^{125}I -LVL-RecAP

Grupo	Número de animales	Tiempo de recolección de sangre	Tiempo sacrificio	Biodistribución
B1	3 machos	2 min, 10 min	30 min	Sangre y órganos
B2	3 machos	5 min, 45 min	2 h	Sangre y órganos
B3	3 machos	15 min, 4 h	6 h	Sangre y órganos
B4	3 machos	1 h, 3 h, 18 h	24 h	Sangre y órganos
B5*	3 machos	NA	48 h	Sangre y órganos

B.4 Administración

En el momento del experimento, el peso medio de las ratas Sprague Dawley era de aproximadamente 240 g. Se inyectaron ratas no anestesiadas por vía intravenosa en la vena lateral de la cola (izquierda) a un nivel de dosis de 400 µg/kg correspondiente a una cantidad de 96 µg de proteína por rata y una actividad de aproximadamente 58 µCi por rata. El volumen de inyección fue de aproximadamente 380 µL. Los volúmenes de dosis individuales se calcularon usando el peso corporal individual de cada rata el día del tratamiento. Las ratas se colocaron en un dispositivo de contención. Para dilatar los vasos sanguíneos de la cola, la cola se sumergió en agua tibia (45°C) y luego se desinfectó con alcohol. La solución de dosificación se inyectó lentamente en la vena de la cola. Para calcular la dosis real recibida por cada rata, las jeringas se pesaron antes y después del tratamiento y se hizo el conteo de una alícuota de solución dosificadora en un contador Gamma.

B.5 Distribución en diversos órganos

En el momento del sacrificio, los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de 2,5 mL/kg de peso corporal de una mezcla de hidrocloreto de ketamina (50 mg/mL) y clorhidrato de xilazina (20 mg/mL) en PBS. Las ratas se sacrificaron rápidamente por desangre a través de punción intracardiaca. Los órganos de interés se recogieron seguido del corte en piezas para órganos que pesaban más de 2 g, como hígado, estómago, intestino delgado y colon. A continuación, cada pieza se enjuagó con suero fisiológico antes de ser limpiada con un pañuelo de papel suave, se pesó y se contó separadamente. Los órganos seleccionados fueron hígado, riñones, corazón, pulmones, bazo, músculo esquelético, fémur, cerebro, tiroides, estómago, intestino delgado con contenido, colon con contenido, piel y grasa perirrenal.

El recuento de la radiactividad tisular se realizó en un contador gamma automático (Wallace Wizard 2470-Perkin Elmer) calibrado para radionucleido de yodo 125 (eficacia: 74%, tiempo de conteo: 10 segundos).

La concentración de radiactividad en los órganos/tejidos se expresa como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g). El análisis de datos incluye el porcentaje de la dosis inyectada (% ID) y la cantidad equivalente de proteína por órgano o tejido. Para órganos bien definidos, estos se calcularon usando la radioactividad contabilizada en el órgano completo. Para la sangre, esto fue abordado suponiendo que la sangre representa el 6,4% del peso corporal total.

Además, se calculó la relación entre la radioactividad retenida en los tejidos y la radioactividad en sangre (relación de órgano/sangre). Finalmente, se calculó la relación entre la proporción órgano/sangre de sALPI-PLAP y la relación órgano/sangre de LVL-RecAP (Figura 2).

B.6 Distribución en sangre y suero de rata

Nivel radioactivo en sangre y suero

En el momento del sacrificio, las muestras de sangre se obtuvieron a partir de sangrados mediante punción intracardiaca en ratas anestesiadas mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de hidrocloreto de ketamina y clorhidrato de xilazina en PBS.

En los otros puntos de tiempo indicados en el diseño del estudio (tabla 8 y 9), la sangre se extrajo de la vena lateral de la cola (derecha) usando una aguja tipo mariposa de calibre 23 sin anestesia.

Cada muestra de sangre se recogió en tubos de Microvette pesados previamente con activador de coagulación (Sarstedt).

Los tubos se pesaron y la radioactividad se midió en el contador Gamma.

Las muestras de sangre se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego, se centrifugan durante 5 minutos a 10.000 g para preparar el suero. El suero se recogió en tubos previamente pesados y se contó en el contador Gamma.

La concentración de radioactividad en sangre y suero se expresa como porcentaje de la dosis inyectada y cantidad equivalente de sALPI-PLAP por mL.

El análisis de los datos incluye el porcentaje de la inyección calculada para el total de sangre y suero.

Las tablas 10 y 11 muestran la relación de radioactividad medida en diferentes órganos en relación con la radioactividad del suero sanguíneo de sALPI-PLAP y LVL-RecAP, respectivamente. La Figura 2 muestra la relación de la relación órgano/sangre de LVL-RecAP con respecto a la relación de órgano/sangre sALPI-PLAP. Una relación de 2, por ejemplo, indica que LVL-RecAP se dirige al órgano indicado dos veces más que sALPI-PLAP. Las relaciones más altas indican además que se encuentra relativamente más actividad de LVL-RecAP en un órgano particular cuando se usa la misma dosis.

Tabla 10: Relación de órganos/sangre para sALPI-PLAP

Órganos	0,5 H	2 H	6 H	24 H	48 H
Tiroides/Tráquea	0,1624 ± 0,0157	4,6771 ± 0,4433	31,745 ± 5,175	208,16 ± 23,74	733,85 ± 79,16
Piel	0,0307 ± 0,0035	0,2842 ± 0,0134	0,4661 ± 0,1617	0,9448 ± 0,2565	1,0787 ± 0,3686
Riñones	0,2076 ± 0,0011	0,3438 ± 0,0310	0,3535 ± 0,0219	0,3250 ± 0,0467	0,4299 ± 0,0219
Estómago	0,0446 ± 0,0016	1,0699 ± 0,1665	3,0622 ± 0,6977	1,4478 ± 0,1200	3,5819 ± 0,9018
Bazo	0,5388 ± 0,0796	0,4133 ± 0,0322	0,2880 ± 0,0283	0,2256 ± 0,0270	0,2273 ± 0,0254
Hígado	5,2403 ± 0,1943	1,9917 ± 0,0347	0,4811 ± 0,0877	0,3219 ± 0,0325	0,4676 ± 0,0295
Corazón	0,1824 ± 0,0136	0,2259 ± 0,0198	0,2605 ± 0,0217	0,2791 ± 0,0387	0,2809 ± 0,0165
Pulmones	0,1777 ± 0,0119	0,2767 ± 0,0318	0,3397 ± 0,0730	0,3833 ± 0,0091	0,3937 ± 0,0251
Músculo esquelético	0,0334 ± 0,0033	0,0978 ± 0,0193	0,0842 ± 0,0178	0,0876 ± 0,0038	0,0947 ± 0,0150
Grasa	0,0095 ± 0,0023	0,0261 ± 0,0070	0,0509 ± 0,0111	0,0615 ± 0,0065	0,0874 ± 0,0153
Cerebro	0,0160 ± 0,0031	0,0257 ± 0,0011	0,0213 ± 0,0011	0,0253 ± 0,0025	0,0408 ± 0,0063
Fémur	0,1886 ± 0,0217	0,1991 ± 0,0131	0,1901 ± 0,0155	0,1602 ± 0,0119	0,1612 ± 0,0132

(continuación)

Órganos	0,5 H	2 H	6 H	24 H	48 H
Intestino delgado	0,1882 ± 0,0247	0,8440 ± 0,1896	1,1055 ± 0,0827	1,0729 ± 0,1268	0,6329 ± 0,1044
Colon	0,0227 ± 0,0028	0,0777 ± 0,0077	0,4150 ± 0,0489	0,3473 ± 0,0596	0,3991 ± 0,0964

Tabla 11-Relación de órganos/sangre para LVL-RecAP

Órganos	0,5 H	2 H	6 H	24 H	48 H
Tiroides/Tráquea	0,5934 ± 0,0892	7,3638 ± 1,5049	52,934 ± 13,475	462,83 ± 34,395	1075,2 ± 118,65
Piel	0,0942 ± 0,0012	0,4110 ± 0,0485	0,6843 ± 0,0810	1,2130 ± 0,1243	1,9213 ± 0,8965
Riñones	0,5793 ± 0,0187	0,6425 ± 0,0555	0,6428 ± 0,0098	0,8238 ± 0,0826	1,2481 ± 0,1089
Estómago	0,2262 ± 0,1021	1,5983 ± 0,3099	6,2917 ± 3,5698	3,0042 ± 1,2012	0,9930 ± 0,3279
Baso	2,2771 ± 0,1172	1,0977 ± 0,1190	0,5831 ± 0,0292	0,3673 ± 0,0796	0,3623 ± 0,0429
Hígado	7,6513 ± 0,9295	3,8409 ± 0,0277	0,6131 ± 0,0900	0,5869 ± 0,0967	0,7940 ± 0,0133
Corazón	0,2030 ± 0,0105	0,2762 ± 0,0096	0,2780 ± 0,0316	0,2630 ± 0,0138	0,3144 ± 0,0023
Pulmones	0,3007 ± 0,0201	0,3740 ± 0,0446	0,4332 ± 0,0111	0,3966 ± 0,0235	0,4515 ± 0,0220
Músculo esquelético	0,0462 ± 0,0072	0,0997 ± 0,0142	0,1036 ± 0,0251	0,0784 ± 0,0113	0,0953 ± 0,0080
Grasa	0,0298 ± 0,0078	0,0380 ± 0,0063	0,0495 ± 0,0034	0,0781 ± 0,0155	0,0970 ± 0,0245
Cerebro	0,0261 ± 0,0052	0,0389 ± 0,0085	0,0253 ± 0,0028	0,0288 ± 0,0016	0,0646 ± 0,0100
Fémur	0,3764 ± 0,0102	0,2973 ± 0,0098	0,2460 ± 0,0149	0,1804 ± 0,0325	0,1746 ± 0,0370
Intestino delgado	0,1573 ± 0,0049	0,5625 ± 0,0393	1,0308 ± 0,1134	0,9402 ± 0,0935	0,6612 ± 0,1003
Colon	0,0361 ± 0,0047	0,1049 ± 0,0271	0,3658 ± 0,0693	0,5353 ± 0,1967	0,4787 ± 0,0712

5 Ejemplo 5

Modelo de ratón Akp2^{-/-} de hipofosfatasa en niños

10 El modelo de ratones Akp2^{-/-} de hipofosfatasa en niños es conocido en la técnica (J Dent Res 90 (4): 470-476, 2011). En resumen, los ratones Akp2^{-/-} se crearon mediante la inserción del casete Neo en el exón 6 del gen TNALP de ratón (Akp2) mediante recombinación homóloga para inactivar funcionalmente el gen Akp2, dando como resultado ARNm o proteína TNALP no detectable.

15 Los procedimientos de uso de animales y recolección de tejidos siguieron protocolos aprobados por el Comité de Ética Animal del Instituto de Investigación Médica Sanford-Burnham. Los animales se trataron con vehículo (N = 10), 1 mg de LVL-RecAP/kg/día (N = 10); 8 mg de LVL-RecAP/kg/día (N = 8) o 16 mg de LVL-RecAP/kg/día (N = 10). Se midió la supervivencia y se evaluó el desarrollo esquelético. Se evaluó la mineralización de los riñones. Se midieron los niveles de PPI en plasma, piridoxal en plasma, calcio y fosfato en plasma, se midió la longitud del fémur y/o la tibia para los diferentes grupos de tratamiento. Los datos de MicroCT se recopilaron para el análisis de la hiperosteodosis residual a cada dosis.

20 Resultados

- Mayor supervivencia a largo plazo para animales tratados a 16 mg/kg/día (Figura 3).
- Hubo un rescate (incompleto) del defecto esquelético en los huesos largos incluso a la dosis más alta (datos no mostrados).
- Hubo algún rescate en el fenotipo dental (datos no mostrados).
- Parece haber rescate de craneosinostosis (datos no mostrados, por confirmar).
- El trabajo en los riñones todavía está en curso. Hubo indicación de minerales en los riñones de ratones no tratados y menos minerales en los riñones de los ratones tratados (datos no mostrados).

30 Ejemplo 6

Reperusión isquémica en un modelo de riñón de cerdo

35 Materiales y Métodos

Información del artículo de vehículo, control y prueba

Preparación del artículo de control y prueba

40 El artículo de control reciente, solución diluyente de LVL-RecAP (placebo), se preparó para usar en el estudio antes de cada administración de dosis y se almacenó refrigerado a una temperatura de 2 a 8°C cuando no se usaba.

45 El artículo de prueba, LVL-RecAP, se utilizó tal como se recibió. No se realizó ningún ajuste para la pureza cuando se prepararon las formulaciones de los artículos de ensayo. Las formulaciones del artículo de prueba se prepararon

mezclando con el volumen apropiado de solución salina estéril para alcanzar concentraciones nominales de 0, 0,96 o 4,8 mg/mL. Las formulaciones se prepararon antes de cada administración de dosis bajo una campana de flujo laminar usando equipo estéril y técnicas asépticas. Las formulaciones se dispensaron en el número apropiado de botellas de suero de vidrio de color ámbar, se mantuvieron en hielo antes de su uso y se usaron para la dosificación dentro de las 2 horas de la preparación. En ocasiones, se hicieron preparaciones adicionales según fue necesario durante el curso del estudio.

Análisis de formulaciones de dosificación

Se recogieron muestras por duplicado de 0,5 mL de la formulación de dosificación final antes de la dosificación cada día de preparación el Día 0 (Grupos 3 a 7) y el Día 7 (Grupo 7). Las muestras se obtuvieron de los estratos medios y se almacenaron congeladas (-50 a -90°C) para un posible análisis futuro.

Información del sistema de prueba

15 Adquisición y Aclimatación Animal

Se recibieron cerdos cruzados Yorkshire domésticos experimentalmente sin modificar machos (cerdos de granja) (aproximadamente de 8 a 10 semanas de edad, en el momento de la recepción) de Midwest Research Swine, Gibbon, Minnesota. Durante el período de aclimatación de 10 a 28 días, los animales se observaron diariamente con respecto al estado general de salud y cualquier signo de enfermedad. Se realizaron evaluaciones de huevos y parásitos en muestras de heces, y todos los resultados fueron negativos para los animales que se colocaron en estudio.

Aleatorización, Asignación para el estudio y mantenimiento

Usando procedimientos separados de aleatorización simple, los animales (que pesaban 12,5 a 25,0 kg en el momento de la aleatorización) fueron asignados a los grupos de control y tratamiento identificados en la siguiente Tabla 12.

Tabla 12: Asignación de grupos			
		Número de animales machos ^a	
Número de grupos	Nivel de dosis	Inicial	Evaluable
1	Control	7	6
2	Simulado ^b	7	6
5	0,32 mg/kg	7	6
6	1,6 mg/kg	7	7
7	0,32 mg/kg/día ^c	7	7
^a En el día 0, los animales se sometieron a un procedimiento quirúrgico durante el cual se extrajo el riñón izquierdo o derecho y se ocluyó la arteria renal contralateral durante 45 minutos. Después de la oclusión, se permitió la reperusión del vaso. Siete animales fueron sometidos a cirugía en cada grupo con la intención de lograr seis animales en estudio.			
^b Los animales simulados se sometieron al procedimiento quirúrgico durante el cual se extrajo el riñón izquierdo. Sin embargo, la oclusión renal y la reperusión no se realizaron.			
^c En el día 0, la mitad de la dosis se administró antes de la reperusión y la mitad restante de la dosis se administró a las 8 ± 2 horas después de la reperusión. Se administró una dosis completa diariamente durante el resto del período de vida.			

Los animales seleccionados para el estudio fueron tan uniformes en edad y peso como fue posible. Un veterinario evaluó la salud de los animales antes de la colocación en el estudio. Los animales extra obtenidos para el estudio, pero no colocados en el estudio, se transfirieron a la colonia madre.

A cada animal se le asignó un número de animal utilizado en el sistema de recolección de datos Provantis^{MR} y se le implantó un microchip que llevaba un número de identificación único. Cada animal también fue identificado por una etiqueta de oreja del vendedor. El número de animal individual, el número de implante, el número de etiqueta de oreja y el número de estudio comprendían una identificación única para cada animal. Cada jaula se identificó por el número de animal, número de estudio, número de grupo y sexo.

Los animales se alojaron individualmente en sitios con piso elevado o jaulas móviles de acero inoxidable con piso revestido de plástico. Este tipo de alojamiento proporcionó un espacio adecuado para el ejercicio de estos animales. El enriquecimiento animal fue proporcionado de acuerdo con MPI Research SOP. Se proporcionó iluminación fluorescente durante aproximadamente 12 horas por día. El ciclo oscuro se interrumpió intermitentemente debido a las actividades relacionadas con el estudio. La temperatura y la humedad se monitorearon, registraron y mantuvieron continuamente en la medida de lo posible dentro de los intervalos designados por el protocolo de 61 a 81°F y 30 a 70%, de humedad respectivamente. Los hallazgos actuales de temperatura y humedad no se informan, pero se mantienen en el archivo de estudio.

Se ofreció dieta (Certified Lab Diet® # 5K99, PMI Nutrition International, Inc.) mediante alimentaciones limitadas, excepto durante los períodos designados. El enriquecimiento de los alimentos, incluidos los trozos de fibra o comprimidos, se

ofreció según fuera necesario.

Procedimientos quirúrgicos

5 Medicamentos relacionados con el procedimiento

La siguiente Tabla 13 a continuación presenta los medicamentos relacionados con el procedimiento y los niveles de dosis usados durante el curso del estudio.

Tabla 13: Medicamentos y niveles de medicación relacionados con el procedimiento		
Intervalo, nivel de dosis, y ruta		
Medicación	Cirugía (día 0)	Posterior a la cirugía en forma diaria
Maleato de acepromazina	0,1 mg/kg IM	-
Sulfato de atropina	0,05 mg/kg IM	-
Telazol	5 a 8 mg/kg IM	-
Isoflurano	Para efectuar por inhalación	-
Buprenorfina	0,02 mg/kg IM TID	0,02 mg/kg IM TID x 3 días
Ketoprofeno	3 mg/kg IM	3 mg/kg IM SID x 3 días
Cefazolina	25 mg/kg IV	-
Ceftiofur	2,2 mg/kg IM	2,2 mg/kg IM SID x 3 días
Solución de Ringer Lactato (LRS)	10 a 15 mL/kg/h IV	-
Marcaína	2 mg/kg INF	-
NaCl al 0,9%	según sea necesario para irrigación	-
IV - Intravenosa	INF - Infundido en la incisión	TID - dos veces al día (cada 6 a 9 horas)
IM - Intramuscular	SID - Una vez al día	

10

Se llevaron a cabo procedimientos pre y postoperatorios de acuerdo con MPI Research SOP. Los animales se dejaron en ayunas durante al menos 8 horas antes de la cirugía y la anestesia se indujo y se mantuvo como se indica en la Tabla 13. La temperatura corporal se mantuvo a $37 \pm 3^\circ\text{C}$. Antes de la cirugía, se realizaron ecografías para determinar si había quistes renales. Si no se observaron quistes, se extrajo el riñón izquierdo y se trató el riñón derecho como se describe a continuación. Si los quistes estaban presentes en un riñón, ese riñón se eliminó y el riñón contralateral se sometió al procedimiento de oclusión. Si los quistes estaban presentes en ambos riñones, el animal fue retirado del estudio sin someterse al procedimiento quirúrgico.

15

Procedimiento quirúrgico

20

Se indujo una lesión de isquemia/reperfusión renal usando el procedimiento publicado por Lee et al., (J. Vet. Med. Sci 72 (1): 127-130). Una vez anestesiados, todos los animales se colocaron en decúbito dorsal y los sitios quirúrgicos se prepararon con toallitas alternas de exfoliante y solución de clorhexidina. Se realizó una laparotomía en la línea media para exponer ambos riñones. Según los hallazgos ecográficos, se retiró el riñón izquierdo o derecho.

25

Para los animales del Grupo 2 (Simulación), las esponjas insertadas se retiraron y se tomaron en cuenta y se lavó el abdomen con cloruro de sodio tibio. El abdomen se cerró de manera rutinaria y la piel se cerró con grapas para la piel y pegamento tisular. Luego se permitió que los animales se recuperaran.

30

Para todos los demás animales, después de la remoción del riñón designado, los vasos renales restantes se aislaron y retrajeron usando bucles de vaso. Los bucles de los vasos se usaron para ocluir los vasos durante $45 (\pm 1)$ minutos, después de lo cual se permitió la reperfusión de los vasos. Se administró una dosis de bolo intravenoso del artículo de control o prueba a un volumen de dosis de 0,333 mL/kg (se administró la mitad de la dosis de 0,167 mL/kg a animales del Grupo 7) justo antes de la reperfusión. Para todos los animales del grupo 1, 5 y 6 (control, 0,32 y 1,6 mg/kg), se retiraron luego las esponjas implantadas y contabilizadas, el abdomen se lavó y se cerró como se describió anteriormente, y se permitió que los animales se recuperaran. Para todos los animales del Grupo 7 (0,32 mg/kg/día), se realizó una incisión en la ingle y se aisló la vena femoral izquierda o derecha. Se hizo avanzar un catéter en el vaso y el catéter se tunelizó debajo de la piel y se exteriorizó a través de una incisión realizada en el tórax. Se adjuntó un puerto y se ancló al músculo con sutura no absorbible. Las esponjas implantadas fueron luego retiradas y contabilizadas, el abdomen fue lavado y cerrado como se describió anteriormente, y se permitió que los animales se recuperaran.

35

40

Administración de artículos de prueba o control

45

El día 0, el artículo de control o prueba se administró por vía intravenosa a todos los animales del Grupo 1, 5 y 6 justo antes de la reperfusión a una dosis completa de 0, 0,32 y 1,6 mg/kg, respectivamente. Todas las dosis se administraron a un volumen de dosis de 0,333 mL/kg. También el día 0, el artículo de prueba se administró por vía intravenosa a todos los animales del Grupo 7 a un nivel de dosis combinada de 0,32 mg/kg en dos medias dosis separadas de 0,16 mg/kg a un volumen de dosis de 0,167 mL/kg. La primera dosis se administró justo antes de la reperfusión y la segunda dosis se administró aproximadamente a las $8 (\pm 2)$ horas después de la reperfusión. Se administraron dosis completas de 0,32

mg/kg/día (0,333 mL/kg) a todos los animales del Grupo 7 los Días 1 a 7 aproximadamente a la misma hora del día que la dosis inicial del Día 0 ($\pm$ 2 horas).

Estadística

5

La Tabla 14 a continuación define el conjunto de comparaciones utilizadas en los análisis estadísticos descritos en esta sección.

Tabla 14: Tabla de comparaciones estadísticas	
Grupo de referencia	Grupos de comparación
1	2, 5, 6, 7
2	5, 6, 7
5	7

Los datos sin procesar se tabularon dentro de cada intervalo de tiempo, y se calcularon la media y la desviación estándar para cada punto final y grupo. Para las concentraciones séricas de creatinina, los grupos de tratamiento se compararon con los grupos de referencia usando el análisis de medidas repetidas de covarianza (RMANCOVA).

10

Análisis de medidas repetidas de covarianza (RMANCOVA)

Para los puntos finales medidos a tres o más intervalos de tiempo posteriores a la prueba, se realizó un análisis de medidas repetidas (modelo mixto). Para cada punto final, el modelo probó los efectos del tratamiento, el tiempo y la interacción del tratamiento y el tiempo. Los datos previos a la prueba (última medición antes de la dosificación) se incluyeron en el modelo como covariables.

15

Si no hubo tratamiento significativo ($p > 0,05$) por interacción de tiempo, se evaluó el efecto principal del tratamiento. Si el efecto del tratamiento no fue significativo ($p > 0,05$), los resultados se consideraron no significativos y no se realizaron análisis adicionales sobre la variable. Si el efecto del tratamiento fue significativo ($p < 0,05$), se construyeron contrastes lineales para la comparación por pares de cada grupo de tratamiento con el grupo de referencia. Si la interacción fue significativa ($p < 0,05$), cada grupo de tratamiento se comparó con el grupo de referencia apropiado a través del efecto simple de 'tratamiento' para cada punto de tiempo. Estas comparaciones por pares de efecto simple se obtuvieron a partir de la interacción de 'tratamiento por tiempo'.

20

25

Los resultados de todas las comparaciones por pares se informan a los niveles de significancia de 0,05 y 0,01. Todas las pruebas fueron de dos colas.

30

Resultados

Creatinina en suero

Como se muestra en la Figura 4, hubo elevaciones leves a moderadas de creatinina en todos los intervalos, con respecto a los valores previos a la prueba. La creatinina tiende a aumentar al máximo a las 24 horas después de la reperusión, y luego disminuye gradualmente en intervalos posteriores. Los cambios en la creatinina fueron consistentes con una reducción de la filtración glomerular posterior a una lesión renal relacionada con el procedimiento (datos no mostrados). En la mayoría de los grupos de tratamiento, y en la mayoría de los intervalos, la administración del artículo de prueba tendió a atenuar las elevaciones de la creatinina relacionadas con el procedimiento, mostrando el efecto protector de LVL-RecAP.

35

40

Como se ilustra en la Figura 5, hubo aumentos dependientes de la dosis en la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en todos los grupos de tratamiento que recibieron el artículo de prueba a las 24 horas después de la reperusión, con respecto a los valores previos a la prueba. La actividad de ALP disminuyó gradualmente en los grupos de tratamiento que recibieron $\leq 1,6$ mg/kg, pero continuó aumentando progresivamente en los animales que recibieron 0,32 mg/kg/día.

