

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 786**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2005** **E 11000196 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018** **EP 2348114**

54 Título: **Conjugados para administración ósea y procedimiento de uso de estos para dirigir proteínas al hueso**

30 Prioridad:

21.04.2004 US 563828 P

23.07.2004 US 590347 P

04.10.2004 US 614984 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2018

73 Titular/es:

ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

100 College Street

New Haven, CT 06510, US

72 Inventor/es:

CRINE, PHILIPPE;

BOILEAU, GUY;

LEMIRE, ISABELLE y

LOISEL, THOMAS P.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 687 786 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados para administración ósea y procedimiento de uso de estos para dirigir proteínas al hueso

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos codificantes de conjugados para administración ósea.

Se describen composiciones para administración ósea que comprenden motivos peptídicos, modificados dentro de la estructura de una proteína a través de tecnología de ADN recombinante para promover la unión a la matriz ósea.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los avances tecnológicos en biología molecular, la producción de proteínas recombinantes y la purificación de proteínas a gran escala han permitido la producción de grandes cantidades de proteínas que ahora se utilizan como productos biofarmacéuticos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales y las formas solubles del receptor TNF- α se han utilizado en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tales como la enfermedad de Crohn o varias formas de psoriasis (1). Otro ejemplo de uso de proteína recombinante es la terapia de reemplazo enzimático (ERT). La ERT se ha utilizado para tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico. Este grupo de trastornos genéticos se caracteriza por la pérdida de la función de las enzimas lisosómicas, lo que produce patologías somáticas, y a veces neuronales, graves. En la ERT para estas enfermedades, los pacientes reciben una infusión con grandes dosis de enzimas normales. Estas enzimas infundidas después se interiorizan desde la circulación a través de los receptores de la superficie celular (receptor de manosa-6 fosfato) e ingresan en la vía endocítica en el camino hacia el sitio de acción, el lisosoma. No todos los intentos de tratar los trastornos genéticos a través de la ERT han resultado exitosos.

La hipofosfatasa es un tipo raro y hereditario de raquitismo u osteomalacia que ocurre con una incidencia de 1 por cada 100.000 nacimientos para la forma más grave de la enfermedad. Las formas más leves son más frecuentes. En este defecto del metabolismo innato, las mutaciones inactivan el gen que codifica la isoenzima no específica del tejido de la fosfatasa alcalina. Se caracteriza bioquímicamente por una actividad subnormal de la fosfatasa alcalina en suero. La deficiencia de fosfatasa alcalina en los osteoblastos y condrocitos deteriora la mineralización esquelética, lo que produce raquitismo u osteomalacia.

Existe una gama muy amplia de expresividad de la hipofosfatasa, que va desde una forma perinatal que a menudo causa el nacimiento de bebés muertos debido a un esqueleto sin mineralizar, hasta una forma más suave que solo presenta la pérdida prematura de los dientes. Los bebés y los niños gravemente afectados heredan la hipofosfatasa como un rasgo autosómico recesivo. Existen cuatro formas principales de la enfermedad: perinatal, infantil, de la niñez y adulta. La hipofosfatasa perinatal se manifiesta durante la gestación y la mayoría de los recién nacidos afectados sobreviven por poco tiempo. La hipofosfatasa infantil se manifiesta clínicamente antes de los 6 meses de edad. Aproximadamente el 50 % de los pacientes muere en un año. La hipofosfatasa de la niñez varía enormemente en cuanto a la gravedad, pero la mayoría de estos pacientes sufrirán síntomas esqueléticos a lo largo de su vida. La hipofosfatasa en adultos aparece durante la mediana edad, con síntomas tales como fracturas dolorosas por esfuerzos recurrentes que tienen una curación deficiente.

Los osteoblastos y los condrocitos son normalmente ricos en fosfatasa alcalina no específica del tejido donde se adhiere a la superficie celular. En la hipofosfatasa, la falta de actividad de la fosfatasa alcalina provoca la acumulación extracelular de tres compuestos de fósforo que se cree que son sustratos de la enzima: fosfoetanolamina (PEA), pirofosfato inorgánico (PPi) y piridoxal 5'-fosfato (PLP). El PPi es un inhibidor del crecimiento de cristales de hidroxiapatita, y la acumulación de PPi en la enfermedad explica el deterioro de la mineralización esquelética. En consecuencia, el suministro de enzimas activas a los pacientes que sufren de hipofosfatasa disminuye los niveles de PPi extracelular y mejora la mineralización esquelética.

Actualmente, no existe una terapia médica establecida para la hipofosfatasa. Los ensayos de reemplazo de enzimas mediante infusiones intravenosas de fosfatasa alcalina han fracasado. Parece que la actividad de la fosfatasa alcalina se debe aumentar no en la circulación sino en el esqueleto mismo. Esta hipótesis se confirmó recientemente por el trasplante de médula ósea. Lamentablemente, los beneficios del trasplante solo duraron un período corto debido a un injerto deficiente.

Por lo tanto, es necesario proporcionar un enfoque de terapia de reemplazo enzimático para proporcionar enzimas activas al esqueleto de los pacientes que sufren hipofosfatasa.

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

El XLH es la más prevalente de las hipofosfatemias familiares (OMIM 307800, 307810). Se caracteriza por una reducción de la reabsorción de fosfato en el riñón, hipofosfatemia, normocalcemia, niveles plasmáticos de 1,25-dihidroxitamina D3 (1,25(OH)₂D, calcitriol) de normales a bajos, función normal de la glándula paratiroides y actividad elevada de la fosfatasa alcalina plasmática. Estos cambios están asociados con el retraso del crecimiento, la deformidad de las extremidades inferiores, la evidencia radiológica e histomorfométrica del raquitismo y la osteomalacia. Esta enfermedad parece ser el resultado de la combinación de defectos renales en la reabsorción de fosfato tubular y el metabolismo de la vitamina D, así como un trastorno funcional en los huesos y los dientes. El XLH es el resultado de la inactivación de mutaciones en el gen PHEX, un miembro de la familia de la metalopeptidasa de zinc de las glicoproteínas de membrana integral tipo II. Estas mutaciones impiden la expresión de una enzima PHEX funcional en la superficie celular de los osteoblastos. Hasta ahora, el tratamiento de los pacientes con XLH se limita a la suplementación con complementos de fosfato inorgánico (Pi) orales en cuatro o cinco dosis divididas por día, y la coadministración de 1,25(OH)₂D para compensar la síntesis inadecuada de 1,25(OH)₂D. Estas altas dosis de fosfato con frecuencia provocan intolerancias gastrointestinales, particularmente diarrea, lo que lleva al incumplimiento del paciente. Por un lado, la carga de fosfato conlleva el riesgo de provocar un hiperparatiroidismo secundario (que puede ser lo suficientemente grave como para requerir una paratiroidectomía) mientras que, por otro, la administración de un exceso de 1,25(OH)₂D puede provocar hipercalcemia y nefrocalcinosis.

Por lo tanto, la ERT útil para el XLH trataría de reemplazar la enzima PHEX defectuosa en pacientes con XLH por una enzima funcional obtenida a través de tecnología de ADN recombinante. Como