45

Ejemplo 7

Pruebas de seguridad en humanos

50

Material y métodos

Objetivos:

55

Evaluar la seguridad y tolerabilidad de dosis únicas y múltiples de fosfatasa alcalina recombinante mejorada (LVL-recAP) administrada por infusión intravenosa (i.v.) en sujetos sanos.

Determinar la farmacocinética (PK) de LVL-recAP después de infusión i.v. de dosis únicas y múltiples de LVL-recAP en sujetos sanos.

60

Diseño y tratamientos

Este es un estudio de 2 partes en un solo centro en un número planificado de 50 sujetos sanos. La Parte A será un estudio aleatorizado, doblemente ciego, controlado con placebo, de dosis única ascendente (SAD) en hasta 4 grupos secuenciales de 8 sujetos masculinos y femeninos sanos (6 en LVL-recAP y 2 en placebo). Se intentará incluir en cada grupo de tratamiento un número igual de sujetos masculinos y femeninos, con un mínimo de 2 y un máximo de 4 sujetos femeninos por grupo. Se administrará una sola dosis de LVL-recAP o placebo mediante 1 hora de infusión i.v. La Parte B será un estudio aleatorizado, doblemente ciego, controlado con placebo, de dosis ascendente múltiple (MAD) en hasta 2 grupos de 9 sujetos sanos de ambos sexos (6 en LVL-recAP y 3 en placebo). Se intentará incluir en cada grupo de tratamiento un número igual de sujetos masculinos y femeninos, con un mínimo de 2 y un máximo de 4 sujetos femeninos por grupo. Los sujetos recibirán 1 hora i.v. infusión de LVL-recAP o placebo en los días 1, 3 y 5.

Se administrarán los siguientes tratamientos:

15 Parte A

Grupo 1: infusión durante 1 hora de 200 U/kg de LVL-recAP
 Grupo 2: infusión durante 1 hora de 500 U/kg de LVL-recAP
 Grupo 3: infusión durante 1 hora de 1.000 U/kg de LVL-recAP
 Grupo 4: infusión durante 1 hora de 2.000 U/kg LVL-recAP

Parte B

Grupo 5: infusiones durante 1 hora de 500 U/kg de LVL-recAP en los días 1, 2 y 3
 Grupo 6: infusiones durante 1 hora de 1.000 U/kg de LVL-recAP en los días 1, 2 y 3

Después de completar el Día 9 del Grupo 1 y el Día 4 del Grupo 2 de la Parte A, se realizará una evaluación PK provisional.

Dependiendo de los resultados, los programas de infusión y muestreo PK pueden ajustarse para los grupos SAD y MAD restantes.

En este primer estudio en humanos, los sujetos que participan en el nivel de dosis más bajo en la Parte A (Grupo 1) se dosificarán de acuerdo con un diseño de dosificación centinela para garantizar un riesgo mínimo. Esto significa que inicialmente se dosificarán dos sujetos. Uno de estos sujetos recibirá la medicación activa LVL-recAP y el otro sujeto recibirá placebo. Si los resultados de seguridad y tolerabilidad de las primeras 24 horas después de la dosificación para los sujetos iniciales son aceptables para el Investigador Principal, los otros 6 sujetos del nivel de dosis más bajo se dosificarán de forma aleatoria controlada con placebo (5 activos y 1 con placebo).

Periodo de observación

Parte A: desde el Día -1 hasta las 48 horas (Día 3) después de la administración del fármaco. Visitas cortas y ambulatorias al centro de investigación clínica los Días 4, 6, 9 y 15
 Parte B: desde el Día -1 hasta las 48 horas (Día 7) después de la última administración del medicamento.

Las visitas ambulatorias cortas al centro de investigación clínica en los Días 8, 10, 13 y 19 se evaluarán los sujetos para determinar su elegibilidad dentro de las 3 semanas previas a la (primera) administración del medicamento de cada grupo del estudio.

Los exámenes de seguimiento se llevarán a cabo el Día 15 (Parte A) y el Día 19 (Parte B).

Sujetos

Parte A: 32 sujetos masculinos y femeninos sanos
 Parte B: 18 sujetos masculinos y femeninos sanos

Principales criterios para la inclusión

Género: masculino o femenino
 Edad: 18-55 años, inclusive
 Índice de Masa Corporal (IMC): 18,0-30,0 kg/m², inclusive

Fármaco en estudio

Fármaco activo

Sustancia activa: LVL-recAP, una forma recombinante mejorada de fosfatasa alcalina humana endógena (AP)

- Actividad: una enzima hidrolasa responsable de la desfosforilación de monoésteres de ácido fosfórico
Indicación: lesión renal aguda
Concentración: 600, 1500, 3000 y 6000 U/mL
Forma de dosificación: infusión i.v.
5 Fabricante: farmacia de PARA
- Placebo
- 10 Sustancia: citrato 20 mM, sorbitol 250 mM, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 pM, pH 7,0
Actividad: ninguna
Indicación: no aplicable
Concentración: no aplicable
Forma de dosificación: infusión i.v.
Fabricante: Nova Laboratories Ltd, Gloucester Crescent, Wigston, Leicester, LE18 4YL, Reino Unido
- 15 Criterios para la evaluación
- 20 Seguridad: eventos adversos (AE), signos vitales (incluyendo presión arterial sistólica y diastólica supina, pulso, temperatura corporal, frecuencia respiratoria), electrocardiograma de 12 derivaciones (ECG), monitoreo cardíaco continuo (telemetría), ensayos de laboratorio clínico (incluida la química clínica [AP se considera un parámetro PK], hematología y análisis de orina), examen físico y anticuerpos antifármacos (ADA)
Farmacocinética: parámetros PK basados en el análisis de las concentraciones en suero de la actividad de LVL-recAP y AP.
- 25 Resultados
- Los períodos de dosificación y tiempo de observación para todos los grupos de dosificación se han completado y no se observaron eventos adversos graves en ninguno de los grupos. El análisis de todos los parámetros medidos está en curso.
- 30 Ejemplo 8
- Materiales y métodos
- 35 Ratones
- La generación y caracterización de los ratones *Alpl*^{-/-} ha sido reportada previamente (Narisawa et al., 1997). Los ratones *Alpl*^{-/-} fenocopia HPP en niños, incluyendo la deficiencia global de TNAP, acumulación de PPi y defectos de mineralización (Fedde et al., 1999; Narisawa et al., 2001; Anderson et al., 2004; Millan et al., 2008). La suplementación dietética con vitamina B6 suprime brevemente las convulsiones y extiende la vida hasta los días 18-22 después del nacimiento, pero la hipomineralización y la acumulación de osteoide continúan empeorando con la edad (Narisawa et al., 1997; Fedde et al., 1999; Narisawa et al., 2001; Millán et al., 2008). Por lo tanto, todos los animales (criadores, madres que amamantan, cachorros y destetados) en este estudio tuvieron acceso libre a la dieta de roedores de laboratorio modificada 5001 que contenía niveles aumentados (325 ppm) de piridoxina. La genotipificación se realizó por PCR en ADN genómico como se describió previamente (Yadav et al., 2011). El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) aprobó todos los estudios en animales.
- 40 Fosfatasa alcalina humana quimérica soluble (LVL-RecAP)
- 50 Se usó una solución de LVL-RecAP a 10,1 mg/mL en glicerol al 25% p/v, Tris/HCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 µM, y a pH 8,0. La enzima tenía una pureza de > 99,99% como se determinó por cromatografía líquida de alta resolución.
- Estudio de respuesta a la dosis con LVL-RecAP
- 55 Se dividieron los ratones *Alpl*^{-/-} en 5 cohortes: Tratados con vehículo: ratones *Alpl*^{-/-} tratados solo con vehículo (n = 14); LVL-RecAP 1: ratones *Alpl*^{-/-} tratados con LVL-RecAP a razón de 1 mg/kg/día (n = 14); LVL-RecAP8: ratones *Alpl*^{-/-} tratados con LVL-RecAP a razón de 8 mg/kg/día (n = 12); y LVL-RecAP 16: ratones *Alpl*^{-/-} tratados con LVL-RecAP a razón de 16 mg/kg/día (n = 10). Los compañeros de camada silvestres de ratones *Alpl*^{-/-} sirvieron como animales de referencia y no recibieron inyecciones (n = 14). Las cohortes con vehículo o LVL-RecAP se inyectaron diariamente SC en la región escapular. Las inyecciones se administraron entre las 8:00 y 11:00 a.m. Los volúmenes administrados se calcularon en base al peso corporal medido antes de la inyección. Todos los tratamientos comenzaron en el día 1 después del nacimiento y se repitieron diariamente durante hasta 53 días o hasta el momento de la necropsia.
- 60 Recolección de muestra
- 65 Se realizó una necropsia en el día 53 después del nacimiento (p53), 24 h después de la inyección final de LVL-RecAP

para aquellos animales que completaron el protocolo experimental, o antes para aquellos animales que parecían enfermos terminales. Se administró Avertina por vía intraperitoneal antes de la eutanasia. La sangre se recogió en tubos de heparina de litio mediante punción cardíaca. La necropsia consistió en un examen de patología macroscópica y radiografías.

5 Radiografía y tomografía microcomputarizada (μCT)

Se obtuvieron imágenes radiográficas de esqueletos con un Faxitron MX-20 DC4 (Chicago, IL, EE. UU.), usando una energía de 20 kV. Se escanearon hemimandíbulas a 30 kV. Se fijaron cráneos enteros diseccionados de ratones P21, luego se escanearon a una resolución de voxels isotrópicos de 18 μm usando el sistema de obtención de imágenes de μCT eXplore Locus SP (GE Healthcare Pre-Clinical Imaging, Londres, ON, Canadá). Las mediciones se tomaron a un voltaje operativo de 80 kV y 80 mA de corriente, con un tiempo de exposición de 1.600 ms utilizando la técnica de escaneo del método Parker, que gira la muestra 180 grados más un ángulo de abanico de 20 grados. Los escaneos se calibraron con un fantasma de hidroxipatita y las imágenes tridimensionales se reconstruyeron a un tamaño de vóxel efectivo de 18 μm³. Se usó un umbral fijo de 1.400 Unidades Hounsfield para discriminar tejido mineralizado. Las regiones de interés (ROI) para huesos parietales y frontales se establecieron como 1 mm de longitud, 1 mm de ancho, profundidad equivalente al grosor del hueso y posición comenzando a una distancia de 0,75 mm de las suturas sagital y coronal, como se describió previamente (Liu et al., 2014). Los parámetros de volumen, densidad y estructura ósea se midieron utilizando el software Microview versión 2.2 (GE Healthcare Pre-Clinical Imaging, Londres, ON) y algoritmos establecidos (Meganck et al., 2009; Umoh et al., 2009). Se realizaron pruebas t de Student que comparaban resultados cuantitativos para establecer diferencias estadísticamente significativas entre genotipos. Se analizaron los datos de hueso por μCT y se informaron de acuerdo con las recomendaciones de Bouxsein et al. 2010 (Bouxsein et al., 2010).

Para la formación de imágenes dentales, las hemimandíbulas disecadas se exploraron en un μCT 50 Scanco Medical (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Suiza) con un tamaño de vóxel de 10 μm. Los apilamientos mandibulares en dirección z se exportaron como archivos DICOM y se reorientaron utilizando el software ImageJ (1.48r), con planos de sección coronal, sagital y transversal comparables elegidos para comparación. Para el análisis cuantitativo, las mandíbulas se escanearon en un μCT 35 Scanco Medical con un tamaño de vóxel de 6 μm, 55 Kv, 145 mA, con un paso de rotación de 0,36 grados (rango angular de 180 grados) y una exposición de 400 ms por vista. El software Scanco de μCT (HP, DECwindows Motif 1.6) se usó para la reconstrucción tridimensional y la visualización de imágenes. Después de la reconstrucción tridimensional, los volúmenes de corona, esmalte, raíces y hueso alveolar se segmentaron utilizando un umbral global de 0,6 g/cc. El volumen total (TV), el volumen óseo (BV) (tejido mineralizado) y la densidad mineral tisular (TMD) se midieron para toda la corona y separadamente para el esmalte, la dentina de la raíz y el hueso alveolar en la región de furcación. Para el esmalte y la raíz, también se midió el espesor.

35 Análisis histológicos

Las muestras de hueso se limpiaron, se fijaron en solución salina regulada con paraformaldehído / fosfato al 4% durante 3 días a 4°C, y luego se transfirieron a etanol al 70% para su almacenamiento a 4°C. Las secciones de plástico se prepararon como se describió anteriormente (Yadav et al., 2012). La tinción con tricómico de Von Kossa y Van Gieson se realizó en secciones de plástico como se describió previamente (Narisawa et al., 1997). Las secciones teñidas con Von Kossa o Van Gieson se escanearon mediante el sistema ScanScopeXT (Aperio, Vista, CA, EE. UU.), y las imágenes se analizaron usando el software Bioquant Osteo (Bioquant Osteoanalysis Co., Nashville, TN, EE. UU.). Las hemimandíbulas izquierdas usadas para histología se fijaron en solución de Bouin durante 24 h, y después se desmineralizaron en solución de AFS (ácido acético, formaldehído, cloruro de sodio) y se incluyeron en parafina para el corte en serie, como se describió anteriormente (Foster, 2012). Para la tinción con rojo picrosirius, las secciones de tejido desparafinado se tiñeron con una solución acuosa al 0,2% de hidrato de ácido fosfomolibdico, 0,4% de rojo Directo 80 y 1,3% de 2,4,6-trinitrofenol (Polysciences, Inc., Warrington, PA), como se describió anteriormente. (Foster, 2012). Se observaron secciones teñidas con rojo picrosirius bajo luz polarizada para fotomicrografía.

50 Pruebas biomecánicas

Después de la remoción del tejido muscular, se midieron las longitudes del fémur, la tibia, el húmero y el radio con un calibrador. Los huesos fueron congelados, envueltos en una gasa que contenía una solución salina para evitar la deshidratación. Los fémures aislados y las tibias se evaluaron con una prueba de flexión de tres puntos mediante el uso de la máquina universal de prueba de materiales Instron 1101 tal como se describió anteriormente (Huesa et al., 2011). Los huesos se descongelaron lentamente y se mantuvieron a temperatura ambiente antes de la prueba. Los fémures y tibias intactos se colocaron en la máquina de prueba sobre dos soportes separados por una distancia de 15 mm y se aplicó carga a la mitad de la diáfisis, creando así una prueba de flexión de tres puntos a una velocidad de 2 mm min⁻¹.

60 Ensayo de PPI

Las concentraciones de PPI en plasma se determinaron por adsorción diferencial sobre carbón activado de UDP-D-[6-3H] glucosa (Amersham Pharmacia) a partir del producto de reacción 6-fosfo[6-3H]gluconato, como se describe en (Hessle et al., 2002; Yadav et al., 2014).

65 Estadística

Considerando que las diferentes concentraciones de LVL-RecAP daban como resultado diferentes tasas de supervivencia, no fue posible comparar las tres cohortes de tratamiento en una combinación por edades. Por esta razón, se realizó una prueba de Student t desapareada, paramétrica, de dos colas para comparar los ratones *Alpl*^{-/-} con la cohorte de TS. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. Para comparar las diferencias en las curvas de supervivencia entre las cohortes de tratamiento, se realizó la prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Resultados

Aumento de la supervivencia y del peso corporal en ratones *Alpl*^{-/-} tratados con LVL-RecAP

La supervivencia en ratones que recibieron 8 mg/kg/día (LVL-RecAP8) o 16 mg/kg/día (LVL-RecAP 16) de LVL-RecAP mejoró significativamente en comparación con ratones tratados con vehículo y la cohorte de 1 mg/kg/día (LVL-RecAP 1) ($p = 0,001$) (Figura 6A). Las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando las curvas de supervivencia de las cohortes tratadas se compararon entre sí ($p < 0,0001$ para todas las comparaciones). La mediana de supervivencia fue de 44, 22 y 19 días en las cohortes tratadas con LVL-RecAP8, LVL-RecAP 1 y con vehículo, respectivamente. No se pudo calcular la mediana de supervivencia para la cohorte de LVL-RecAP 16 ya que los animales vivieron hasta la finalización del experimento el día 53.

Los animales *Alpl*^{-/-} pesan menos que sus compañeros de camada de TS, comenzando alrededor de p7. El tratamiento con 1 mg/kg/día de LVL-RecAP condujo a un aumento estadísticamente significativo del peso corporal en comparación con los ratones tratados con vehículo, y una diferencia no significativa en comparación con los compañeros de camada de TS a los 18 días de tratamiento (Figura 6B). Los ratones *Alpl*^{-/-} generalmente mueren por p18-24 con dieta de vitamina B6, por lo tanto, no fue posible comparar las cohortes de LVL-RecAP8 y LVL-RecAP 16 de vida más larga con los ratones tratados con vehículo, que se compararon con ratones de TS. Los animales en la cohorte de LVL-RecAP8 pesaron significativamente menos que sus compañeros de camada de TS de p18 (Figura 6B) mientras que los ratones en la cohorte de LVL-RecAP 16 mostraron normalización en el peso corporal, y fueron indistinguibles de los ratones de TS en p53 (Figura 6B).

El tratamiento con LVL-RecAP mejora el fenotipo esquelético de ratones *Alpl*^{-/-}

Radiografías de ratones *Alpl*^{-/-} sin tratar (Figura 7A) demostraron anomalías esqueléticas profundas que incluyen densidad mineral tisular reducida y huesos fracturados, como se describió previamente (Yadav et al., 2011). Se encontró una mejoría en la patología esquelética en ratones *Alpl*^{-/-} que recibían 1 mg/kg/día de LVL-RecAP durante 18 días (Figura 7A), y el beneficio fue más profundo en las cohortes de LVL-RecAP8 y LVL-RecAP 16 (Figura 7B). Las extremidades distales mostraron una morfología normalizada, independientemente de la dosis, mientras que se observó una corrección parcial en la columna vertebral, extremidades anteriores, extremidades posteriores y caja torácica para todas las cohortes de tratamiento. Los ratones con LVL-RecAP8 y LVL-RecAP 16 también presentaron grietas o fracturas menores en fémures y tibias. El contorno articular en rodillas y codos presentó irregularidades en LVL-RecAP8 y LVL-RecAP 16 en p44 y p53, respectivamente (Figura 7).

Para evaluar el grado de mejora de la osteomalacia, se realizó un análisis histomorfométrico de secciones no descalcificadas y embebidas en plástico de las extremidades posteriores de ratones tratados con LVL-RecAP y de control de TS (Figuras 8A y 9A). Se midieron los volúmenes de hueso y osteoide (Figuras 8B, 8C) y también se analizaron los niveles en suero de PPI (Figuras 9B, 9C). De acuerdo con los hallazgos anteriores (Yadav et al., 2011), la tinción de von Kossa reveló que los ratones *Alpl*^{-/-} muestran graves defectos en la mineralización, hueso cortical delgado, hueso trabecular reducido y centros de osificación dañados (Figura 8A), mientras que ambos animales tratados con LVL-RecAP8 y LVL-RecAP 16 mostraron hueso cortical significativamente mejorado y centros de osificación mejorados secundarios. La histomorfometría (Figuras 8B, 8C) reveló que la relación BV/TV (Figura 8B), tanto en las cohortes de LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16, era todavía significativamente menor que en los controles de TS de la misma edad (0,0321 y 0,0302, $N = 9$), mientras que el porcentaje de OV/BV (Figura 8C) fue significativamente mayor para ambas cohortes de tratamiento en comparación con los controles de TS (0,0001 y 0,0175, $N = 9$). Las diferencias entre las cohortes de tratamiento con LVL-RecAP8 y LVL-RecAP 16 no fueron estadísticamente significativas. La tinción tricrómica histológica (Figura 9A) en secciones de plástico de las patas traseras confirmó estos hallazgos. Los ratones *Alpl*^{-/-} tienen una masa ósea mineralizada muy reducida (regiones teñidas de verde), con deficiencias en el hueso cortical y trabecular marcadas por la acumulación osteoide (regiones teñidas de rojo). Por el contrario, los controles de TS de 53 días tienen huesos corticales robustos, hueso trabecular presente en las osificaciones secundarias y poco osteoide en las superficies óseas. Los ratones *Alpl*^{-/-} en las cohortes de LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 muestran una mejoría significativa en hueso cortical, especialmente en la cohorte de LVL-RecAP16, donde no se observaron diferencias importantes en comparación con ratones de TS. Mientras que la formación de hueso trabecular en los centros de osificación secundarios en ratones *Alpl*^{-/-} mejora con el tratamiento, los ratones con LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 aún conservan regiones de osteoide más grandes que lo normal (rojo). De acuerdo con los hallazgos esqueléticos, se encontró la corrección de las concentraciones en suero de PPI en todas las cohortes de tratamiento. Los animales con LVL-RecAP1 (Figura 9B) albergan niveles de PPI significativamente reducidos en comparación con los animales de control tratados con vehículo. Los animales tratados con LVL-RecAP16 tienen niveles de PPI que son estadísticamente indistinguibles de los de las camadas de TS.

Ausencia de anomalías craneofaciales en ratones *Alpl*^{-/-} tratados con LVL-RecAP

Los ratones *Alpl*^{-/-} presentan anomalías de forma craneofacial y fusión de sutura coronal (Liu et al., 2014). Para determinar hasta qué punto el esqueleto craneofacial se ve afectado por el tratamiento en ratones *Alpl*^{-/-}, se realizaron análisis basados en μ CT de huesos craneales frontales y parietales. Los resultados en p21 muestran que los huesos frontales y parietales de los ratones *Alpl*^{-/-} tratados con vehículo se redujeron significativamente en la fracción de volumen óseo, contenido mineral óseo, densidad mineral ósea, contenido mineral tisular y densidad mineral tisular en comparación con ratones de TS o *Alpl*^{-/-} tratados (Tabla 15). Por el contrario, ni los huesos frontales ni parietales de los ratones *Alpl*^{-/-} tratados fueron significativamente diferentes de los ratones de tipo silvestre. Las calaveras adultas de ratones *Alpl*^{-/-} tratados con LVL-RecAP 16 no parecían diferentes de los de TS en términos de tamaño y forma (Figura 10).

Tabla 15. Análisis de μ CT de los huesos craneales. Se analizaron los huesos frontales y parietales en ratones de TS, *Alpl*^{-/-} no tratados (vehículo) y *Alpl*^{-/-} tratados con RecAP 16 en p21. Los valores se informan como las medias $\pm$ SD.

	Fracción de volumen óseo	Contenido mineral óseo (mg)	Densidad mineral óseo (mg/cc)	Contenido mineral tisular (mg)	Densidad mineral tisular (mg)
FRONTAL					
<i>Alpl</i> ^{-/-}	0,41 $\pm$ 0,06 *	0,008 $\pm$ 0,001 *	464 $\pm$ 27 *	0,004 $\pm$ 0,001 *	595 $\pm$ 28 *
LVL-RecAP16	0,72 $\pm$ 0,15	0,018 $\pm$ 0,005	615 $\pm$ 84	0,015 $\pm$ 0,006	697 $\pm$ 57
TS	0,70 $\pm$ 0,12	0,019 $\pm$ 0,008	615 $\pm$ 79	0,016 $\pm$ 0,008	709 $\pm$ 56
PARIETAL					
<i>Alpl</i> ^{-/-}	0,52 $\pm$ 0,05 *	0,018 $\pm$ 0,001 *	494 $\pm$ 21 *	0,005 $\pm$ 0,001 *	597 $\pm$ 12 *
LVL-RecAP16	0,72 $\pm$ 0,08	0,018 $\pm$ 0,007	608 $\pm$ 74	0,015 $\pm$ 0,006	691 $\pm$ 61
TS	0,76 $\pm$ 0,10	0,020 $\pm$ 0,007	645 $\pm$ 73	0,017 $\pm$ 0,007	726 $\pm$ 51

* Indica la significancia estadística entre genotipos y entre cohortes de tratamiento.

El tratamiento con LVL-RecAP rescata parcialmente los defectos dentoalveolares de *Alpl*^{-/-}

La ablación de *Alpl* en ratones dio como resultado el desarrollo de defectos de mineralización en el cemento, dentina, hueso alveolar y esmalte (Foster et al., 2014a, Foster et al., 2014b, McKee et al., 2011; Yadav et al., 2012), consistente con informes de casos en sujetos humanos con HPP. La ausencia de cemento acelular da como resultado la pérdida de la unión periodontal a la superficie de la raíz del diente y la exfoliación prematura de los dientes, una característica distintiva de la HPP. Ratones *Alpl*^{-/-} tratados con LVL-RecAP8 y tratados con vehículo se compararon con los de TS en p25-26, cuando la formación del diente molar está casi terminada. La radiografía y la formación de imágenes por μ CT revelaron que, en comparación con los controles (Figuras 11A, D), las mandíbulas de ratón *Alpl*^{-/-} sin tratar presentaban hueso extremadamente hipomineralizado, molares cortos con dentina delgada y cámaras de pulpa anchas, e incisivos gravemente defectuosos (Figura 11B, F). Por histología, los dientes de ratón *Alpl*^{-/-} no presentaban cemento acelular, y el osteoide alveolar invadió el espacio del ligamento periodontal (PDL), lo que condujo a la anquilosis y la pérdida de un periodonto funcional (Figura 11G frente a 11E). La administración de 8 mg/kg/día de LVL-RecAP mejoró la apariencia radiográfica de la altura molar, el grosor de la dentina y la mineralización ósea en p26, aunque el incisivo permaneció defectuoso (Figura 11C, H). Histológicamente, aunque esta dosis de LVL-RecAP no restauró el cemento acelular a la superficie de la raíz, el espacio PDL asociado a los molares y los bordes óseos alveolares se mantuvieron mejores (Figura 11I).

La cohorte de LVL-RecAP16 se comparó con la de TS en p50-53 para determinar los efectos sobre la estructura y la función del diente maduro. La radiografía y la formación de imágenes por μ CT indicaron una reducción de la mineralización ósea alveolar e interproximal alrededor de los dientes molares en mandíbulas de ratón *Alpl*^{-/-}, en comparación con los controles (Figura 11J-M). La forma del diente molar y la dentina parecían normalizadas en gran medida en ratones con LVL-RecAP16, y esto se confirmó mediante análisis por μ CT del primer molar (Tabla 16). El esmalte en el grupo de LVL-RecAP16 no fue diferente de TS en BV/TV o TMD. Las coronas y raíces molares mostraron disminuciones leves pero significativas de 4-10% en BV/TV y TMD en comparación con TS, lo que indica que la mineralización de la dentina no se rescató completamente, y el grosor de la raíz se redujo en un 15%. La mineralización ósea alveolar se mantuvo más gravemente defectuosa en el grupo de LVL-RecAP16, con una disminución de BV/TV del 27% y una disminución de TMD del 13%, en comparación con TS. Los dientes incisivos en los ratones *Alpl*^{-/-} tratados también permanecieron severamente afectados (Figura 11K, M).

Por histología, los ratones con LVL-RecAP16 presentaban una mezcla de hueso alveolar mineralizado y osteoide, y un espacio PDL reducido pero mantenido (Figura 11N, P). No se observó pérdida de dientes en el grupo con LVL-RecAP16 por p53, aunque la unión periodontal siguió siendo deficiente, como lo demuestra la falta de cemento, la desorganización del PDL y el desprendimiento de la superficie de la raíz y el crecimiento hacia abajo del epitelio de unión. Sin embargo, se observaron pequeñas regiones de PDL adjuntas al diente en asociación con fibras de PDL organizadas (Figura 11O, Q), lo que indica la presencia de alguna unión comprometida que puede funcionar para retener los molares.

Tabla 16. Análisis por μ CT de tejidos dentoalveolares. Se compararon los primeros molares mandibulares y el hueso alveolar asociado en p50-53 en ratones TS (n = 5) y *Alpl*^{-/-} tratados con RecAP16 (n = 4). Los valores se reportan como las medias $\pm$ SD.

	TV (mm ³)	BV (mm ³)	BV/TV (%)	TMD (g HA/cm ³)	Espesor (μm)
Esmalte					
TS	0,25 ± 0,03	0,24 ± 0,02	98,77 ± 0,52	1,69 ± 0,05	70,2 ± 0,5
LVL-RecAP16	0,20 ± 0,02 *	0,20 ± 0,02 *	98,97 ± 0,27	1,68 ± 0,03	63,0 ± 0,5
Corona					
TS	0,61 ± 0,04	0,56 ± 0,03	91,06 ± 0,64	ND	ND
LVL-RecAP16	0,53 ± 0,03 *	0,46 ± 0,03 *	86,92 ± 0,69 *	ND	ND
Raíz					
TS	0,65 ± 0,05	0,56 ± 0,05	85,84 ± 0,74	1,07 ± 0,01	140,4 ± 8,4
LVL-RecAP16	0,56 ± 0,06	0,44 ± 0,04 *	77,27 ± 2,37 *	1,02 ± 0,01 *	121,5 ± 1,7 *
Hueso Alveolar					
TS	0,44 ± 0,04	0,29 ± 0,05	65,72 ± 5,08	1,01 ± 0,02	ND
LVL-RecAP16	0,32 ± 0,05 *	0,15 ± 0,02 *	47,91 ± 4,25 *	0,88 ± 0,02 *	ND

* p < 0.05 mediante prueba t de muestras independientes

ND = No determinado

Referencias de la literatura para el Ejemplo 8

- Anderson H.C., Sipe J.B., Hessle L., Dhanyamraju R., Atti E., Camacho N.P., Millán J.L. Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 2004; 164(3): 841-847.
- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ and Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010;25(7): 1468-86.
- Fedde KN, Blair L, Silverstein, J, Coburn SP, Ryan LM, Weinstein RS, Waymire K, Narisawa S, Millán, JL, MacGregor GR, Whyte MP, Alkaline phosphatase knockout mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 2015-2026.
- Foster BL, Nagatomo KJ, Nociti FH, Fong H, Dunn D, Tran AB, Wang W, Narisawa S, Millán JL, Somerman MJ 2012 Central role of pyrophosphate in acellular cementum formation. *PLoS One* 7(6): e38393.
- Foster B.L., Nagatomo K.J., Tso H.W., Tran A.B., Nociti F.H., Jr., Narisawa S., Yadav M.C., McKee M.D., Millan J.L., Somerman M.J. Tooth root dentin mineralization defects in a mouse model of hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 2013; 28(2): 271-82.
- Foster BL, Nociti FH, Jr., Somerman MJ (2014a). The rachitic tooth. *Endocr Rev* 35(1): 1-34.
- Foster BL, Ramnitz MS, Gafni RI, Burke AB, Boyce AM, Lee JS et al. (2014b). Rare Bone Diseases and Their Dental, Oral, and Craniofacial Manifestations. *J Dent Res* 93(7 suppl): 7S-19S.
- Hessle L., Johnson K.A., Anderson H.C., Narisawa S., Sali A., Goding J.W., Terkeltaub R., Millán J.L. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99(14): 9445-9449.
- Huesa C., Yadav M.C., Finnillä M.A., Goodyear S.R., Robins S.P., Tanner K.E., Aspden R.M., Millán J.L., Farquharson C. PHOSPHO1 is essential for mechanically competent mineralization and the avoidance of spontaneous fractures. *Bone.* 2011; 48(5): 1066-1074.
- Liu J, Nam HK, Campbell C, Gasque KC, Millán JL, Hatch NE. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase deficiency causes abnormal craniofacial bone development in the *Alpl*(^{-/-}) mouse model of infantile hypophosphatasia. *Bone* 2014; 67: 81-94.
- McKee M.D., Nakano Y., Masica D.L., Gray J.J., Lemire I., Heft R., Whyte M.P., Crine P., Millán J.L. Enzyme replacement therapy prevents dental defects in a model of hypophosphatasia. *J. Dent. Res.* 2011; 90(4): 470-476.
- Meganck JA, Kozloff KM, Thornton MM, Broski SM and Goldstein SA. Beam hardening artifacts in micro-computed tomography scanning can be reduced by X-ray beam filtration and the resulting images can be used to accurately measure BMD. *Bone* 2009; 45(6): 1104-1116.
- Millán JL, Narisawa S, Lemire I, Loisel TP, Boileau G, Leonard P, Gramatikova S, Terkeltaub R, Pleshko Camacho N, McKee MD, Crine P and Whyte MP, Enzyme replacement therapy for murine hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 777-787.
- Narisawa S, Wennberg C, Millán JL, Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *J Pathol* 2001; 193: 125-133.
- Narisawa S, Fröhlander N, Millán JL, Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn* 1997; 208: 432-446.
- Umoh JU, Sampaio AV, Welch I, Pitelka V, Goldberg HA, Underhill TM et al. In vivo micro-CT analysis of bone remodeling in a rat calvarial defect model. *Phys Med Biol* 2009; 54(7): 2147-61.
- Yadav M.C., Lemire I., Leonard P., Boileau G., Blond L., Beliveau M., Cory E., Sah R.L., Whyte M.P., Crine P., Millán J.L. Dose response of bone-targeted enzyme replacement for murine hypophosphatasia. *Bone.* 2011; 49(2): 250-256.
- Yadav M.C., de Oliveira R.C., Foster B.L., Fong H., Cory E., Narisawa S., Sah R.L., Somerman M., Whyte M.P., Millán J.L. Enzyme replacement prevents enamel defects in hypophosphatasia mice. *J. Bone Miner. Res.* 2012; 27(8): 1722-1734.
- Yadav, M. C., Huesa, C., Narisawa, S., Hoylaerts, M. F., Moreau, A., Farquharson, C. and Millán, J. L. Ablation of osteopontin improves the skeletal phenotype of *Phospho1*^{-/-} mice. *J. Bone Miner. Res.* En prensa (2014).

Ejemplo 9

La Fosfatasa alcalina protege contra la inflamación renal

Métodos

5 Cultivo de células

Rutinariamente, se cultivaron ciPTEC a 33°C (Wilmer, 2010). Las células se transfectaron con el antígeno T del virus 40 de Simio y la subunidad catalítica esencial de la telomerasa humana, lo que les permitió proliferar constantemente. Las células se cultivaron en DMEM/F-12 de Ham, libre de fenol (Gibco, Paisly, Reino Unido), suplementado con ITS (5 µg/mL de insulina, 5 µg/mL de transferrina, 5 ng/mL de selenio; Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos), 36 ng/mL de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (Sigma-Aldrich), 40 pg/mL de triyodotironina y 10% de suero de ternera fetal (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). Antes de un experimento, las células se sembraron en una placa de pozos (48.400 células/cm²), se incubaron durante 1 día a 33°C seguido de un período de maduración de 7 días a 37°C. El día del experimento, las células se incubaron previamente durante dos horas con LVL-RecAP (1, 5 o 10 U/mL, obsequio amable de AM-Pharma, Bunnik, Países Bajos) (Kiffer-Moreira, 2014), seguido por incubación durante 24 horas con 10 µg/mL de LPS (*E. coli* 0127: B8; Sigma-Aldrich) disueltos en HEPES HBSS 10 mM, pH 7,4 (HEPES: Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, HBSS: Gibco). Alternativamente, se administraron 10 U/mL de LVL-RecAP (~17 µg/mL) a células incubadas con LPS simultáneamente o después de dos horas. Las células de control se incubaron únicamente con medio de cultivo. DLPS (*E. coli* 055: B5; Sigma-Aldrich, 10 µg/mL) y LVL-RecAP inactivo (17 µg/mL, obsequio amable de AM-Pharma) se usaron como controles negativos. En diferentes series de experimentos, LPS fue sustituido por proteína recombinante humana TNF-α (Ebioscience, Viena, Austria), o sobrenadante de PBMC, estimuladas previamente durante 24 horas con o sin LPS (1 ng/mL). Todos los experimentos (n = 5) se realizaron como mínimo por duplicado.

25 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Se aislaron PBMC de capas leucocíticas obtenidas de donantes de sangre sanos (banco de sangre Nijmegen, n = 5) mediante centrifugación diferencial sobre Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Diegem, Bélgica). Las PBMC se resuspendieron en medio RPMI-1640 (Gibco) enriquecido con 0,5 mg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich), piruvato 1 mM (Gibco) y Glutamax 2 mM (Gibco). Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 0,5 x 10⁶ células/pozo, se incubaron previamente con o sin AP (10 unidades/mL) durante 2 horas, seguido por incubación con LPS (1 ng/mL) durante 24 horas. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

35 Medición de ATP y ensayo de viabilidad celular

Se recogió el sobrenadante 30 minutos después de la administración de LPS, con o sin tratamiento previo con LVL-RecAP, seguido de medición directa de la producción de ATP usando el kit de ensayo de bioluminiscencia de ATP CLS II (Roche Diagnostics) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La viabilidad celular se evaluó después de 24 horas de incubación con LPS realizando el ensayo MTT. En resumen, se sustituyó el medio por 100 µL de solución MTT previamente calentada (Sigma-Aldrich, 0,5 mg/mL en medio de cultivo), se incubó durante 3 horas a 37°C, seguido por la adición de 200 µL de DMSO para solubilizar cristales de formazán precipitados intracelularmente. La extinción del colorante se midió a 570 nm con una corrección de la longitud de onda de 670 nm.

45 Modelo animal

Se realizaron experimentos con animales de acuerdo con las directrices de los Institutos Nacionales de Salud y los protocolos fueron aprobados por la junta de revisión institucional para experimentos con animales. Se dividieron las ratas macho Sprague-Dawley libres de patógenos específicos (RjHan: SD, Janvier, Francia) en tres grupos: placebo (n = 6), LPS (n = 6) o LPS + LVL-RecAP (n = 6). Se recolectó una muestra de plasma de referencia (sangre con heparina y litio) siete días antes del experimento a través de una punción en la vena de la cola usando una Multivette (Sarstedt, Etten-Leur, Países Bajos). Tres días antes del experimento, la función renal inicial se evaluó como t_{1/2} con FITC-sinistrina (Schock-Kusch, 2011). A t = 0 h, se administró placebo (NaCl al 0,9%, solución salina) o 0,3 mg/kg de peso corporal de LPS (*E. coli* 0127: B8, disuelto en solución salina) como un bolo IV para inducir insuficiencia renal inducida por LPS. A t = 1,5 horas, el plasma se obtuvo como se describió anteriormente. A t = 2 h, la rata recibió un bolo IV de placebo o LVL-RecAP (1.000 U/kg de peso corporal, diluido en solución salina) seguido de una segunda medición de la función renal. A t = 5 h, todos los animales recibieron 5 mL de solución salina (sc) para evitar la deshidratación, seguido de un período de recolección de orina de 16 horas. A t = 21,5 horas, se realizó la tercera medición transcutánea. A t = 24 horas, se anestesiaron las ratas (ip, 3 mg/kg de peso corporal de xilazina y 80 mg/kg de peso corporal de ketamina al 10%), se extrajo una muestra de sangre con heparina litio retrobulbar para obtener plasma y se inició la perfusión de todo el cuerpo (6 min, solución salina + 50 UI/mL de heparina, 210 mbar; 3min, 4% de paraformaldehído (PFA; 210 mbar). Después de la perfusión de solución salina, el riñón derecho se retiró cuidadosamente, se congeló instantáneamente y se almacenó a -80°C hasta el procesamiento. El riñón izquierdo (removido) después de la perfusión con PFA, se almacenó en 4% de PFA a 4°C hasta que se procesó para histología e inmunohistoquímica. Se excluyeron un animal del grupo con LPS + LVL-RecAP y una muestra de orina del grupo placebo debido a las dificultades de inyección y recolección, respectivamente.

Mediciones de la función renal

La función renal se evaluó en ratas despiertas con movimiento libre a través de cinética de eliminación medida en forma transcutánea de FITC-sinistrina (Fresenius Kabi, Linz, Austria), una marca disponible comercialmente de GFR, utilizando un novedoso dispositivo de medición como se publicó anteriormente (Schock-Kusch 2011, Schock-Kusch 2009). Brevemente, las ratas fueron anestesiadas por inhalación de isoflurano (5% de inducción, 1,5-2% de mantenimiento, Abbott Laboratories, Illinois, EE.UU.) y se afeitaron en la espalda. La parte óptica del dispositivo se fijó en esta región depilada utilizando un parche adhesivo de doble cara específicamente diseñado (Lohmann GmbH, Neuwied, Alemania), mientras que la parte electrónica del dispositivo se incorporó a una chaqueta del roedor (Lomir Biomedical, Malone, EE.UU.) Después de establecer la señal de referencia, se inyectó FITC-sinistrina (5 mg por 100 g de peso corporal, diluido en solución salina regulada) en la vena de la cola. Después de eso, se dejó que los animales se recuperaran de la anestesia mientras la medición continuaba durante aproximadamente 120 minutos después de la inyección. $T_{1/2}$ se calculó mediante un modelo de un compartimiento aplicado sobre la cinética de eliminación de FITC-sinistrina medida transcutáneamente (Schock-Kusch, 2009). Además, se determinaron los parámetros de la función renal en muestras de plasma y orina usando el analizador automático Hitachi 704 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). La excreción fraccional de urea y la eliminación de creatinina endógena se calcularon con valores plasmáticos promedio de $t = 1,5$ y $t = 24$.

Histología e inmunohistoquímica

Después de la fijación durante al menos 24 horas, se procesó el tejido, se incrustó en paraplast y se seccionó con un espesor de 3 μ m. Para la histología de rutina, la tinción con HE se realizó en tejido renal. La lesión renal se evaluó usando un sistema de puntuación con una escala de 0 a 4 (0 = sin cambios, 4 = daño severo, por ejemplo, cambios marcados en las células del túbulo). KIM-1 se detectó mediante anticuerpo primario anti-rata KIM-1 de cabra (1:50; AF3689, R&D Systems, Abingdon, RU) y anticuerpo secundario IgG anti-cabra de conejo (1: 200; P0449, DAKO, Heverlee, Bélgica). La inmunotinción se visualizó con reactivos del sistema VECTASTAIN Eline ABC (Vector Labs, Ámsterdam, Holanda) y 3,3'-Diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich), seguido por contratinción con hematoxilina. Toda la puntuación se realizó de forma ciega.

Citoquinas y marcadores de lesión renal

Se usaron kits ELISA humanos (R&D Systems) para determinar TNF- α , IL-6 e IL-8 en sobrenadante de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de citoquina en plasma (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ) se determinaron mediante un ensayo Luminex simultáneo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Millipore, Cork, Irlanda). KIM-1 y NGAL se determinaron mediante ELISA (R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Homogeneización de tejidos

Los riñones congelados instantáneamente se homogeneizaron mediante TissueLyser LT (Qiagen, Venlo, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en reactivo de extracción de proteína tisular (T-PER; Thermo Scientific, Rockford, EE.UU.), Complementado con tabletas completas tipo cóctel inhibitoras de proteasa libre de EDTA. (Roche Applied Science, Almere, Países Bajos). El contenido total de proteína se determinó usando el kit de ensayo de proteína de ácido bicinonínico (Thermo Scientific) y las muestras se almacenaron a -80°C hasta que se analizaron.

Análisis de PCR en tiempo real

Se extrajo el ARN del sedimento celular congelado o de los riñones pulverizados (2000, 30 segundos; Mikrodismembrator U, Sartorius Stedim Biotech, Aubagne Cedex, Francia) mediante reactivo Trizol. El ARN se transcribió de forma inversa en el ADNc utilizando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) (Invitrogen, Breda, Países Bajos). La PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR) se realizó usando Taqman® (Applied Biosystems, Carlsbad, EE. UU.). Los genes fueron amplificados y normalizados para la expresión de GAPDH (ciPTEC: Ct: 18,9 $\pm$ 0,1, tejido renal: Ct: 24,8 $\pm$ 0,2). La reacción PCR comenzó con una etapa de incubación de 2 minutos a 50°C seguida de desnaturalización inicial durante 10 minutos a 95°C, y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante el método comparativo $\Delta\Delta$ Ct. Los conjuntos de cebadores/sonda se resumen en la Tabla 17.

Contenido de purina urinaria

Se determinó el contenido de adenosina urinaria, AMP, ADP, ATP y cAMP por HPLC. En resumen, se mezclaron 4 volúmenes de orina con 1 volumen de cloroacetaldehído (6x diluido en regulador de acetato 1M, pH 4,5; Sigma-Aldrich), seguido de derivatización (60 min, 70°C, 500 rpm) y centrifugación (3 min, TA, 13.400 rpm), después de lo cual el sobrenadante se transfirió a un vial de HPLC y se inyectó. Las purinas se separaron mediante un sistema de HPLC (Thermo Scientific) usando una columna Polaris C18-A (150 x 4,6 mm) con elución en gradiente usando eluyente A (K₂HPO₄ 0,1 M, TBAHS 10 mM (pH 6,5) y MeOH al 2%) y eluyente B (H₂O: ACN: THF; 50:49:1). Los tiempos de retención fueron 7,1 (adenosina), 8,4 (AMP), 12,5 (ADP), 16,2 (ATP) y 14,8 minutos (cAMP). La cuantificación se basó en las áreas de los picos de las muestras y los patrones de referencia se midieron con fluorescencia (excitación: 280 nm, emisión: 420

nm).

Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM o la mediana [percentil 25, percentil 75]. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias estadísticas entre los grupos se calcularon mediante ANOVA con comparaciones post hoc utilizando la prueba de comparación múltiple de Bonferroni o mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba posterior de Dunn. Un valor de p de dos lados menor que 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Todas las pruebas se realizaron con Graphpad Prism 5.00 para Windows (Graphpad Software Inc. San Diego, CA, EE. UU.).

LVL-RecAP atenúa la respuesta inflamatoria inducida por LPS *in vitro*

El pretratamiento de ciPTEC humano (Wilmer, 2010) con LVL-RecAP dependiente de la dosis atenúa de forma dependiente de la dosis la producción de citoquina inducida por LPS de TNF- α , IL-6 e IL-8 en el gen y a nivel de la proteína (Figura 12A- B). El LPS desintoxicado (dLPS) se usó como control negativo y no tuvo efecto. Se obtuvieron resultados protectores similares a nivel proteico cuando se administró LVL-RecAP simultáneamente con LPS o 2 horas después de la exposición a LPS (Figura 12C). Se realizó un experimento de control para verificar si LVL-RecAP desfosforila las citoquinas excretadas en el medio, lo que no fue el caso (Figura 17). Para confirmar que la reducción inducida por LVL-RecAP en la producción de citoquinas se debió a la naturaleza desfosforilante de la enzima, se investigó el efecto de LVL-RecAP inactivo que carece de propiedades hidrolizantes. El LVL-RecAP inactivo no atenuó la respuesta inflamatoria inducida por LPS en ciPTEC (Figura 12D).

Los efectos *in vitro* de LVL-RecAP son específicos de los riñones y no se limitan a la inflamación inducida por LPS

Para investigar más a fondo el mecanismo de protección renal de LVL-RecAP, se incubaron ciPTEC con la citoquina proinflamatoria TNF- α , que no se puede desfosforilar mediante IAP de ternera (Chen, 2010). La producción de citoquina inducida por TNF- α de IL-6 e IL-8 también se atenuó mediante el tratamiento previo con LVL-RecAP, mientras que el LVL-RecAP inactivo no tuvo efecto (Figura 13A).

En la patogénesis de AKI asociado a sepsis, el LPS induce una respuesta inflamatoria local a través de la unión a TLR4 expresada en PTEC (ciPTEC Ct: $30,5 \pm 3,9$; $n = 5$). Otro rasgo distintivo de la enfermedad es la respuesta inflamatoria sistémica, que afecta tanto a las células epiteliales renales como a las endoteliales, lo que provoca el desarrollo de AKI (Peters, 2014). Para imitar esta inflamación renal inducida por endotoxina, se incubaron ciPTEC con el sobrenadante de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con LPS (PBMC, 1 ng/mL de LPS). Esto indujo la producción de IL-6 e IL-8, que disminuyó cuando se trataron previamente ciPTEC con LVL-RecAP (Figura 13B, TNF- α no era detectable). Junto con el hallazgo de que las respuestas inflamatorias mediadas por TNF- α se atenuaron mediante el tratamiento con LVL-RecAP, esto sugiere la presencia de otro mediador dirigido por LVL-RecAP. Por el contrario, el pretratamiento de PBMC con LVL-RecAP no afectó la respuesta inflamatoria inducida por LPS en estas células (Figura 13C), lo que indica que los efectos de LVL-RecAP son específicos del riñón.

LVL-RecAP puede ejercer efectos protectores renales *in vitro* a través de la ruta ATP/adenosina

Un segundo objetivo potencial de LVL-RecAP es ATP, liberado durante el estrés celular causado, por ejemplo, por inflamación e hipoxia (Eltzschig, 2012). El ATP extracelular tiene efectos perjudiciales, pero puede convertirse mediante ectonucleotidasas (por ejemplo, AP) en ADP, AMP y finalmente en adenosina, ejerciendo efectos antiinflamatorios y protectores del tejido a través de la unión a uno de los receptores de adenosina A1, A2A, A2B y A3 (Bauerle, 2011, Di Sole, 2008). Curiosamente, aunque la expresión de los receptores de adenosina A1, A2B y A3 en ciPTEC no se vio afectada por la incubación de LPS (datos no mostrados), la expresión de A2A se sobreexpresó con la estimulación de LPS (veces que aumento: $4,1 \pm 0,4$; $p < 0,001$ en comparación con placebo). Este efecto se atenuó mediante el tratamiento conjunto con LVL-RecAP (veces que aumento: $2,9 \pm 0,2$; $p < 0,001$ en comparación con placebo; $p < 0,05$ en comparación con LPS), sugiriendo un papel de la ruta de adenosina en el efecto protector de LVL-RecAP. Además, se observó un aumento de las concentraciones de ATP extracelular después de la incubación de LPS, que fue más pronunciada con una concentración de LPS más alta, pero se revirtió mediante la preincubación de LVL-RecAP (Figura 14). El LPS no afectó la viabilidad celular hasta las 24 horas (datos no mostrados). Esto respalda la hipótesis de que LVL-RecAP puede ejercer su efecto protector renal a través de la ruta ATP/adenosina.

El tratamiento con LVL-RecAP durante la AKI inducida por LPS en ratas atenúa el deterioro de la función renal

Para confirmar los efectos beneficiosos de LVL-RecAP *in vivo*, se indujo AKI en ratas por LPS (0,3 mg/kg de peso corporal) y se evaluó la función renal mediante la medición transcutánea de la cinética de sinistrina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) como se informó anteriormente (Schock-Kusch, 2011). La FITC-sinistrina es eliminada por los riñones únicamente a través de la filtración y su desaparición del compartimento plasmático puede medirse por vía transcutánea en tiempo real (Schock-Kusch, 2011, Schock-Kusch, 2009). Esto permite investigar la progresión de AKI de una manera más precisa en comparación con la eliminación de creatinina comúnmente utilizado. Antes de la inyección de LPS, se extrajo una muestra de sangre inicial para determinar los parámetros clínicos y las citoquinas plasmáticas, y se determinó la semivida ($t_{1/2}$) de FITC-sinistrina basal a partir de la cinética medida para determinar la homogeneidad entre los grupos

(datos no mostrados). Después de 1,5 horas, el tratamiento con LPS dio como resultado niveles aumentados de citoquinas en plasma, anomalías en varios parámetros plasmáticos (Tabla 18), piloerección, diarrea y reducción de la actividad espontánea, lo que confirma la presencia de inflamación sistémica. Dos horas después de la administración de LPS, las ratas se trataron con LVL-RecAP (1.000 U/kg de peso corporal) o placebo (solución salina), seguido directamente por mediciones de la función renal transcutánea. El LPS prolongó significativamente la $t_{1/2}$ de FITC-sinistrina, revelando una reducción significativa de la función renal. Esta tendencia se atenuó mediante el tratamiento con LVL-RecAP (Figura 15A). En todos los grupos, la función renal se recuperó completamente en 24 horas (Figura 15B). Aún así, los niveles de urea en plasma fueron significativamente menores en los animales tratados con LVL-RecAP en comparación con los animales que recibieron LPS sin LVL-RecAP (Tabla 19). Además, el tratamiento con LVL-RecAP evitó el aumento inducido por LPS de la excreción fraccionada de urea (Figura 15C) y la disminución inducida por LPS de la eliminación de creatinina endógena (Figura 15D). La bioactividad de LVL-RecAP se confirmó en plasma y mostró un aumento de ocho veces 22 horas después de la inyección (Placebo: 293 ± 12 U/mL; LPS: 260 ± 13 U/mL; LPS + AP: 2150 ± 60 U/mL; $p < 0,0001$).

LVL-RecAP previene la lesión renal durante la AKI inducida por LPS *in vivo*

El efecto protector renal de LVL-RecAP sobre AKI inducida por LPS se investigó adicionalmente a través de la evaluación de histología renal y marcadores específicos de lesión tubular. No se encontraron diferencias en la histología entre los grupos de tratamiento, con cambios que variaron desde ningún daño (0) hasta cambios degenerativos mínimos como apariencia espumosa e hinchazón mínima de las células tubulares proximales (1) y aspecto espumoso e hinchazón moderada, así como algunos casos de apoptosis (2) (Placebo: 1 [0,75-2]; LPS: 1,5 [0-2]; LPS + LVL-RecAP: 1 [0-1,0]). El tratamiento con LPS produjo un aumento significativo en los niveles de expresión renal de IL-6, mientras que otras citoquinas y marcadores de daño (MPO, mieloperoxidasa, BAX, proteína X asociada a Bcl2, iNOS, óxido nítrico sintasa inducible) no se vieron afectados (Tabla 20). LVL-RecAP no pudo reducir los niveles de expresión renal de IL-6, pero sí aumentó la expresión renal de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Tabla 20). Además, la administración de LPS dio como resultado un aumento significativo en la excreción urinaria de la molécula de lesión renal (KIM)-1 y la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), que se acompañó de un aumento en los niveles de expresión del gen renal. Este efecto se previno mediante la administración conjunta de LVL-RecAP (Figura 16A-B, Tabla 20). Se observaron efectos similares de LVL-RecAP para los niveles de NGAL en plasma (Figura 16C) y para los niveles de proteína renal de KIM-1 (Figura 16D), que se localizaba principalmente en la superficie apical de las células epiteliales de los túbulos proximales (Figura 16E).

Excreción reducida de adenosina en orina durante la AKI inducida por LPS *in vivo*

Para dilucidar más el mecanismo de protección renal de LVL-RecAP, se investigó el papel de la ruta ATP-adenosina. El tratamiento con LPS tendió a reducir los niveles de expresión génica en el riñón para los cuatro receptores de adenosina, de los cuales solo el receptor de adenosina A3 alcanzó significación estadística (Tabla 20). Curiosamente, el tratamiento con LPS disminuyó significativamente la excreción urinaria de adenosina (placebo: $68,0 \pm 7,8$ pg de adenosina/10 μ g de creatinina, LPS: $19,4 \pm 6,3$ pg de adenosina/10 μ g de creatinina, $p < 0,001$), sin alterar la excreción de cAMP, ATP, ADP y AMP (datos no mostrados). Esto puede sugerir que el riñón utiliza adenosina durante la AKI inducida por LPS. El tratamiento con LVL-RecAP no tuvo efecto sobre la expresión génica del receptor de adenosina (Tabla 20) ni sobre la excreción de adenosina en orina (LPS + LVL-RecAP: $16,7 \pm 6,8$ pg de adenosina/10 μ g de creatinina: $p < 0,001$ comparado con placebo) comparado con LPS solo.

Tablas

Tabla 17. Especificaciones del cebador/sonda

	Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del ensayo
<i>ciPTEC</i>	GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Hs02758991_g1
	TNF- α	factor de necrosis tumoral	Hs01113624_g1
	IL-6	interleuquina 6	Hs00985639_m1
	IL-8	interleuquina 8	Hs00174103_m1
	TLR4	receptor 4 tipo toll	Hs00152939_m1
	ADORA1	receptor A1 de adenosina	Hs00379752_m1
	ADORA2A	receptor A2a de adenosina	Hs00169123_m1
	ADORA2B	receptor A2b de adenosina	Hs00386497_m1
	ADORA3	receptor A3 de adenosina	Hs01560269_m1
<i>Riñón de rata</i>	GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Rn01775763_g1
	IL-1 β	interleuquina 1 beta	Rn00580432_m1
	IL-6	interleuquina 6	Rn01410330_m1
	IL-10	interleuquina 10	Rn00563409_m1
	TNF- α	factor de necrosis tumoral	Rn99999017_m1
	IFN- γ	interferón gamma	Rn00594078_m1
	HAVCR1	receptor celular 1 del virus de la hepatitis A	Rn00597703_m1

LCN2	lipocalina 2	Rn00590612_m1
MPO	mieloperoxidasa	Rn01460204_m1
BAX	proteína X asociada a Bcl2	Rn02532082_m1
NOS2	óxido nítrico sintasa 2, inducible	Rn00561646_m1
ADORA1	receptor A1 de adenosina	Rn00567668_m1
ADORA2A	receptor A2a de adenosina	Rn00583935_m1
ADORA2B	receptor A2b de adenosina	Rn00567697_m1
ADORA3	receptor A3 de adenosina	Rn00563680_m1

Tabla 18. Citoquinas en plasma y parámetros experimentales

	Placebo	LPS	LPS + recAP
<i>Citoquinas</i>			
IL-1 β (pg/mL)	9 $\pm$ 9	6913 $\pm$ 1362 [#]	5764 $\pm$ 1259 [#]
IL-6 (pg/mL)	ND	74294 $\pm$ 11240 [#]	70247 $\pm$ 13812 [#]
IL-10 (pg/mL)	17 $\pm$ 17	10054 $\pm$ 2017 [#]	8693 $\pm$ 2513 [#]
TNF- α (pg/mL)	1 $\pm$ 1	21071 $\pm$ 3375 [#]	10514 $\pm$ 889 [#] *
IFN- γ (pg/mL)	ND	ND	ND
<i>Parámetros en plasma</i>			
Creatinina (mg/dL)	0,16 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,05	0,25 $\pm$ 0,04
Urea (mg/dL)	28 $\pm$ 2	39 $\pm$ 2 [#]	48 $\pm$ 3 [#] *
Lactato (mg/dL)	24 $\pm$ 5	34 $\pm$ 2	33 $\pm$ 3
Glucosa (mg/dL)	143 $\pm$ 3	260 $\pm$ 25 [#]	216 $\pm$ 13 [#]
Proteína (mg/dL)	58 [56-58]	58 [48-61]	56 [56-58]
Calcio (mmol/L)	2,59 $\pm$ 0,03	2,43 $\pm$ 0,03 [#]	2,41 $\pm$ 0,06 [#]
Fósforo inorgánico (mmol/L)	3,01 $\pm$ 0,10	2,76 $\pm$ 0,09	2,81 $\pm$ 0,10
Sodio (mmol/L)	149 $\pm$ 2	148 $\pm$ 2	146 $\pm$ 3
Potasio (mmol/L)	5,89 [5,66-6,21]	4,87 [4,66-5,23]	5,08 [4,76-5,18]

Los parámetros en plasma se determinaron 1,5 horas después de la administración de LPS. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM y la mediana [percentil 25, percentil 75], según la distribución de cada parámetro. Las diferencias en la distribución de los parámetros en plasma en comparación con t = 24 probablemente estén relacionadas con el tamaño de la muestra. Diferencias significativas estimadas mediante ANOVA de una vía con prueba posterior de Bonferroni, o prueba de Kruskal-Wallis con prueba posterior de Dunn. Placebo, LPS n = 6; LPS + recAP n = 5. # p < 0,05 en comparación con el placebo. * p < 0,05 comparado con LPS. LPS, lipopolisacárido; recAP, fosfatasa alcalina recombinante; ND: no detectado.

Tabla 19. Parámetros plasmáticos y urinarios

	Placebo	LPS	LPS + recAP
<i>Parámetros en plasma</i>			
Creatinina (mg/dL)	0,20 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,01
Urea (mg/dL)	28 $\pm$ 2	48 $\pm$ 4 [#]	36 $\pm$ 2 *
Lactato (mg/dL)	10 [8-31]	14 [12-21]	12,0 [10-14]
Glucosa (mg/dL)	144 $\pm$ 7	132 $\pm$ 11	161 $\pm$ 3
Proteína (mg/dL)	56 [54-57]	56 [52-57]	54 [54-58]
Calcio (mmol/L)	2,84 [2,7-3,1]	2,65 [2,6-2,7]	2,70 [2,6-2,8]
Fósforo inorgánico (mmol/L)	2,95 $\pm$ 0,09	3,06 $\pm$ 0,10	2,95 $\pm$ 0,09
Sodio (mmol/L)	150 $\pm$ [148-157]	154 [147-155]	150 [141-154]
Potasio (mmol/L)	4,24 $\pm$ 0,04	4,32 $\pm$ 0,10	4,42 $\pm$ 0,24
<i>Parámetros en orina</i>			
Creatinina (mg)	5,4 $\pm$ 0,3	6,10 $\pm$ 0,3	5,7 $\pm$ 0,6
Urea (mg)	2678 $\pm$ 26	482 $\pm$ 21 [#]	440 $\pm$ 19 [#]
Albumina (μ g)	0 [0-54]	0 [0-663]	310 [0-419]
Glucosa (μ g)	1,59 $\pm$ 0,25	1,74 $\pm$ 0,28	0,99 $\pm$ 0,27
Proteína (μ g)	38 $\pm$ 6	67 $\pm$ 9	61 $\pm$ 9
Calcio (μ mol)	4,1 $\pm$ 0,7	7,2 $\pm$ 0,9	7,4 $\pm$ 1,7
Fósforo inorgánico (mmol)	0,50 [0,3-0,9]	0,63 [0,6-1,0]	0,64 [0,6-0,8]
Sodio (mmol)	1,6 [1,3-2,01]	1,5 [1,3-1,7]	1,5 [1,4-2,4]
Potasio (mmol)	1,6 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,4 [#]	1,9 $\pm$ 0,1 [#]

Los parámetros en plasma se determinaron 24 horas después de la administración de LPS. Los parámetros en orina se determinaron entre 5 y 21 horas después de la administración de LPS. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM y la mediana [percentil 25, percentil 75], según la distribución de cada parámetro. Diferencias significativas estimadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis con prueba posterior de Dunn o ANOVA de una vía con prueba posterior de Bonferroni. Placebo, LPS n = 6; LPS + recAP n = 5; parámetros en orina: Placebo n = 5. # p < 0,05 comparado con el placebo. * p < 0,05 comparado con LPS. LPS, lipopolisacárido; recAP, fosfatasa alcalina recombinante.

Tabla 20. Niveles renales de expresión génica

	Valores de Ct			Veces que se incrementa ($2^{\Delta\Delta Ct}$)		
	Placebo	LPS	LPS + recAP	Placebo	LPS	LPS + recAP
Citoquinas						
IL-1 β	27,7 $\pm$ 0,5	26,6 $\pm$ 0,2	26,9 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 0,5
IL-6	37,4 [36,3-38,0]	33,5 [33,3-34,8]	34,7 [34,4-36,4]	1,2 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,5 [#]	5,2 $\pm$ 1,2 [#]
IL-10	34,8 $\pm$ 0,4	32,5 $\pm$ 0,1	32,9 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,9	5,5 $\pm$ 1,2 [#]
TNF- α	36,7 $\pm$ 0,2	35,8 $\pm$ 0,4	37,2 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,3
IFN- γ	36,3 $\pm$ 0,3	35,3 $\pm$ 0,4	35,6 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,2
Marcadores de lesión						
KIM-1	31,7 $\pm$ 0,4	22,9 $\pm$ 0,7	25,3 $\pm$ 0,6	0,8 [0,6-1,9]	430 [195-530] [#]	113 [43-336]
NGAL	29,1 $\pm$ 0,2	24,1 $\pm$ 1,4	25,5 $\pm$ 1,6	1,2 $\pm$ 0,3	33 $\pm$ 9 [#]	28 $\pm$ 8
MPO	32,4 $\pm$ 0,3	31,4 $\pm$ 0,7	33,0 $\pm$ 1,0	1,0 [0,4-2,9]	1,4 [0,4-3,9]	0,6 [0,3-3,2]
BAX	25,2 $\pm$ 0,2	24,8 $\pm$ 0,1	25,1 $\pm$ 0,3	0,9 [0,7-1,5]	0,7 [0,3-2,1]	1,0 [0,5-1,3]
iNOS	36,2 $\pm$ 0,5	35,0 $\pm$ 0,2	34,8 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,5	2,6 $\pm$ 0,8
Receptores de adenosina						
A1	28,6 $\pm$ 0,3	27,9 $\pm$ 0,3	29,3 $\pm$ 0,6	1,3 [0,4-2,3]	0,7 [0,5-1,4]	0,8 [0,3-1,5]
A2A	27,0 $\pm$ 0,1	26,4 $\pm$ 0,2	27,3 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2
A2B	29,0 [28,9-29,3]	28,4 [28,1-29,0]	29,0 [28,9-30,2]	1,2 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,1
A3	34,3 $\pm$ 0,3	34,2 $\pm$ 0,4	35,0 $\pm$ 0,6	1,0 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1 [#]	0,7 $\pm$ 0,1

Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM y la mediana [percentil 25, percentil 75], dependiendo de la distribución de cada parámetro. Se estimaron las diferencias significativas del número de veces usando la prueba de Kruskal-Wallis con prueba posterior de Dunn o ANOVA de una vía con prueba posterior de Bonferroni. Placebo, LPS n = 6; LPS + recAP n = 5. # p < 0,05 comparado con el placebo. * p < 0,05 comparado con LPS. LPS, lipopolisacárido; recAP, fosfatasa alcalina recombinante; MPO, mieloperoxidasa; BAX, proteína X asociada a Bcl2; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible.

10 Referencias de la literatura al Ejemplo 9

Bauerle, J.D., Grenz, A., Kim, J.H., Lee, H.T., and Eltzschig, H.K. 2011. Adenosine generation and signaling during acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 22: 14-20.

15 Chen, K.T., Malo, M.S., Moss, A.K., Zeller, S., Johnson, P., Ebrahimi, F., Mostafa, G., Alam, S.N., Ramasamy, S., Warren, H.S., et al. 2010. Identification of specific targets for the gut mucosal defense factor intestinal alkaline phosphatase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G467-475.

20 Di Sole, F. 2008. Adenosine and renal tubular function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:399-407.
Eltzschig, H.K., Sitkovsky, M.V., and Robson, S.C. 2012. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med* 367: 2322-2333.

25 Kiffer-Moreira, T., Sheen, C.R., Gasque, K.C., Bolean, M., Ciancaglini, P., van Elsas, A., Hoylaerts, M.F., and Millan, J.L. 2014. Catalytic signature of a heat-stable, chimeric human alkaline phosphatase with therapeutic potential. *PLoS One* 9: e89374.

Peters, E., Heemskerk, S., Masereeuw, R., and Pickkers, P. 2014. Alkaline Phosphatase: A Possible Treatment for Sepsis-Associated Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients. *Am J Kidney Dis*. 63: 1038-48.

30 Schock-Kusch, D., Sadick, M., Henninger, N., Kraenzlin, B., Claus, G., Kloetzer, H.M., Weiss, C., Pill, J., and Gretz, N. 2009. Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate using FITC-sinistrin in rats. *Nephrol Dial Transplant* 24: 2997-3001.

35 Schock-Kusch, D., Xie, Q., Shulhevich, Y., Hesser, J., Stsepankou, D., Sadick, M., Koenig, S., Hoecklin, F., Pill, J., and Gretz, N. 2011. Transcutaneous assessment of renal function in conscious rats with a device for measuring FITC-sinistrin disappearance curves. *Kidney Int* 79: 1254-1258.

40 Wilmer, M.J., Saleem, M.A., Masereeuw, R., Ni, L., van der Velden, T.J., Russel, F.G., Mathieson, P.W., Monnens, L.A., van den Heuvel, L.P., and Levchenko, E.N. 2010. Novel conditionally immortalized human proximal tubule cell line expressing functional influx and efflux transporters. *Cell Tissue Res* 339: 449-457.

Ejemplo 10

Comparación de LVL-RecAP con RecAP bajo diferentes condiciones de temperatura

10.6. Materiales

10.6.1 Estándares de referencia

LVL-RecAP

Número de lote:	NB 1963p1
ID de PRA:	14-049
Contenido de proteína:	9,9 mg/mL (OD280)
Actividad:	6.537 U/mL (660 U/mg)
Condición de almacenamiento:	nominal a -70°C
Fecha de vencimiento:	8 de enero de 2015

RecAP

Número de lote:	2013-052, lote 62
ID de PRA:	14-311
Contenido de proteína:	13,3 mg/mL (OD280)
Actividad:	9.871 U/mL (742 U/mg)
Condición de almacenamiento:	a 2-8°C
Fecha de vencimiento:	6 de junio de 2016

10.6.2 Matriz del blanco

La siguiente matriz biológica se usó para la preparación de soluciones de muestra.

Matriz:	suero
Especie:	humana
Proveedor:	SeraLaboratories International, Haywards Heath, Reino Unido
Condición de almacenamiento:	a una temperatura de almacenamiento nominal de -20°C
ID de PRA:	14-0624, 14-0647 y 14-0652
Fechas de vencimiento:	2 de mayo de 2016 (14-0624), 6 de mayo de 2016 (14-0647 y 14-0652)

10.7. Métodos

10.7.1 Preparación de soluciones

10.7.1.1 Hidróxido de sodio 2 M

Se preparó una solución de hidróxido de sodio 2 molar disolviendo 8 g de hidróxido de sodio en aproximadamente 90 mL de agua Milli-Q y, después de enfriar a temperatura ambiente, el volumen se ajustó a 100 mL. La solución se almacenó a temperatura ambiente hasta un máximo de un mes.

10.7.1.2 Cloruro de magnesio 1 M

Se preparó una solución de cloruro de magnesio 1 molar disolviendo 4,06 g de cloruro de magnesio hexahidratado en aproximadamente 16 mL de agua Milli-Q. Después de la disolución, el volumen se ajustó a 20 mL. La solución se almacenó a +4°C nominales hasta un máximo de un mes.

10.7.1.3 Cloruro de zinc 0,1 M

Se preparó una solución de cloruro de zinc 0,1 molar disolviendo 272,5 mg de cloruro de zinc en aproximadamente 16 mL de agua Milli-Q. Después de la disolución, el volumen se ajustó a 20 mL.

La solución se almacenó a +4°C nominales hasta un máximo de un mes.

10.7.1.4 Solución de glicina 0,025 M pH 9,6 para el método a 25°C

Se preparó una solución de glicina 0,025 molar de pH 9,6 disolviendo 3,76 g de glicina en aproximadamente 1.800 mL de agua Milli-Q. La solución se calentó a 25°C y se ajustó a pH 9,6 con hidróxido de sodio 2 M (véase la Sección 10.7.1.1). El volumen se completó hasta 2.000 mL y se volvió a comprobar el pH. El pH debe ser pH 9,6 a 25°C. La solución se almacenó a +4°C nominales hasta un máximo de una semana.

10.7.1.5 Solución amortiguadora diluyente de la enzima para el método a 25°C

- La solución amortiguadora diluyente de la enzima se preparó mezclando 0,5 mL de cloruro de magnesio 1 M (véase la Sección 10.7.1.2) con 0,5 mL de cloruro de zinc 0,1 M (véase la Sección 10.7.1.3) y 500 mL de solución de glicina 0,025 M pH 9,6 (véase la Sección 10.7.1.4). A esta solución, se le añadieron 5,00 g de manitol y 0,25 g de albúmina de suero bovino y se disolvieron bajo agitación. Se verificó el pH y, si se consideró necesario, se ajustó a pH 9,6 a 25°C usando hidróxido de sodio 2 M. La solución amortiguadora diluyente de la enzima se preparó en forma fresca cada día.
- 10.7.1.6 Fosfato de p-nitrofenilo 0,0103 M pH 9,6 para el método a 25°C
- Se preparó fosfato de p-nitrofenilo 0,0103 M pH 9,6 disolviendo 1.528 mg de fosfato de p-nitrofenilo en aproximadamente 360 mL de solución de glicina 0,025 M pH 9,6 (véase la Sección 10.7.1.4). Se verificó el pH y, si se consideró necesario, se ajustó a pH 9,6 a 25°C usando hidróxido de sodio 2 M (véase la Sección 10.7.1.1). Después de verificar el pH, el volumen se ajustó a 400 mL con solución de glicina 0,025 M pH 9,6. La solución se almacenó a +4°C nominales hasta un máximo de 5 días.
- 10.7.1.7 Substrato de trabajo para el método a 25°C
- El sustrato de trabajo se preparó mezclando 120 mL de solución de fosfato de p-nitrofenilo 0,0103 M pH 9,6 (véase la Sección 10.7.1.6) con 1,25 mL de solución de cloruro de magnesio 1 M (véase la Sección 10.7.1.2). A esta solución se le añadieron aproximadamente 15 mL de solución de glicina 0,025 M pH 9,6 (véase la Sección 10.7.1.4) y se verificó el pH y, si se consideró necesario, se ajustó a pH 9,6 a 25°C usando hidróxido de sodio 2 M (véase la Sección 10.7.1.1). El volumen se ajustó a 145 mL con solución de glicina 0,025 M pH 9,6. El sustrato de trabajo se preparó en forma fresca cada día.
- 10.7.1.8 Solución de glicina 0,025 M pH 9,6 para el método a 37°C
- Se preparó una solución de glicina 0,025 molar de pH 9,6 disolviendo 3,76 g de glicina en aproximadamente 1.800 mL de agua Milli-Q. La solución se calentó a 25°C y se ajustó a pH 9,6 con hidróxido de sodio 2 M (véase la Sección 10.7.1.1).
- El volumen se completó hasta 2.000 mL y se volvió a comprobar el pH. El pH debe ser de pH 9,6 a 37°C. La solución se almacenó a +4°C nominales hasta un máximo de una semana.
- 10.7.1.9 Solución amortiguadora diluyente de la enzima para el método a 37°C
- La solución amortiguadora diluyente de la enzima se preparó mezclando 0,5 mL de cloruro de magnesio 1 M (véase la Sección 10.7.1.2) con 0,5 mL de cloruro de zinc 0,1 M (véase la Sección 10.7.1.3) y 500 mL de solución de glicina 0,025 M pH 9,6 (véase la Sección 10.7.1.8). A esta solución, se le añadieron 5,00 g de manitol y 0,25 g de albúmina de suero bovino y se disolvieron bajo agitación. Se verificó el pH y, si se consideró necesario, se ajustó a pH 9,6 a 37°C usando hidróxido de sodio 2 M. La solución amortiguadora diluyente de la enzima se preparó en forma fresca cada día.
- 10.7.1.10 Fosfato de p-nitrofenilo 0,0103 M pH 9,6 para el método a 37°C
- Se preparó un fosfato de p-nitrofenilo 0,0103 M, pH 9,6, disolviendo 1.528 mg de fosfato de p-nitrofenilo en aproximadamente 360 mL de solución de glicina 0,025 M a pH 9,6 (véase la Sección 10.7.1.8). Se verificó el pH y, si se consideró necesario, se ajustó a pH 9,6 a 37°C usando hidróxido de sodio 2 M (véase la Sección 10.7.1.1). Después de verificar el pH, el volumen se ajustó a 400 mL con solución de glicina 0,025 M pH 9,6. La solución se almacenó a +4°C nominales hasta un máximo de 5 días.
- 10.7.1.11 Substrato de trabajo para el método a 37°C
- El sustrato de trabajo se preparó mezclando 120 mL de solución de fosfato de p-nitrofenilo 0,0103 M pH 9,6 (véase la Sección 10.7.1.10) con 1,25 mL de solución de cloruro de magnesio 1 M (véase la Sección 10.7.1.2). A esta solución se le añadieron aproximadamente 15 mL de solución de glicina 0,025 M pH 9,6 (véase la Sección 10.7.1.4) y se verificó el pH y si se consideró necesario se ajustó a pH 9,6 a 37°C usando hidróxido de sodio 2 M (véase la Sección 10.7.1.1). El volumen se ajustó a 145 mL con solución de glicina 0,025 M pH 9,6. El sustrato de trabajo se preparó en forma fresca cada día.
- 10.7.2 Solución para adicionar LVL-RecAP (500 µg/mL)
- Se preparó una solución para adicionar recAP diluyendo 252,5 µL de LVL-RecAP (Sección 10.6.1) a 5,00 mL con solución amortiguadora diluyente de la enzima (Sección 10.7.1.5). La concentración final de la solución para adición es de 500 µg/mL; esta solución se usó para la preparación de las muestras de suero humano enriquecidas con recAP (Sección 10.7.4).
- 10.7.3 Solución para adicionar RecAP (500 µg/mL)
- Se preparó una solución para adicionar RecAP diluyendo 188,0 µL de RecAP (Sección 10.6.1) a 5,00 mL con solución

amortiguadora diluyente de la enzima (Sección 10.7.1.5). La concentración final de la solución para adición es de 500 µg/mL, esta solución se usó para la preparación de las muestras de suero humano enriquecido con RecAP (Sección 10.7.5).

5 10.7.4 Preparación de muestras de suero humano para adicionar LVL-recAP

Se prepararon muestras de suero añadiendo LVL-RecAP a tres lotes de suero individuales que sirven de blanco usando la siguiente concentración:

Muestras de suero con LVL-RecAP	Concentración (µg/mL)	Actividad calculada (U/L)	Volumen para la adición (µL)	Volumen total (mL)
1	10,0	6.603	100	5,00
2	8,00	5.282	80,0	5,00
3	6,00	3.962	60,0	5,00
4	4,00	2.641	40,0	5,00
5	2,00	1.321	20,0	5,00
6	1,00	660	10,0	5,00
7	endógena	endógena	0	5,00

10 Las muestras de suero se almacenaron a -70°C nominales hasta el análisis.

10.7.5 Preparación de muestras de suero humano para adicionar RecAP

15 Se prepararon muestras de suero para adición de RecAP a tres lotes de suero individuales que sirven de blanco usando la siguiente concentración:

Muestras de suero con RecAP	Concentración (µg/mL)	Actividad calculada (U/L)	Volumen para la adición (µL)	Volumen total (mL)
1	9,00	6.680	90,0	5,00
2	7,20	5.344	72,0	5,00
3	5,40	4.088	54,0	5,00
4	3,60	2.672	36,0	5,00
5	1,80	1.336	18,0	5,00
6	0,900	668	9,00	5,00
7	endógena	endógena	0	5,00

20 Las muestras de suero se almacenaron a -70°C nominales hasta el análisis.

10.7.6 Preparación de soluciones de muestra para la actividad enzimática de LVL-RecAP y RecAP

25 Las soluciones de muestra para la actividad enzimática de LVL-RecAP y RecAP se prepararon por dilución de la muestra del producto LVL-RecAP o muestra del producto RecAP usando solución amortiguadora diluyente de la enzima (Sección 10.7.1.5 para el método a 25°C o Sección 10.7.1.9 para el método a 37°C).

La muestra 1 de la muestra de LVL-RecAP y/o RecAP se diluyó tomando 125 µL de la muestra de suero de LVL-RecAP y/o RecAP y se diluyó a 2,50 mL con solución amortiguadora diluyente de la enzima para preparar la solución de muestra final para la actividad enzimática de LVL-RecAP o RecAP.

30 La muestra 2 de la muestra de LVL-RecAP y/o RecAP se diluyó tomando 125 µL de la muestra de suero de LVL-RecAP y/o RecAP y se diluyó hasta 2,00 mL con solución amortiguadora diluyente de la enzima para preparar la solución de muestra final para la actividad enzimática de LVL-RecAP o RecAP.

35 La muestra 3 de la muestra de LVL-RecAP y/o RecAP se diluyó tomando 167 µL de la muestra de suero de LVL-RecAP y/o RecAP y se diluyó hasta 2,00 mL con solución amortiguadora diluyente de la enzima para preparar la solución de muestra final para la actividad enzimática de LVL-RecAP o RecAP.

40 La muestra 4 de la muestra de LVL-RecAP y/o RecAP se diluyó tomando 250 µL de la muestra de suero de LVL-RecAP y/o RecAP y se diluyó hasta 2,00 mL con solución amortiguadora diluyente de la enzima para preparar la solución de muestra final para la actividad enzimática de LVL-RecAP o RecAP.

45 La muestra 5 de la muestra de LVL-RecAP y/o RecAP se diluyó tomando 500 µL de la muestra de suero de LVL-RecAP y/o RecAP y se diluyó hasta 2,00 mL con solución amortiguadora diluyente de la enzima para preparar la solución de muestra final para la actividad enzimática de LVL-RecAP y/o de RecAP.

La muestra 6 de la muestra de LVL-RecAP y/o RecAP se diluyó tomando 1.000 µL de la muestra de suero de LVL-RecAP

y/o RecAP y se diluyó hasta 2,00 mL con solución amortiguadora diluyente de la enzima para preparar la solución de muestra final para la actividad enzimática de LVL-RecAP y/o de RecAP.

- 5 La muestra endógena (muestra 7) de LVL-RecAP y/o RecAP se diluyó tomando 1.000 µL de la muestra de suero de LVL-RecAP y/o RecAP y se diluyó hasta 2,00 mL con solución amortiguadora diluyente de la enzima para preparar la solución de muestra final para la actividad enzimática de LVL-RecAP y/o de RecAP.

10.8. Ejecución, resultados y discusión

10 10.8.1 Equipo y configuraciones

Se usaron los siguientes métodos y configuraciones:

- 15 Espectrofotómetro: Thermo Fisher Evolution 300 UV/VIS con calentador Peltier de celda única a 25°C (AN-18-3) o 37°C (AN-18-4) con agitador magnético
Longitud de onda: 405 nm
Medición: durante 3 minutos, cada 15 segundos una medición. El primer minuto no se tuvo en cuenta para los cálculos.
Tipo de cubeta: vidrio

- 20 Se pipetearon las siguientes soluciones en una cubeta de vidrio. La temperatura de las soluciones fue de 25°C ± 0,5°C para AN-18-3 o 37°C ± 0,5°C para AN-18-4.

Reactivo	Solución de la muestra	Blanco
Substrato de trabajo	1.450 µL	1.450 µL
Diluyente de la enzima		50,0 µL
Muestra	50,0 µL	
Volumen total	1.500 µL	1.500 µL

- 25 Primero, el sustrato de trabajo y el diluyente de la enzima se mezclaron antes de que se añadiera la muestra. La solución se mezcló y se colocó inmediatamente la cubeta en el espectrofotómetro y el aumento en la absorbancia se midió de 1 a 3 minutos en pasos de 15 segundos para obtener al menos 9 puntos de datos. En el punto de datos de 3 minutos (último), la densidad óptica fue ≤ 1,5. Además, la linealidad era aceptable; el coeficiente de correlación (r) para cada réplica debe ser ≥ 0,990. Todos los resultados de la muestra con un coeficiente de correlación (r) ≥ 0,990 se tuvieron en cuenta para la evaluación, los resultados de la muestra con un coeficiente de correlación (r) < 0,990 se reportaron solo con fines informativos. La actividad de la enzima se realizó por duplicado, una prueba de cada dilución.

30 10.8.2 Actividad enzimática de LVL-RecAP y RecAP

- 35 Aunque en el plan de estudio se describió que la diferencia para los dos resultados individuales (actividad enzimática) debería ser ≤ 5,0% para aceptar los dos resultados de dilución individuales, todos los resultados con un coeficiente de correlación (r) para cada medición ≥ 0,990 fueron usados para la evaluación. Esto debido a que el método de actividad enzimática se validó para muestras de productos de fármacos con LVL-RecAP a 25°C ± 0,5°C y no para otros orígenes y/u otras condiciones de fosfatasa alcalina.

- 40 La Figura 19 muestra la correlación entre las actividades enzimáticas de RecAP en suero humano a 25°C y a 37°C. La Figura 20 muestra la correlación entre las actividades enzimáticas de LVL-RecAP en suero humano a 25°C y a 37°C.

La Figura 20 muestra la actividad/µg de proteína a 25°C y a 37°C para RecAP y LVL-RecAP. Los valores representan una la media del cambio de actividad entre 25°C y 37°C para una concentración de proteína dada.

45

Reivindicaciones

1. Una proteína aislada que tiene actividad de fosfatasa alcalina, donde dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de 365 aminoácidos consecutivos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 como se indica en la Figura 1, una secuencia de aminoácidos de 65 aminoácidos consecutivos, que tienen al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 como se indica en la Figura 1, y una secuencia de aminoácidos de 54 aminoácidos consecutivos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 como se indica en la Figura 1 en donde la proteína de longitud completa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la SEQ ID NO: 1 como se indica en la Figura 1, con la condición de que el aminoácido en la posición 279 es leucina (L), el aminoácido en la posición 328 es valina (V) y el aminoácido en la posición 478 es leucina (L).
2. Un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2.
4. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2, o un vector de acuerdo con la reivindicación 3, para uso como un medicamento.
5. Una proteína, polinucleótido o vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, para uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria, una enfermedad renal o hipofosfatasa.
6. Una proteína, polinucleótido o vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo de enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal, infección, sepsis, neurodermatitis, enfermedad hepática inflamatoria, enfermedad pulmonar inflamatoria y enfermedad renal inflamatoria.
7. Una proteína, polinucleótido o vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicha enfermedad renal se selecciona del grupo de lesión renal, lesión renal aguda, enfermedad renal crónica, insuficiencia renal, insuficiencia renal aguda, enfermedad renal isquémica y daño renal por isquemia/reperfusión.
8. Una proteína, polinucleótido o vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha hipofosfatasa se selecciona del grupo de hipofosfatasa perinatal, hipofosfatasa en bebés, hipofosfatasa en niños e hipofosfatasa en adultos.
9. Una célula huésped que comprende una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2 o un vector de acuerdo con la reivindicación 3.
10. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha célula huésped es una célula CHO.
11. Un método para producir una proteína de la reivindicación 1, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 9 o 10 y permitir que la célula huésped produzca dicha proteína.
12. Una composición que comprende una proteína de acuerdo con la reivindicación 1 y/o que puede ser obtenida mediante un método de acuerdo con la reivindicación 11.
13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12 para uso como un medicamento.
14. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el medicamento es para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, una enfermedad renal o hipofosfatasa.
15. Una proteína, polinucleótido o vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 u 8 o una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicha prevención o tratamiento de hipofosfatasa da como resultado una supervivencia prolongada, aumento de peso corporal, fenotipo esquelético mejorado, atenuación de defectos craneofaciales, mejora del fenotipo dentoalveolar, y/o reducción de los niveles de PPI en plasma.

Secuencia mejorada de RecAP (LVL-RecAP) (SEQ ID NO: 1):

1 VIPAEENPAFWNRQAAEALDAAKKLQPIQKVAKNLIIFLGDGLGVPVTATRIILKGQKNGKLGPEETPLAMDRFPYALSKTYNVDRQVPDSAAATATAYL
 101 CGVKANFQITIGLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRKAQAGKSVGVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADMPASARQEGCQDIATQLISNMDIDVIL
 201 GGGKYMFPNGTDPPEYPADASQNGIRLDGKNLVQEWLAKHQAGWYVNNRTELMOASLDQSVTHLMGLFEPGDTKYETHRDPITLPSLMENTEAAALRLLS
 301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGVAYQALTEAVMEDDAIERAQSQTSEEDTLILVTADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDKAYTIVLLYGNCGPGYV
 401 LKDGARPDVTESESGSPDYQQQAAPLDEETHGCHDVAVFARGPQAHLVHGQEQSFVAHVMAFAACLEPYTACDLAPPACTTD

RefSEQ hALPI (secuencia de proteína madura con número de acceso: NM_001631.3) (SEQ ID NO: 2):

1 VIPAEENPAFWNRQAAEALDAAKKLQPIQKVAKNLIIFLGDGLGVPVTATRIILKGQKNGKLGPEETPLAMDRFPYALSKTYNVDRQVPDSAAATATAYL
 101 CGVKANFQITIGLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRKAQAGKSVGVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADMPASARQEGCQDIATQLISNMDIDVIL
 201 GGGKYMFPNGTDPPEYPADASQNGIRLDGKNLVQEWLAKHQAGWYVNNRTELMOASLDQSVTHLMGLFEPGDTKYETHRDPITLPSLMENTEAAALRLLS
 301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGVAYQALTEAVMEDDAIERAQSQTSEEDTLILVTADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDKAYTIVLLYGNCGPGYV
 401 FNSCVRPDVNESESGSPDYQQQAAPLDEETHGCHDVAVFARGPQAHLVHGQEQSFVAHVMAFAACLEPYTACDLAPPACTTD

RefSEQ hALPP (secuencia de proteína madura con número de acceso: NM_001632.3) (SEQ ID NO: 3):

1 IIPVEEENPAFWNRQAAEALDAAKKLQPAQTAANKLIIFLGDGMGVSTVTAAIRILKGQKDKLGPEIPLAMDRFPYVALSKTYNVDRQVPDSGATATAYL
 101 CGVKGNFQITIGLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRKAQAGKSVGVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADMPASARQEGCQDIATQLISNMDIDVIL
 201 GGGKYMFPNGTDPPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAKHQAGYVNNRTELMOASLDQSVTHLMGLFEPGDMKYETHRDSITLPSLMENTEAAALRLLS
 301 RNPRGFFLFVEGGRIDHGHHEGRAYRALTETIMFDDAIERAQSQTSEEDTLISLVTADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDKAYTIVLLYGNCGPGYV
 401 LKDGARPDVTESESGSPDYQQQAAPLDEETHACHDVAVFARGPQAHLVHGQEQTFIAHVMAFAACLEPYTACDLAPPAGTTD

Secuencia de sALPI-ALPP-CD (SEQ ID NO: 4):

1 VIPAEENPAFWNRQAAEALDAAKKLQPIQKVAKNLIIFLGDGLGVPVTATRIILKGQKNGKLGPEETPLAMDRFPYALSKTYNVDRQVPDSAAATATAYL
 101 CGVKANFQITIGLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRKAQAGKSVGVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADMPASARQEGCQDIATQLISNMDIDVIL
 201 GGGKYMFPNGTDPPEYPADASQNGIRLDGKNLVQEWLAKHQAGWYVNNRTELMOASLDQSVTHLMGLFEPGDTKYETHRDPITLPSLMENTEAAALRLLS
 301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGVAYQALTEAVMEDDAIERAQSQTSEEDTLILVTADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDKAYTIVLLYGNCGPGYV
 401 LKDGARPDVTESESGSPDYQQQAAPLDEETHGCHDVAVFARGPQAHLVHGQEQSFVAHVMAFAACLEPYTACDLAPPACTTD

Secuencia N-Terminal (1 - 365) de hALPI (SEQ ID NO: 5):

1 VIPAEENPAFWNRQAAEALDAAKKLQPIQKVAKNLIIFLGDGLGVPVTATRIILKGQKNGKLGPEETPLAMDRFPYALSKTYNVDRQVPDSAAATATAYL
 101 CGVKANFQITIGLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRKAQAGKSVGVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADMPASARQEGCQDIATQLISNMDIDVIL
 201 GGGKYMFPNGTDPPEYPADASQNGIRLDGKNLVQEWLAKHQAGWYVNNRTELMOASLDQSVTHLMGLFEPGDTKYETHRDPITLPSLMENTEAAALRLLS
 301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGVAYQALTEAVMEDDAIERAQSQTSEEDTLILVTADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDKAYTIVLLYGNCGPGYV
 401 LKDGARPDVTESESGSPDYQQQAAPLDEETHGCHDVAVFARGPQAHLVHGQEQSFVAHVMAFAACLEPYTACDLAPPACTTD

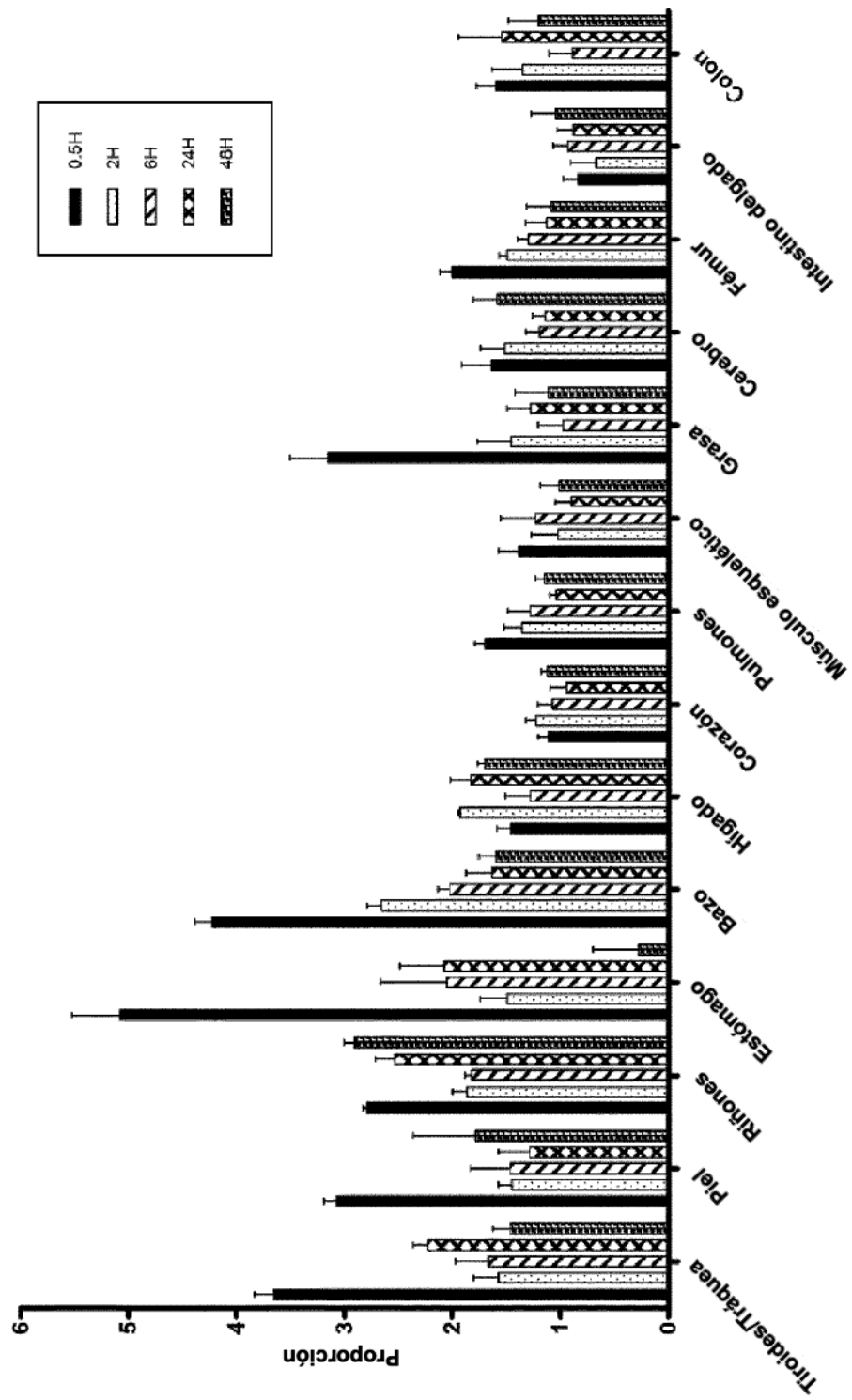
Secuencia de dominio en corona (366 - 430) de PLAP (SEQ ID NO: 6):

366 GYPLRGSSIFGLAPGKARDKAYTIVLLYGNCGYVILKDGARPDVTESESGSPDYQQQAAPLDEE

Secuencia C-Terminal (431 - 484) de hALPI (SEQ ID NO: 7):

431 THGGEDVAVFARGPQAHLVHGQEQSFVAHVMAFAACLEPYTACDLAPPACTTD

FIG. 1



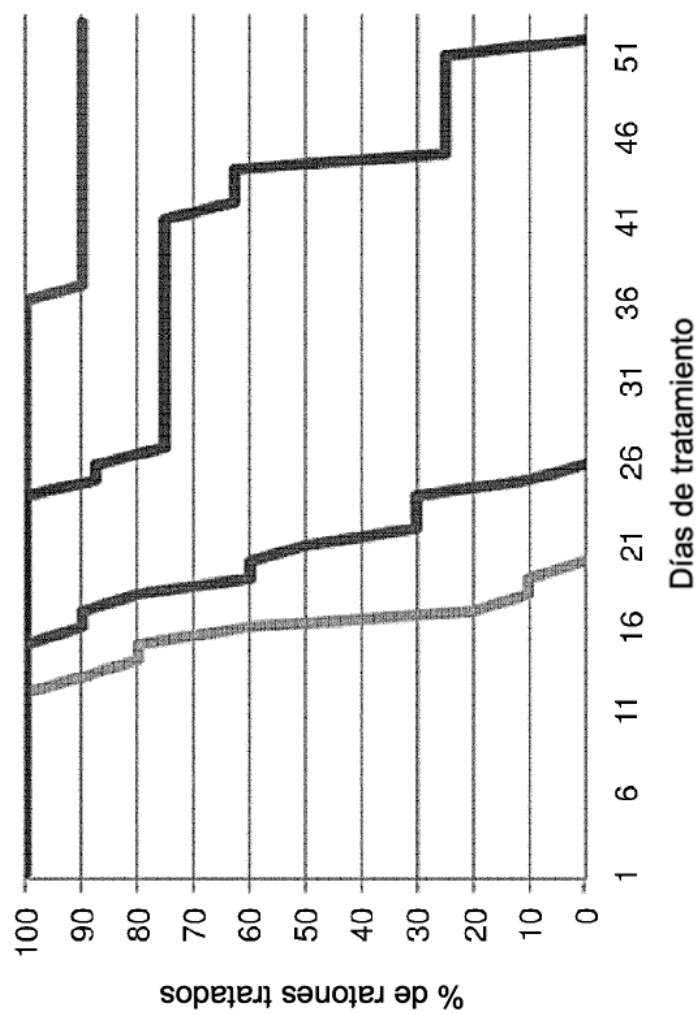


FIG. 3

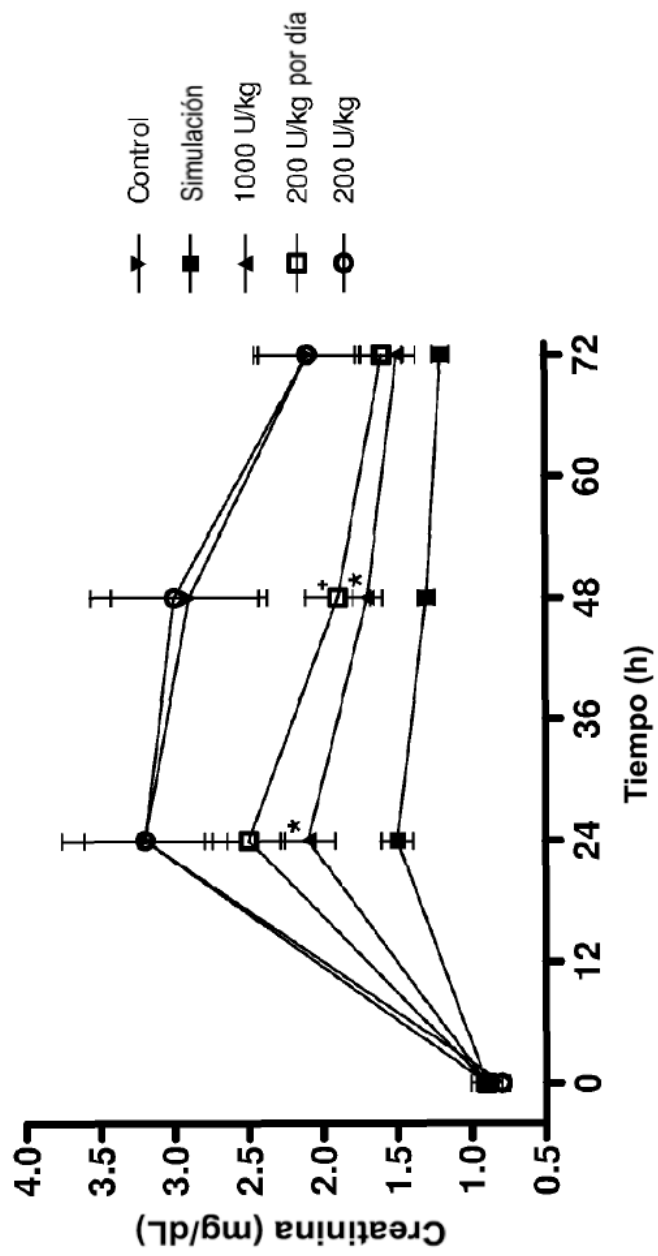


FIG. 4

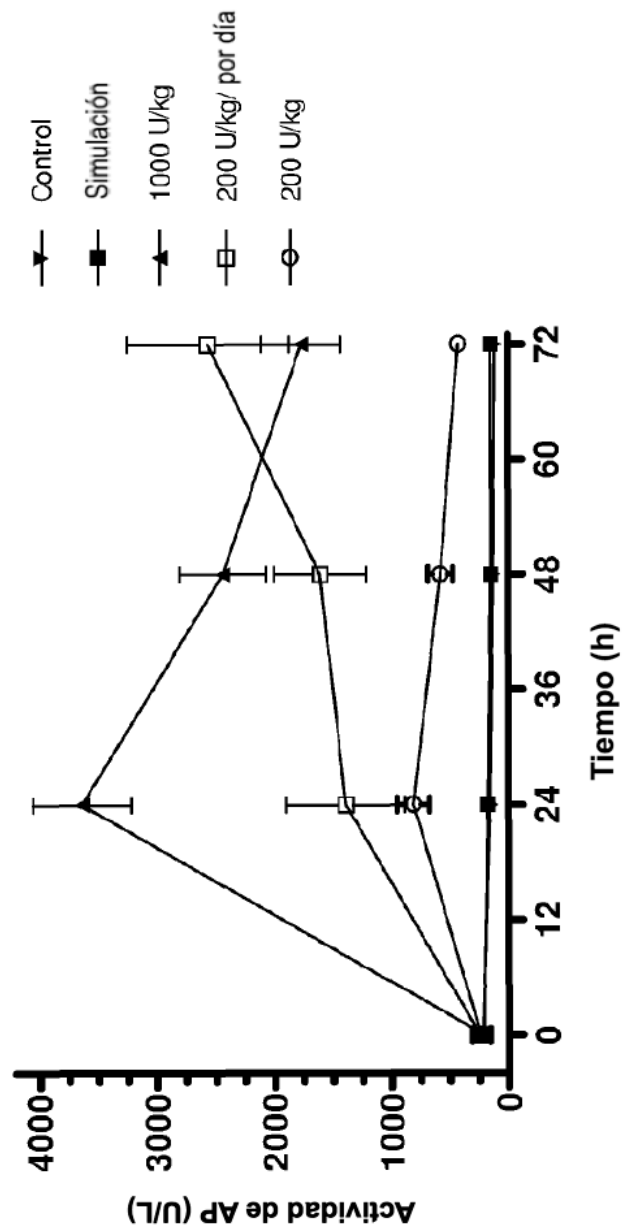


FIG. 5

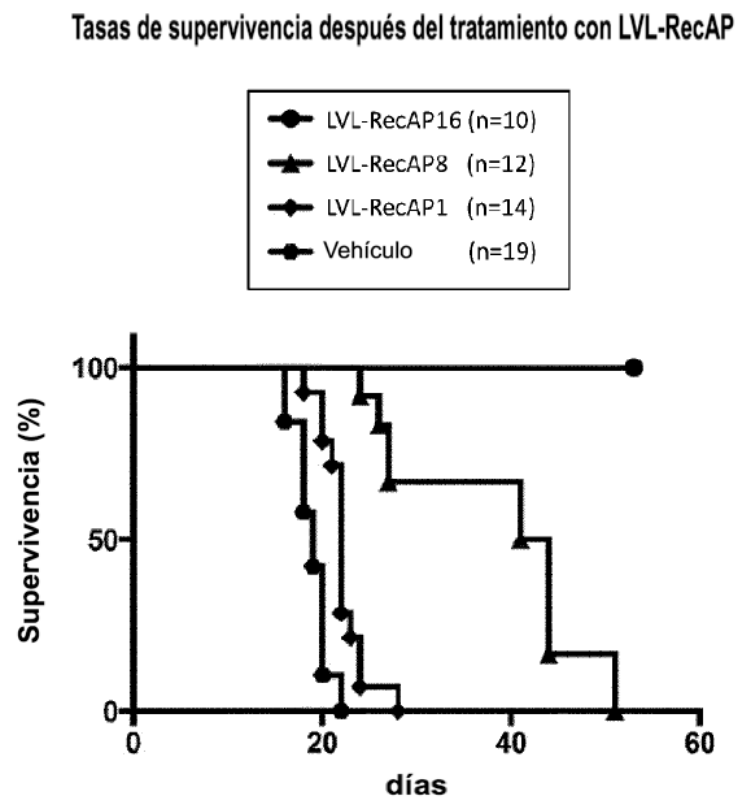


FIG. 6A

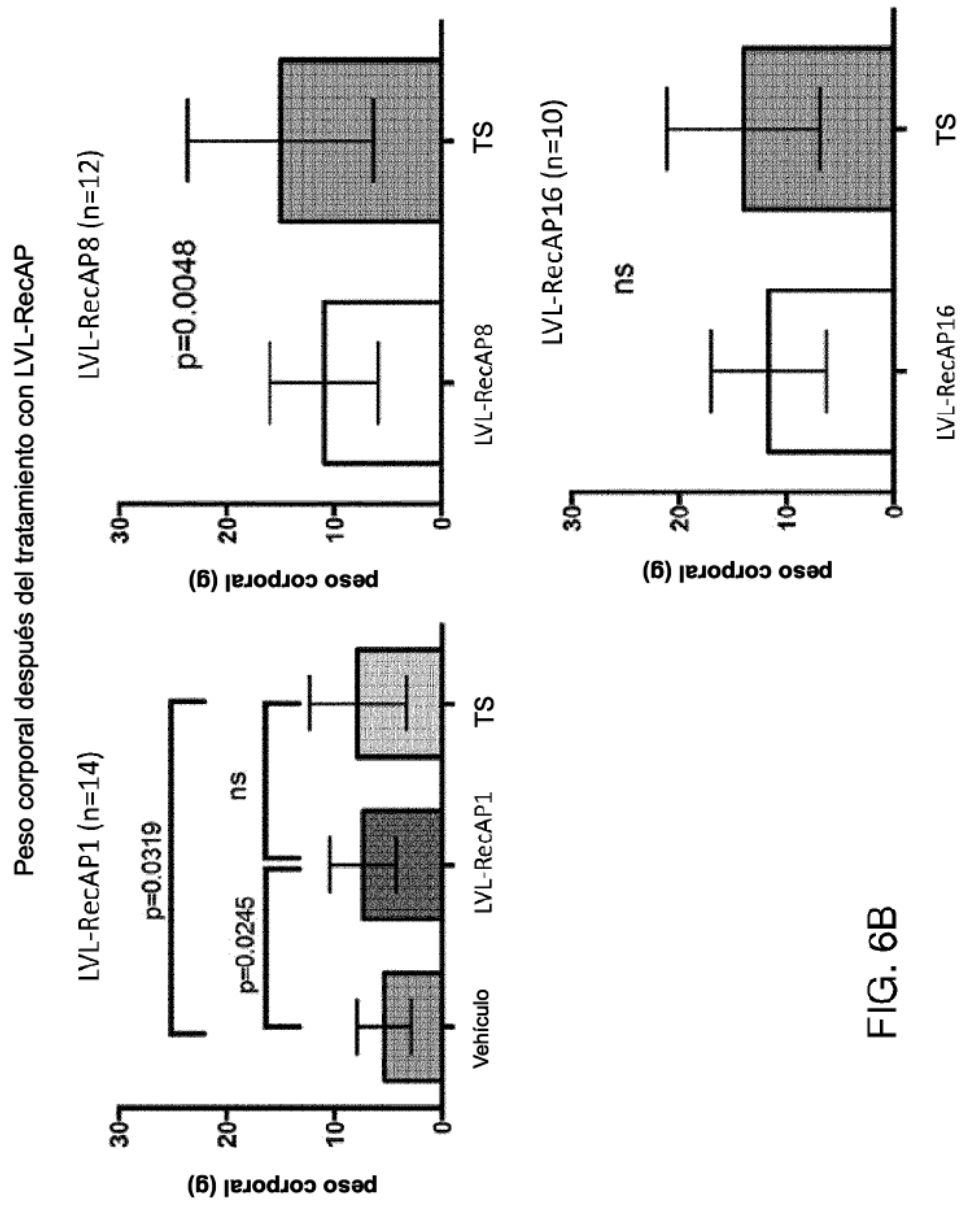


FIG. 6B

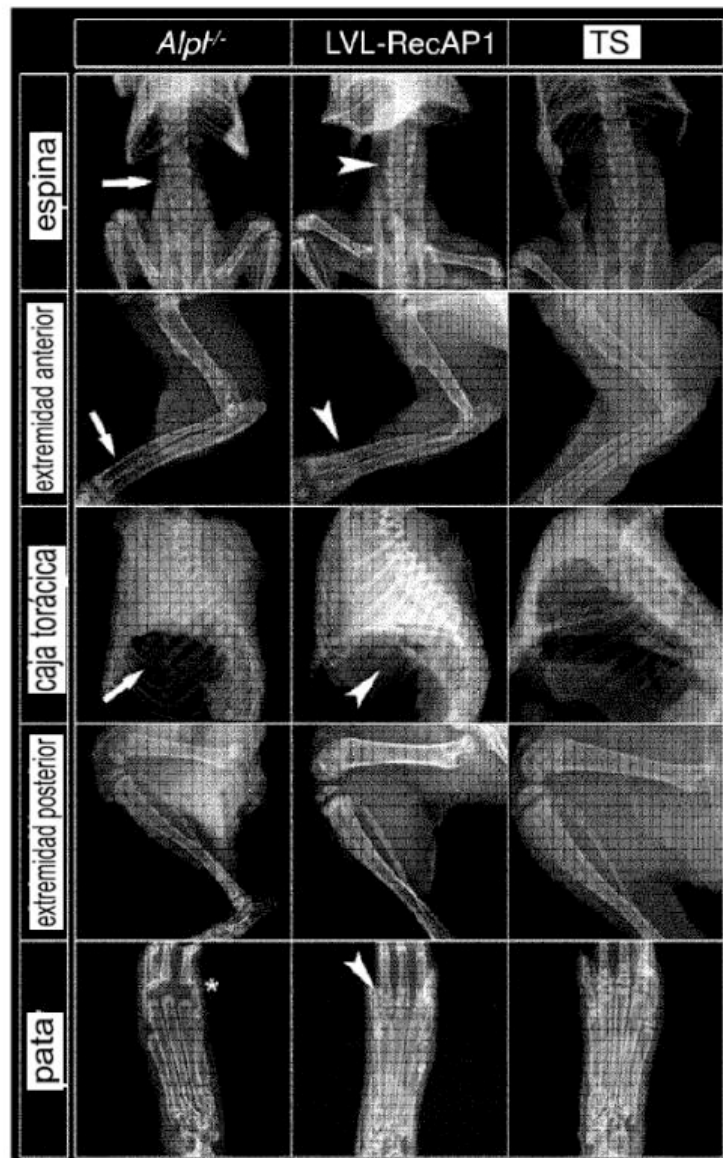


FIG. 7A

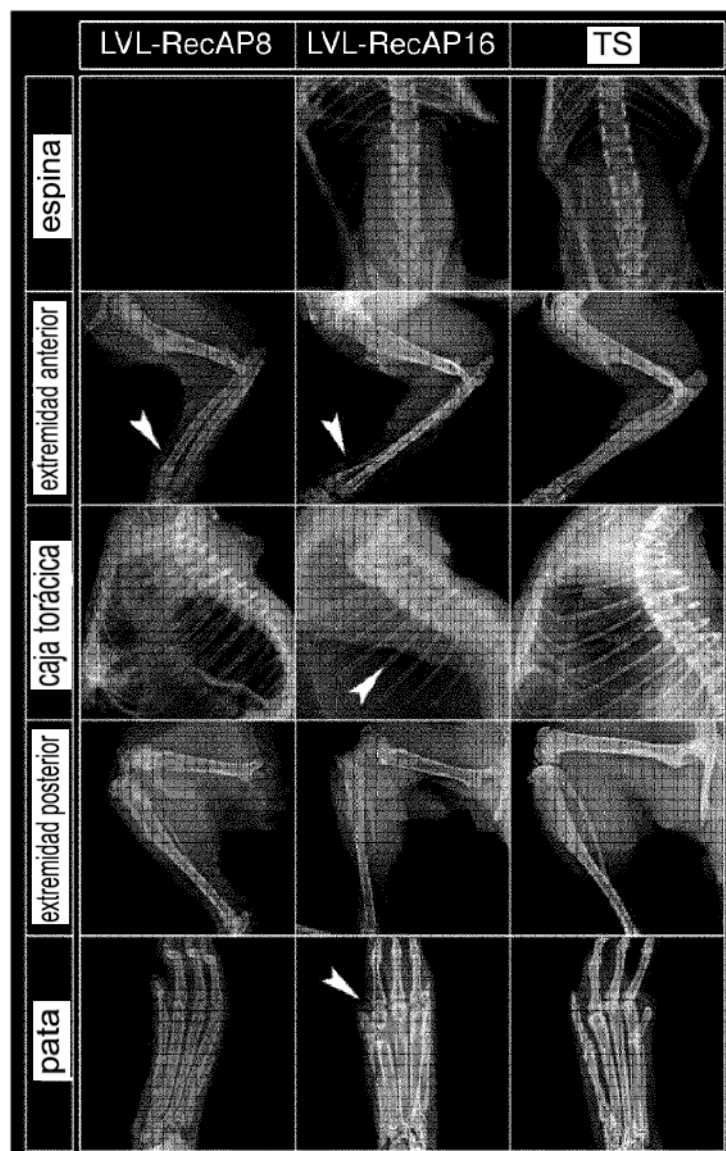


FIG. 7B

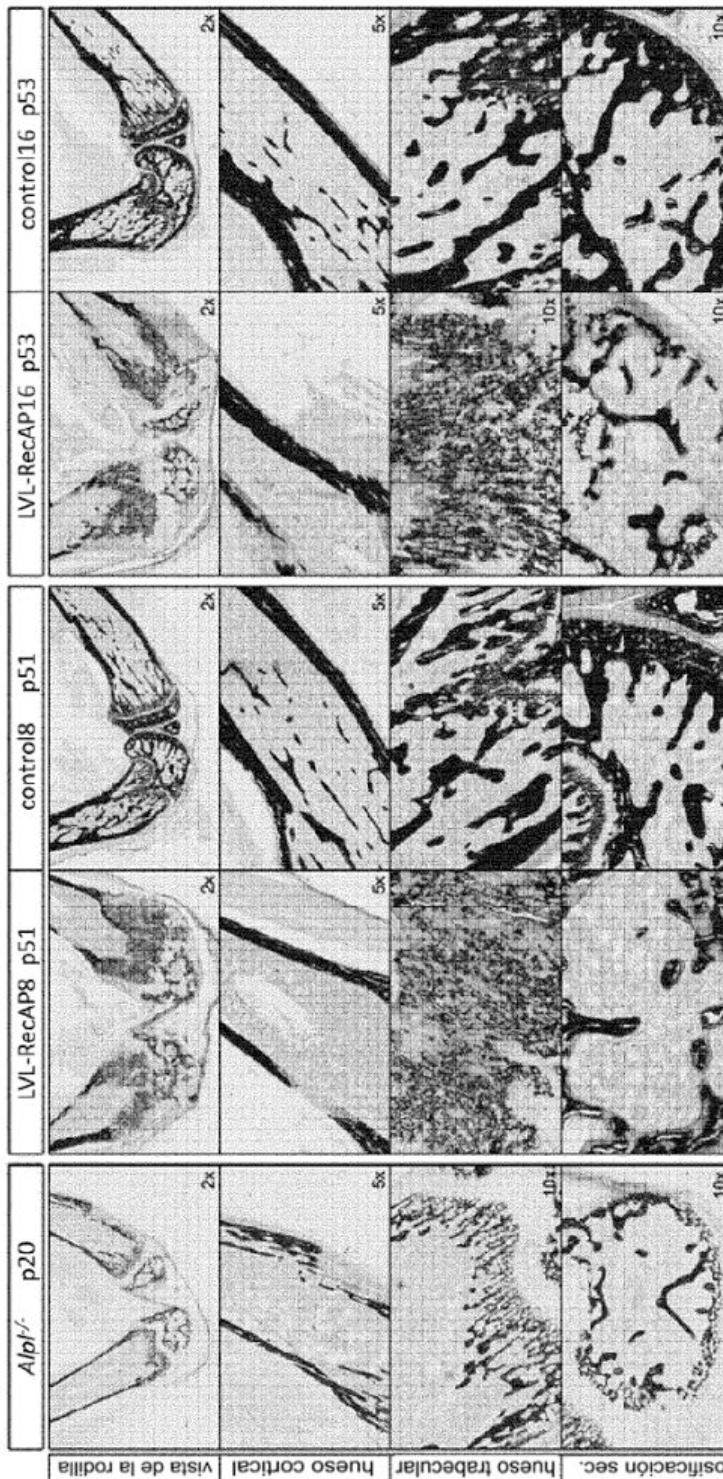


FIG. 8A

volumen óseo

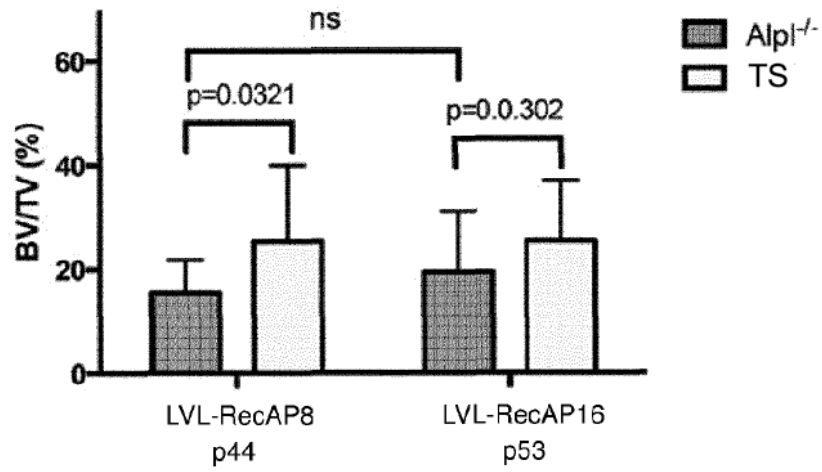


FIG. 8B

volumen osteoide

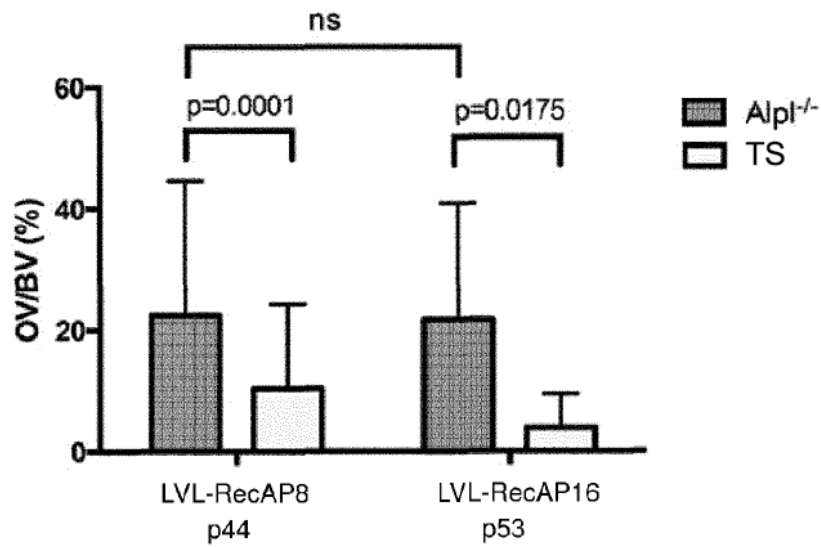


FIG. 8C

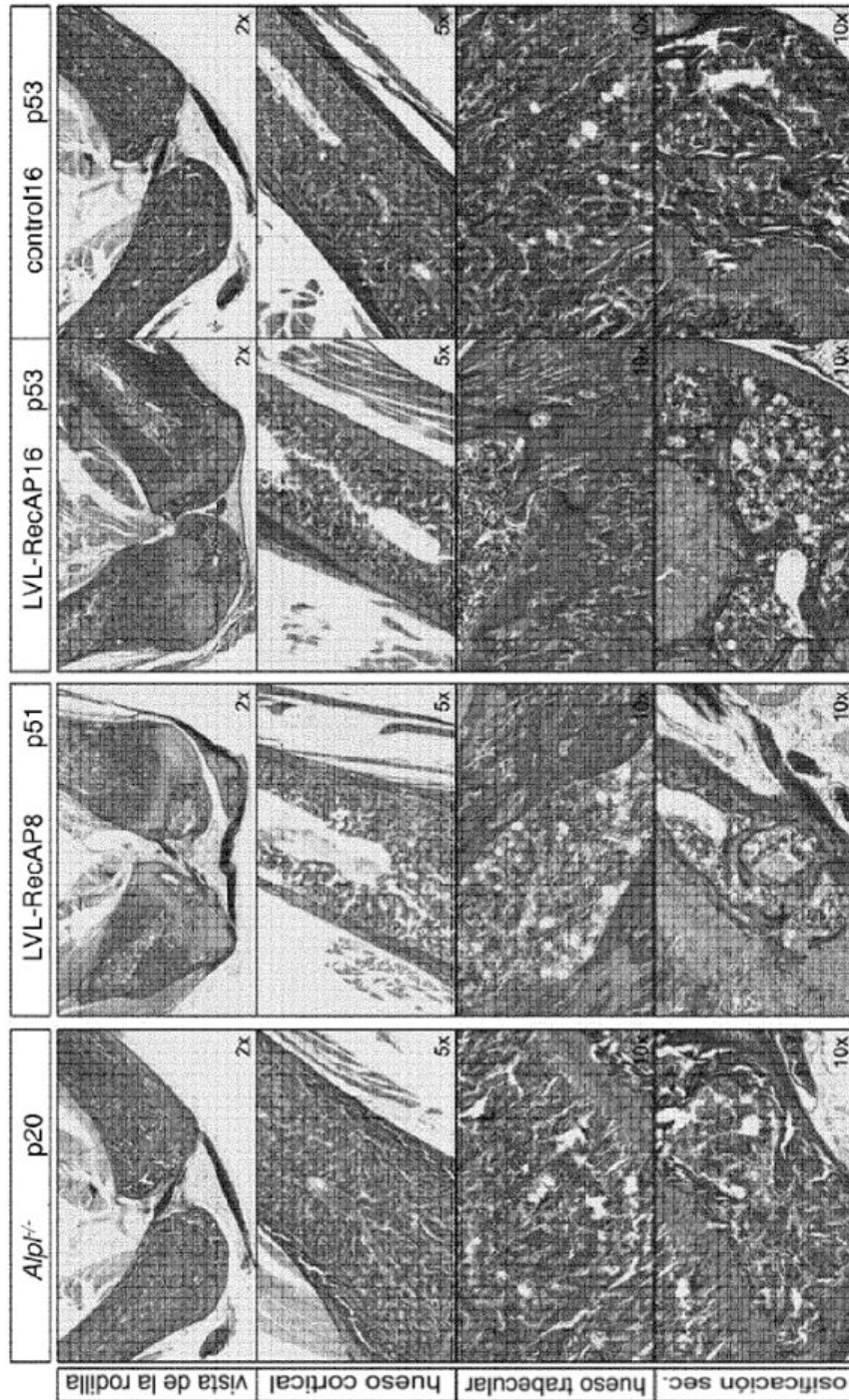


FIG. 9A

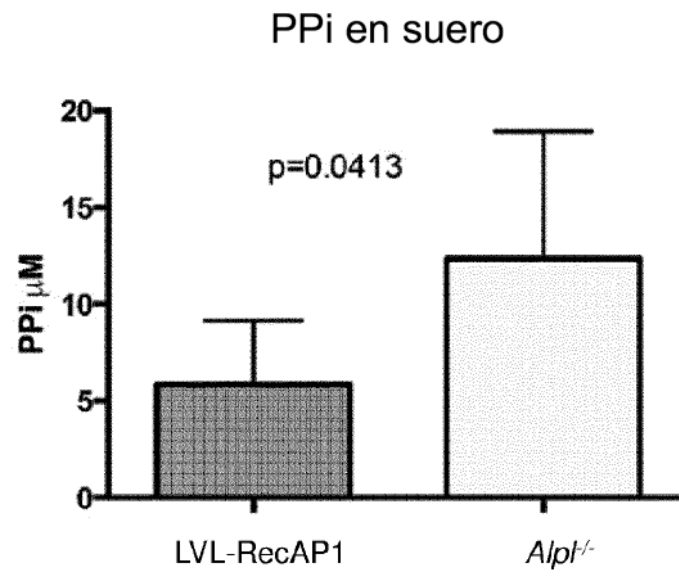


FIG. 9B

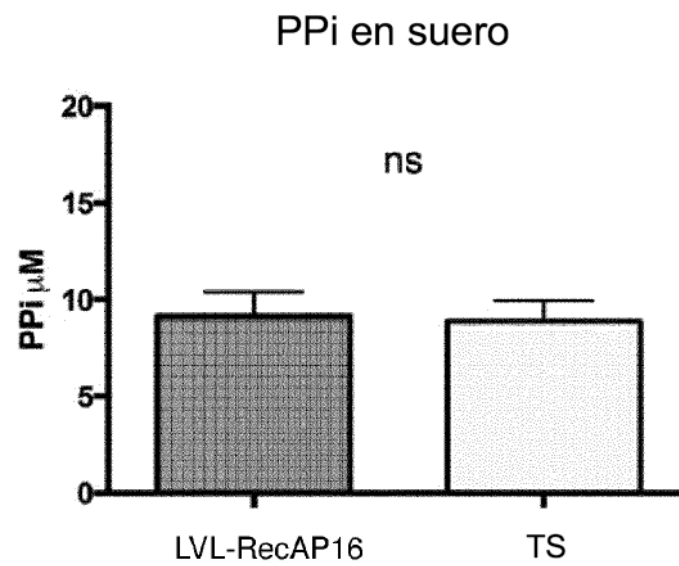


FIG. 9C

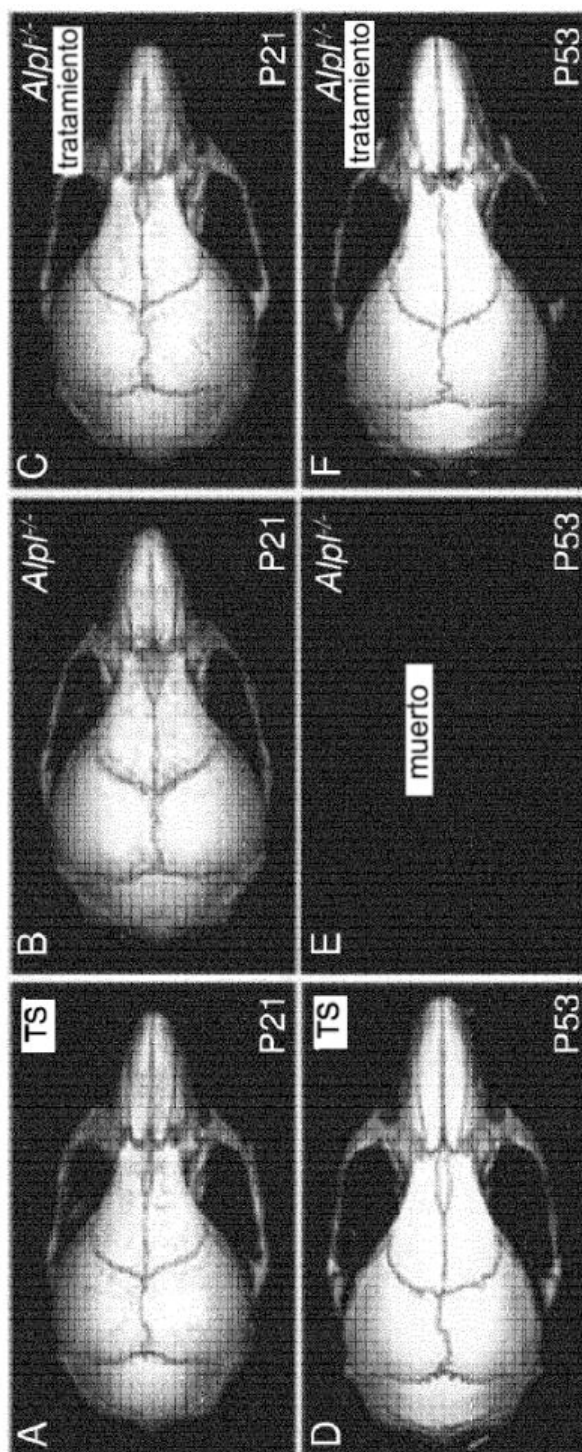


FIG. 10

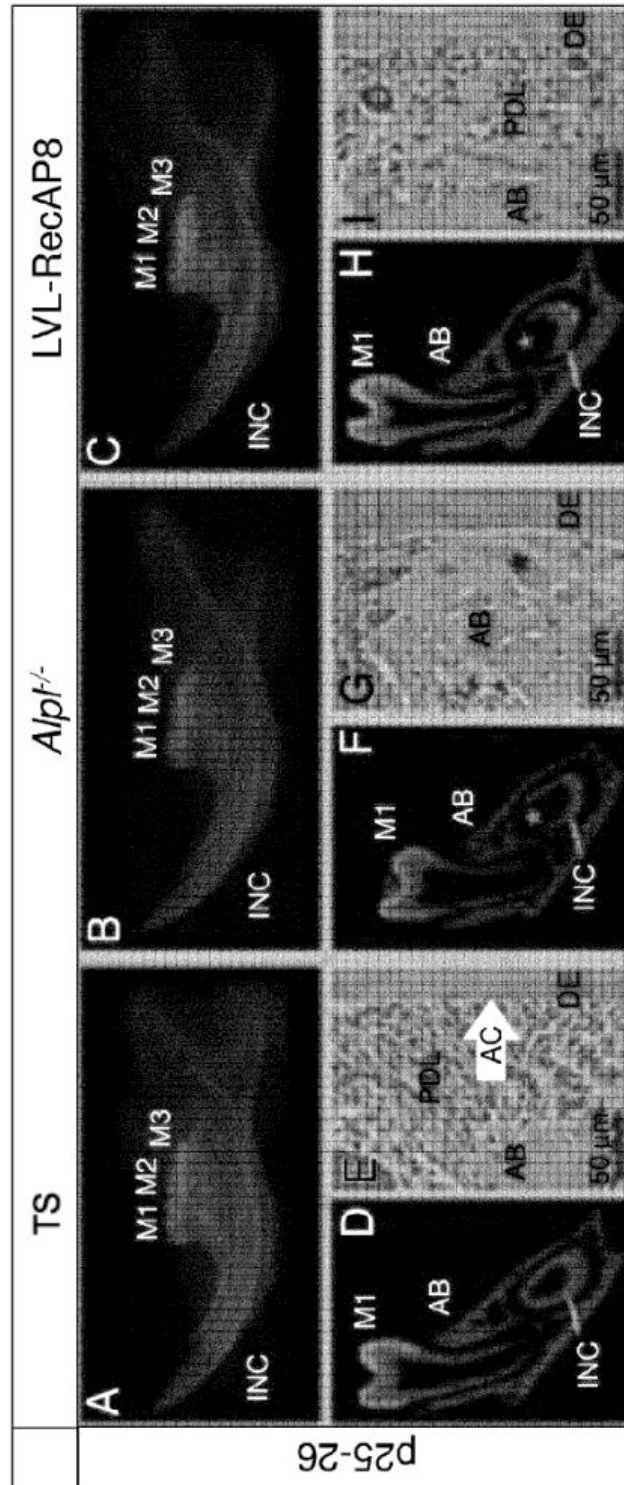
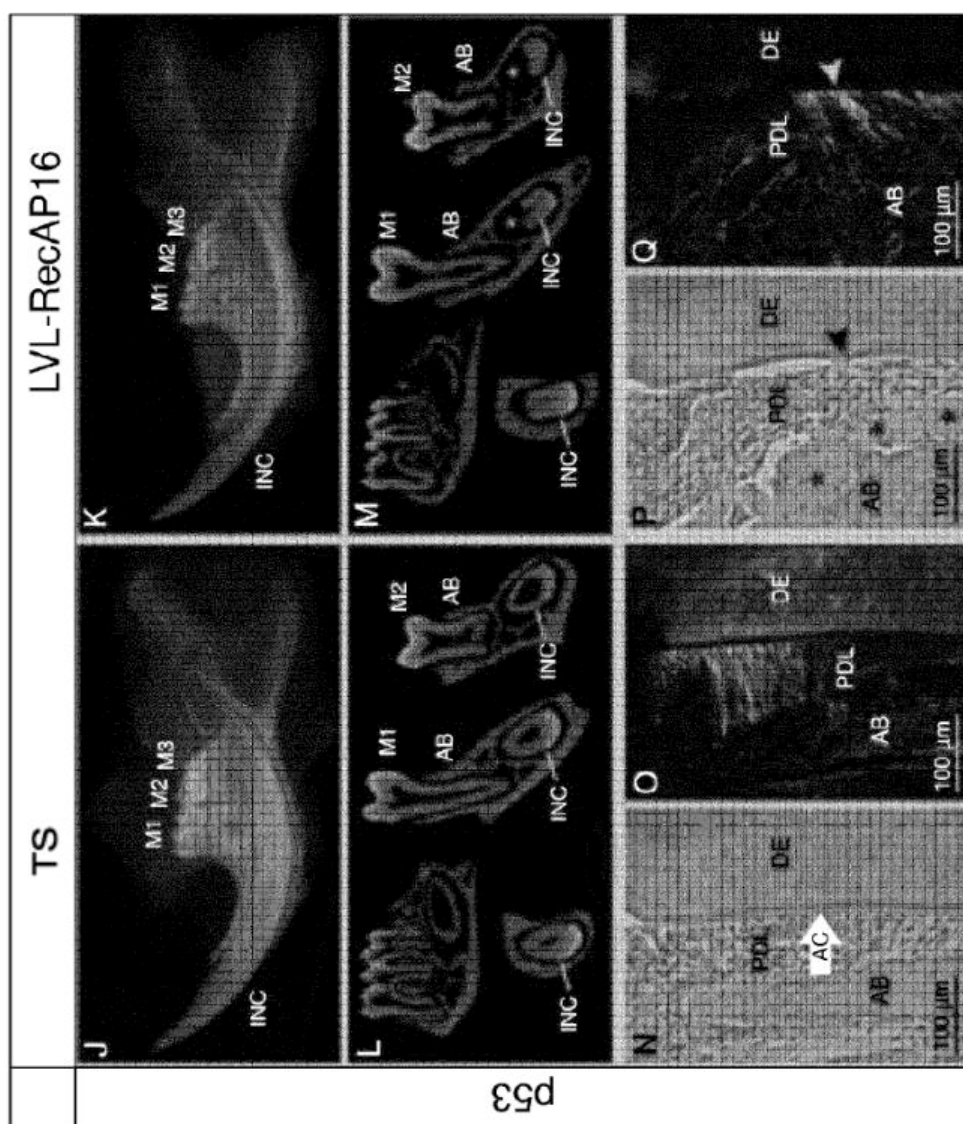


FIG. 11



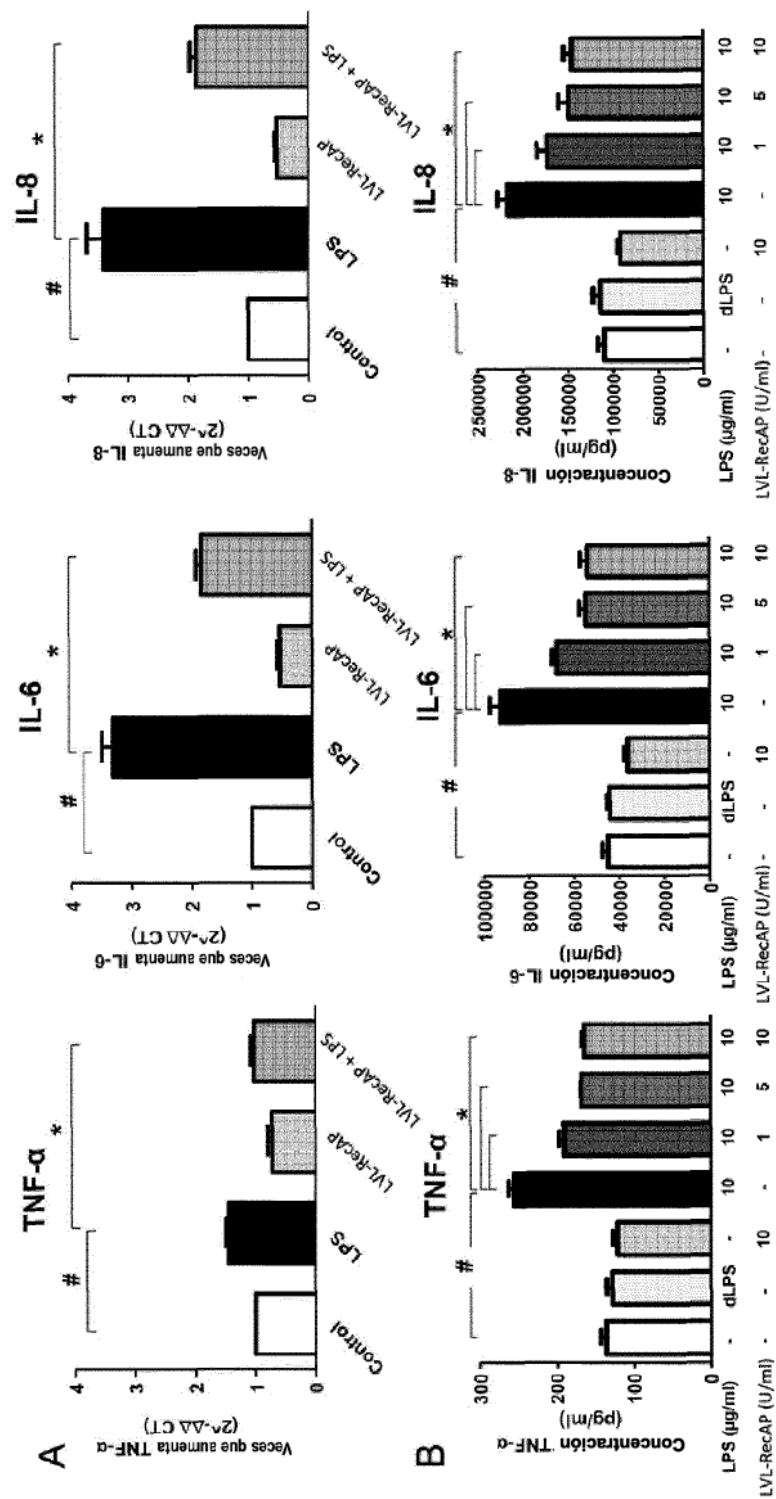


FIG. 12

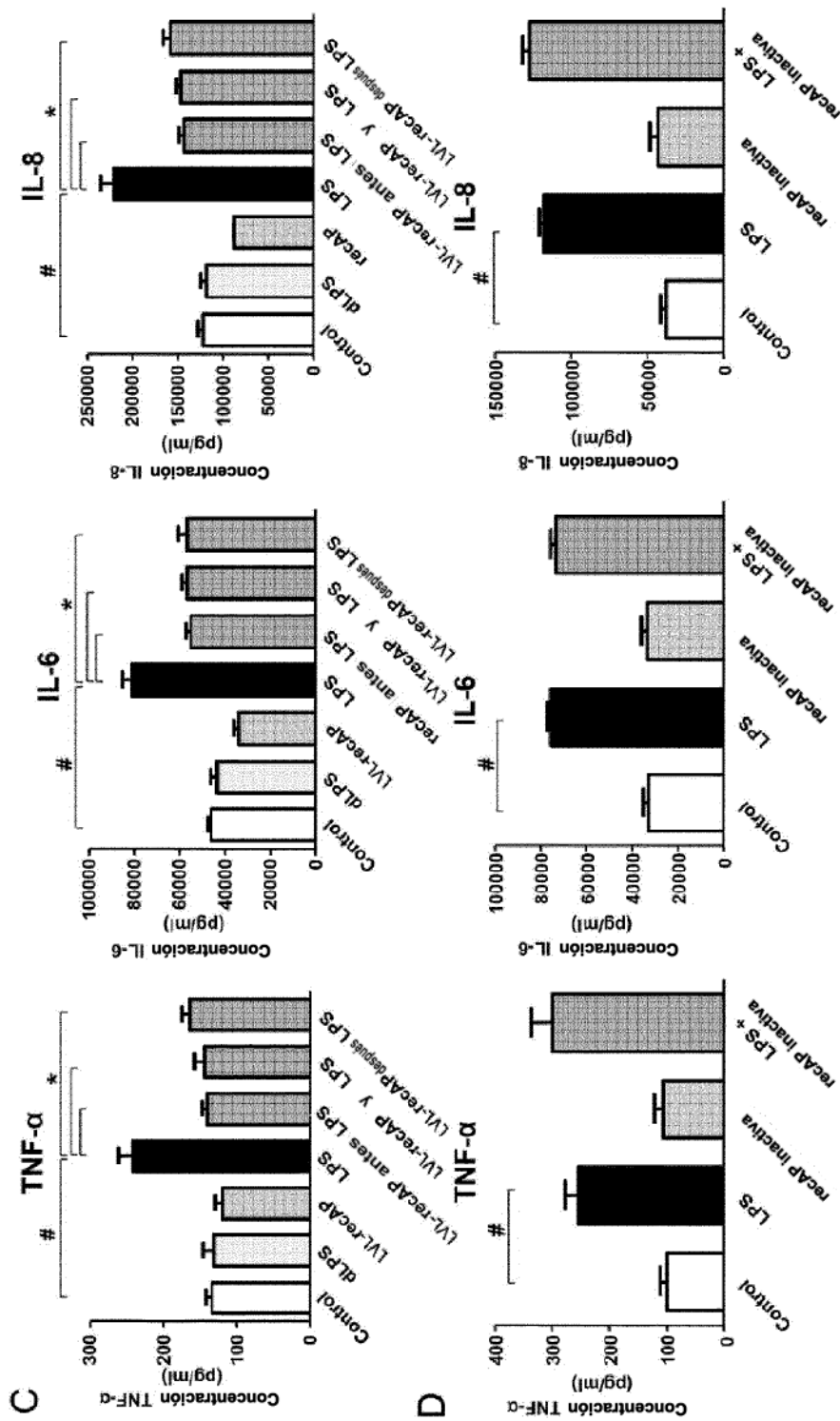


FIG. 12, Continuation

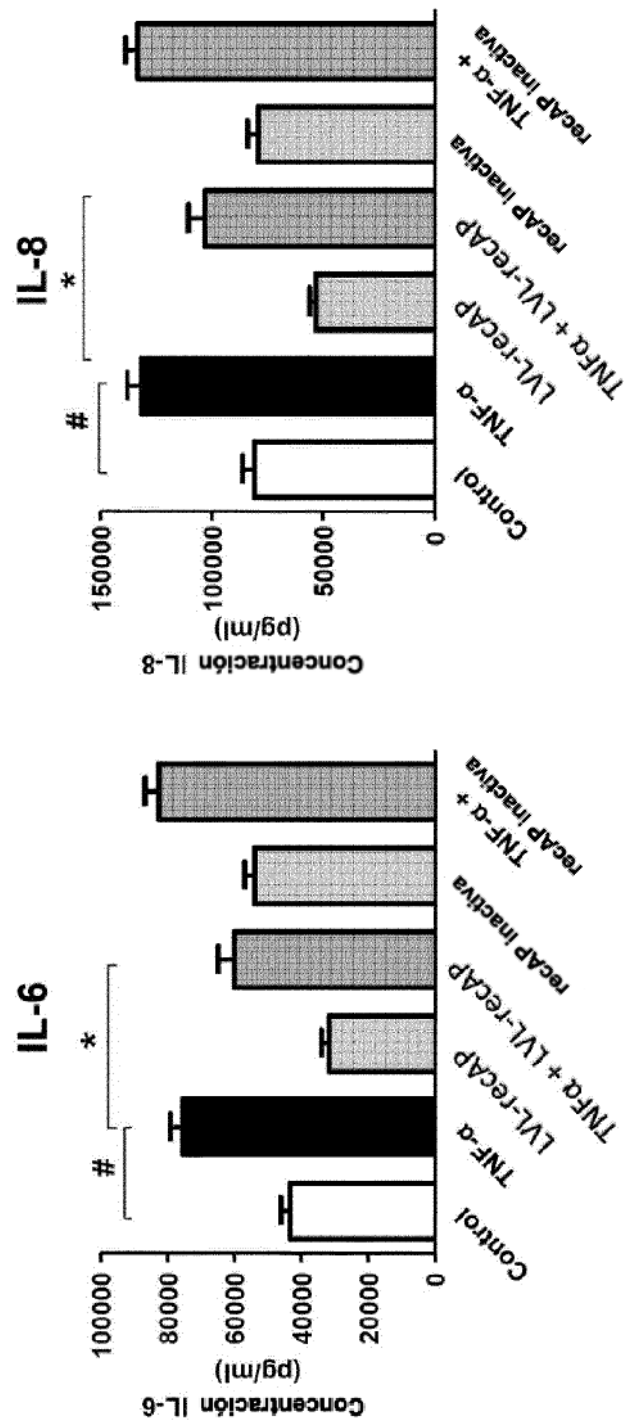


FIG. 13A

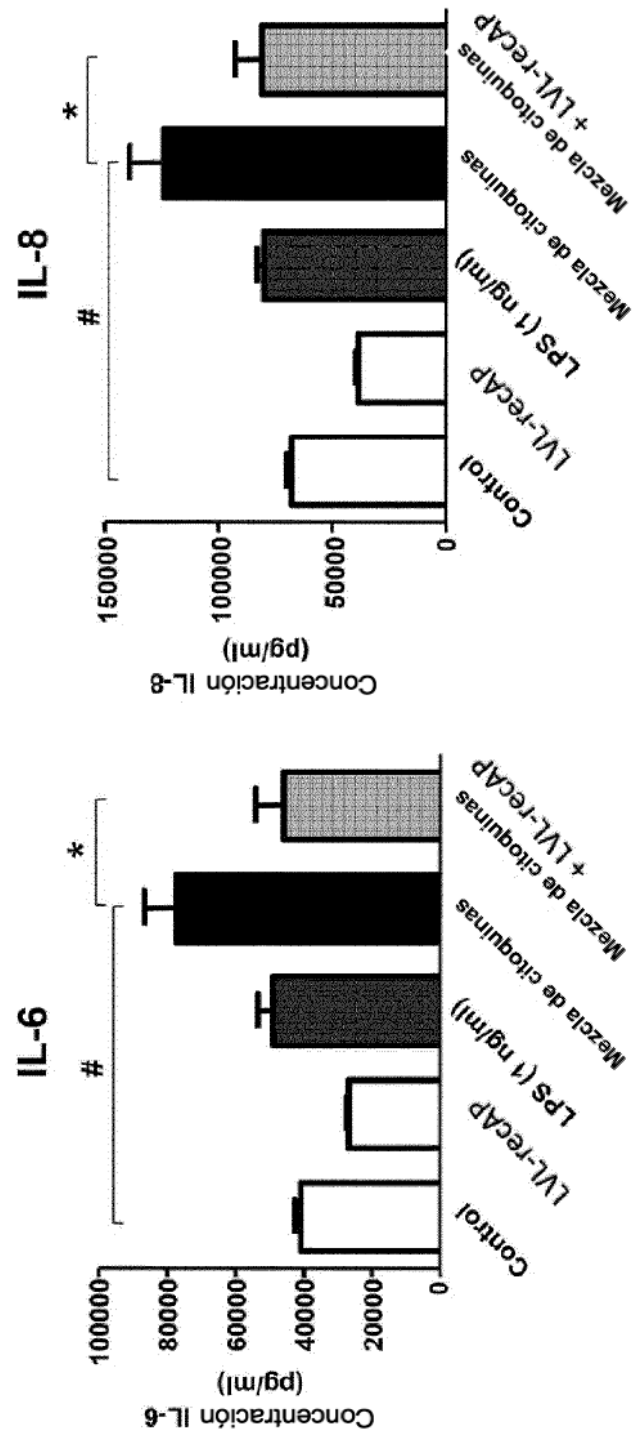


FIG. 13B

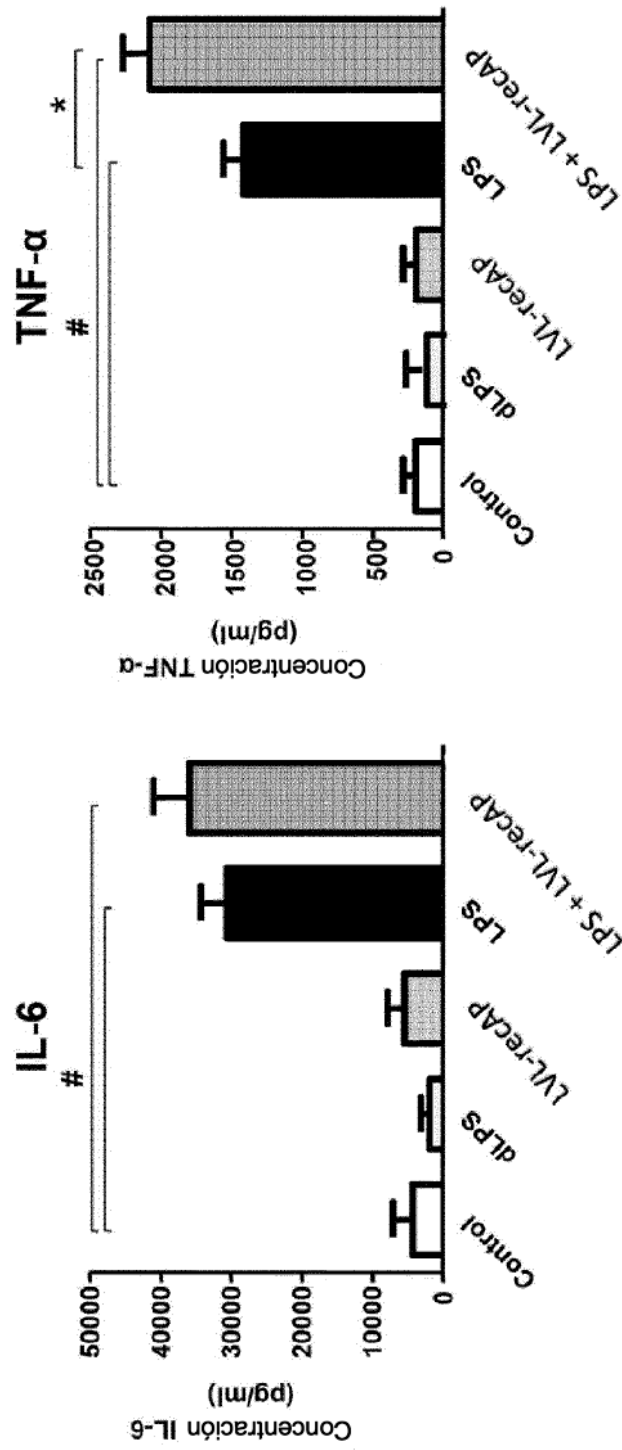


FIG. 13C

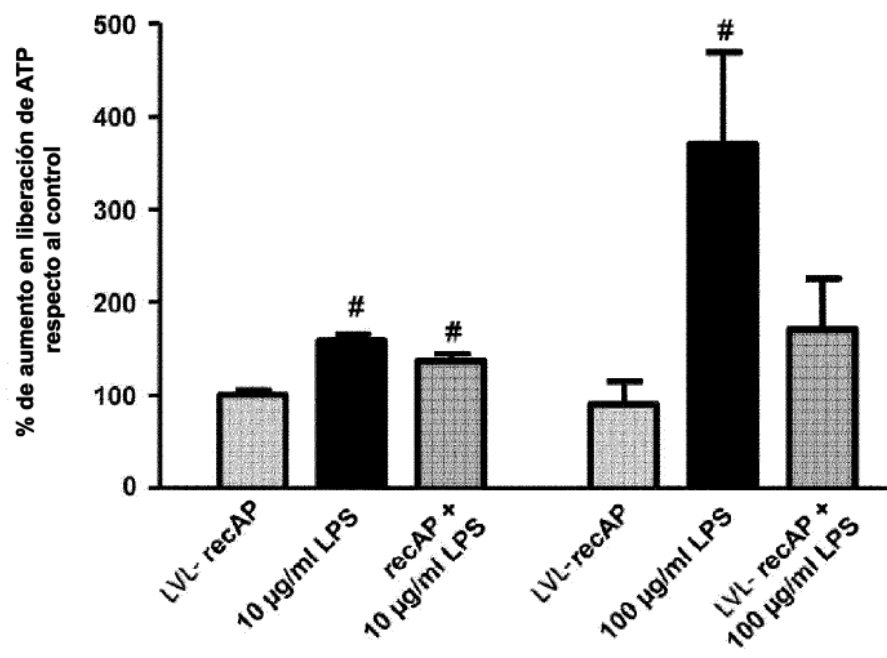


FIG. 14

Eliminación del plasma de FITC-Sinistrina: t = 2 - 5 h

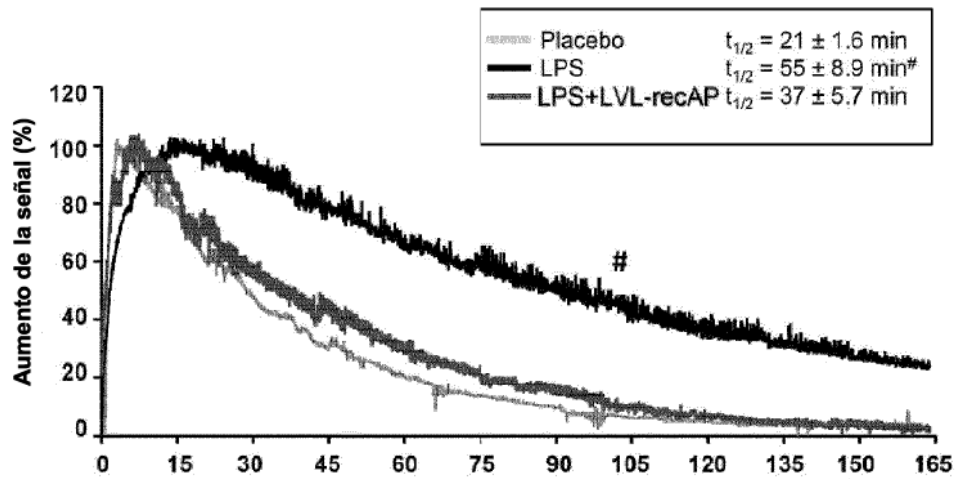


FIG. 15A

Eliminación del plasma de FITC-Sinistrina: t = 21,5 - 24 h

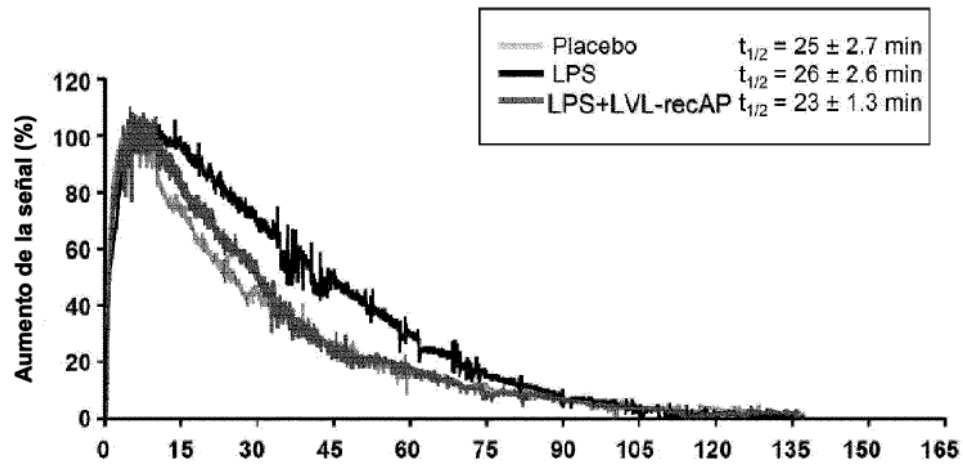


FIG. 15B

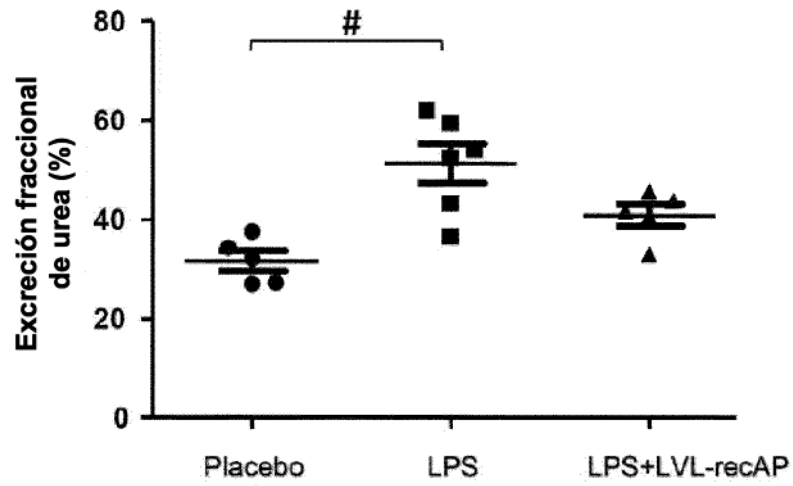


FIG. 15C

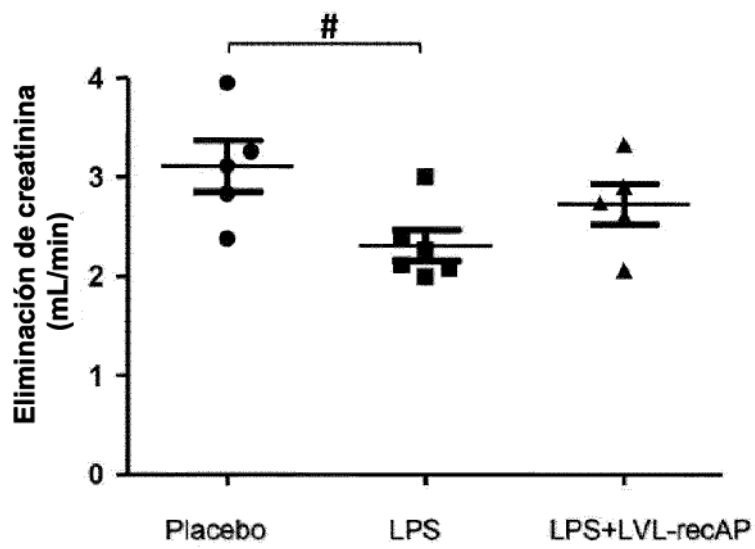


FIG. 15D

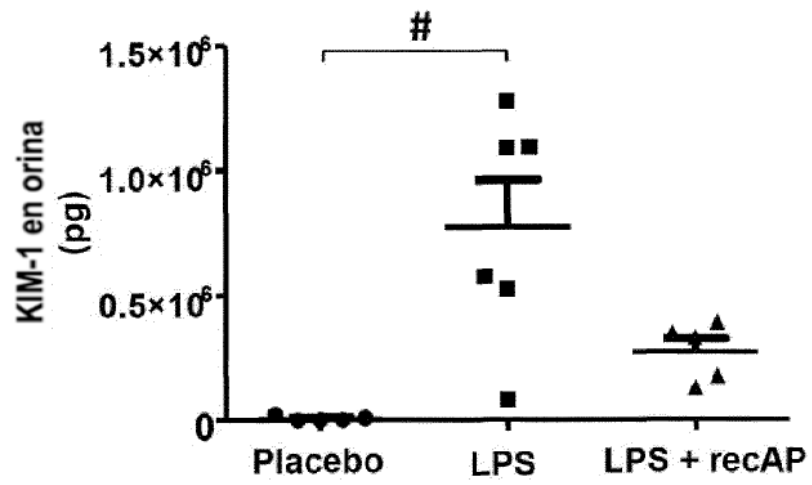


FIG. 16A

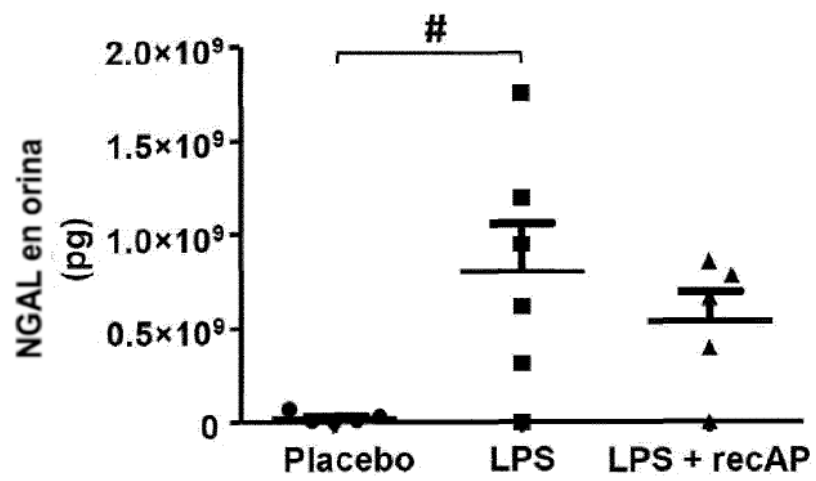


FIG. 16B

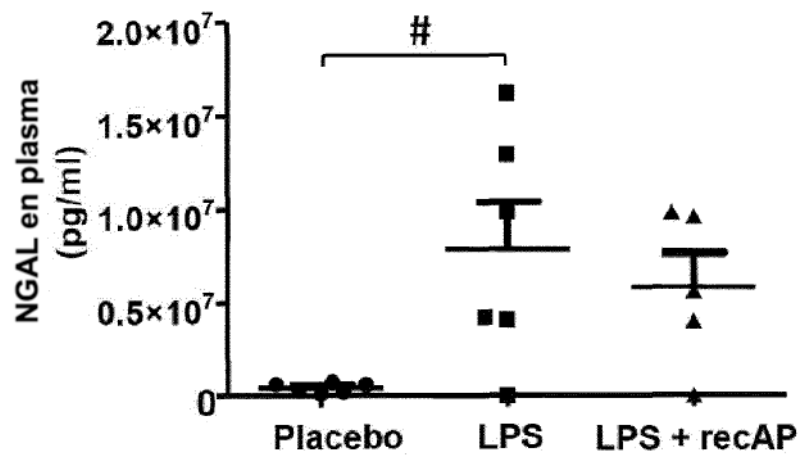


FIG. 16C

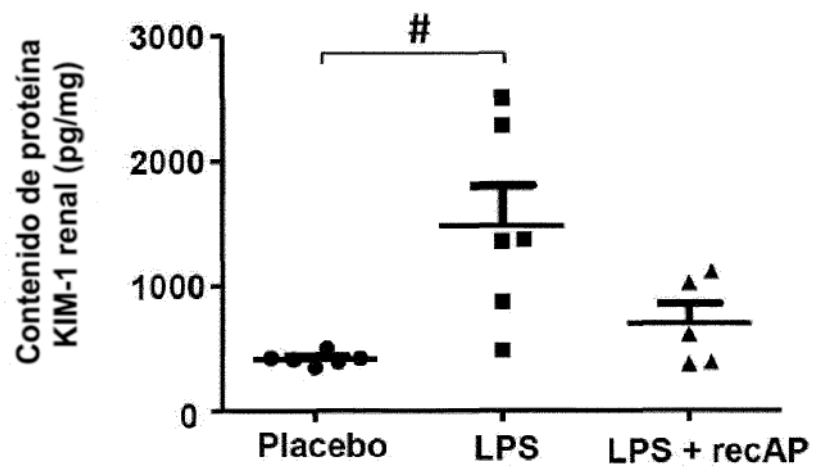


FIG. 16D

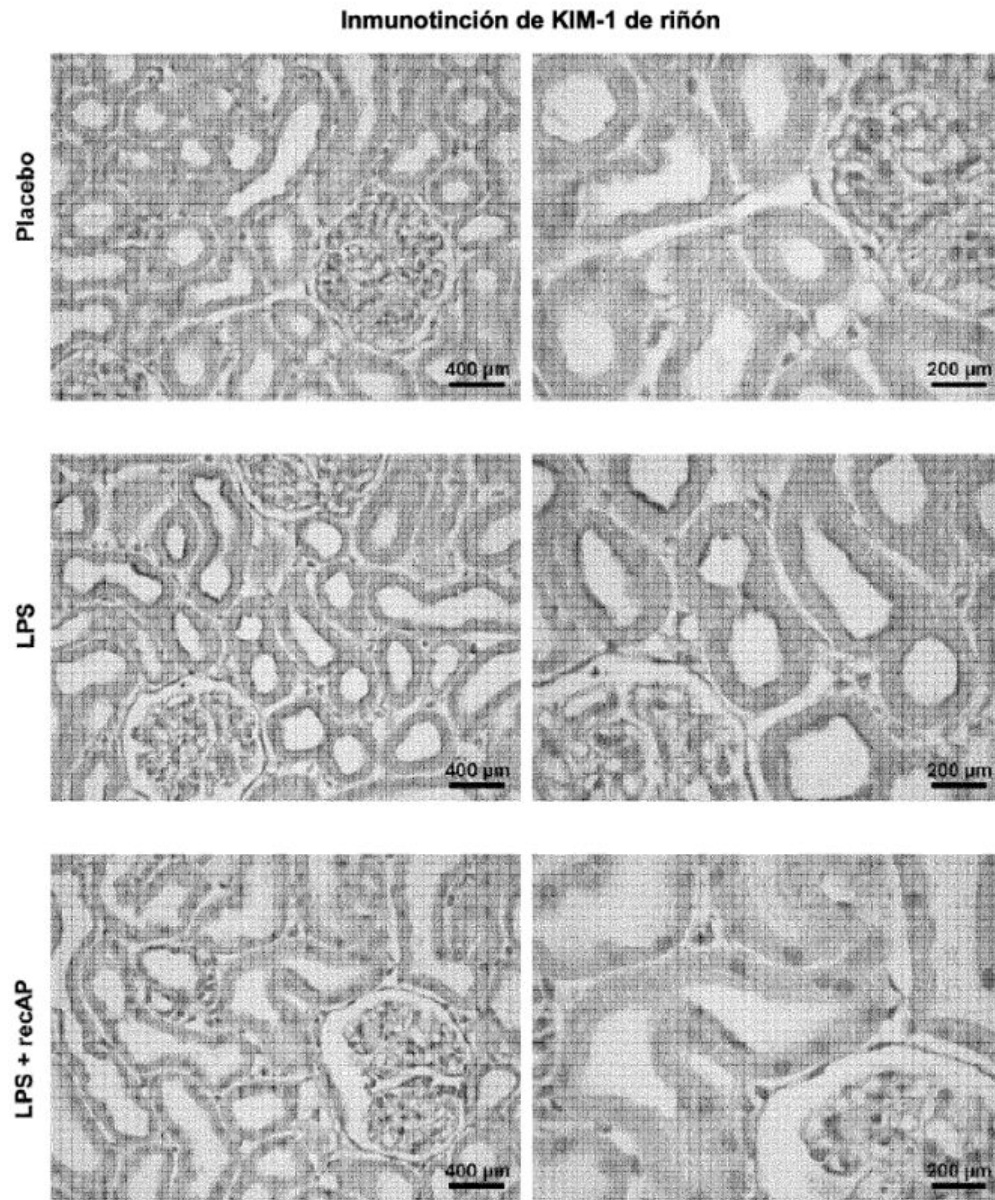


FIG. 16E

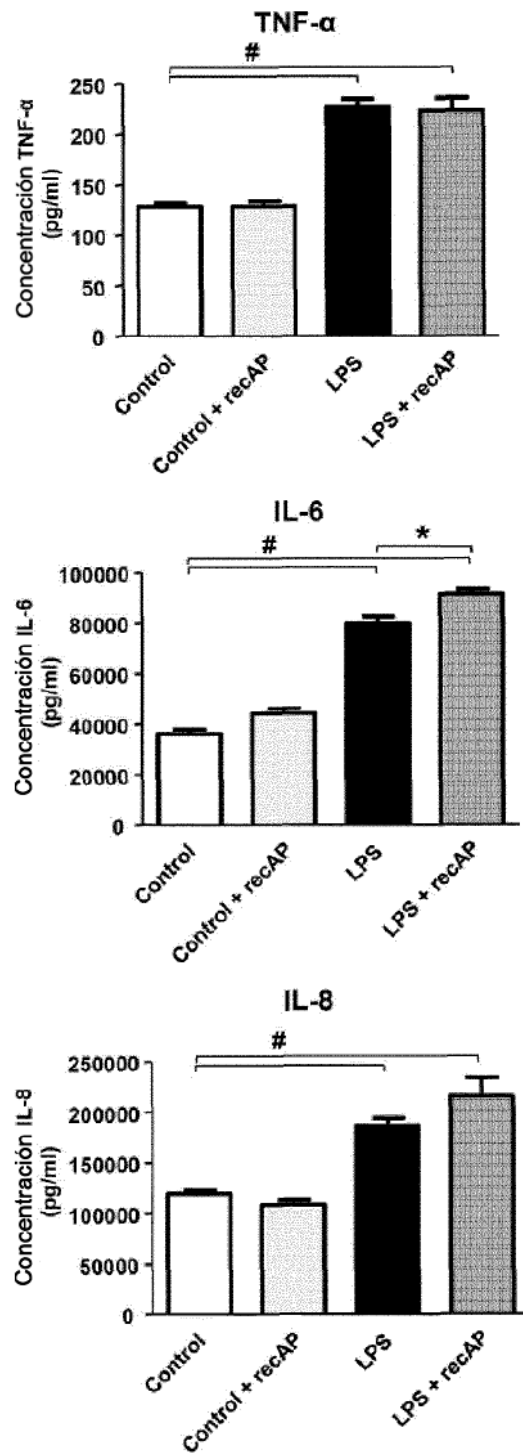


FIG. 17

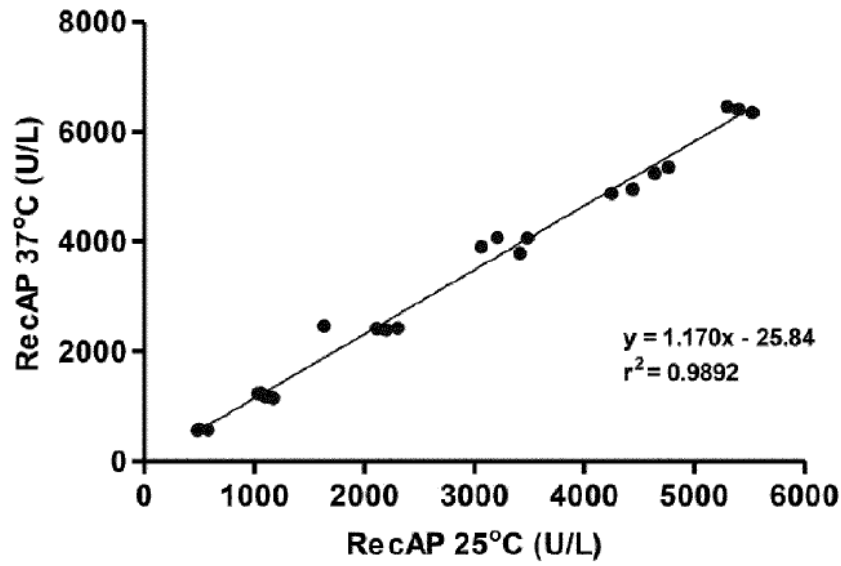


FIG. 18

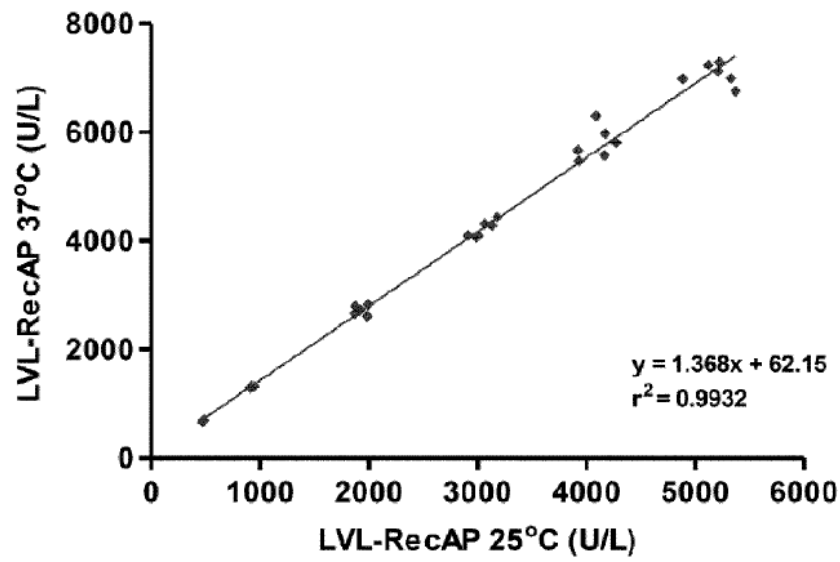


FIG. 19

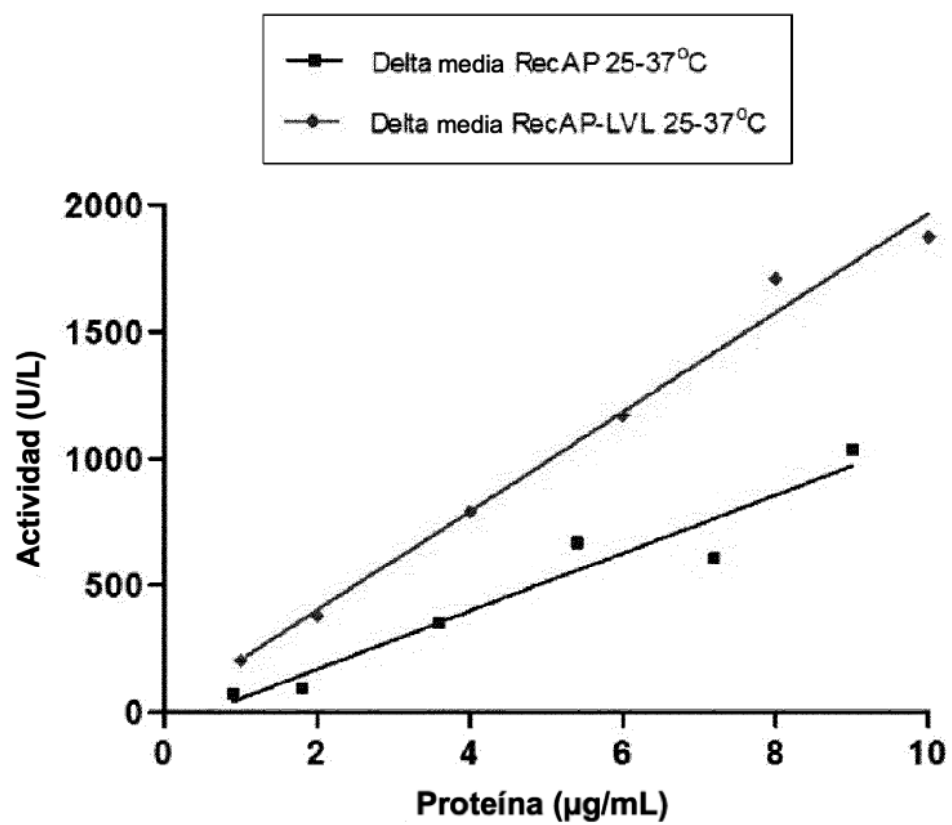


FIG. 20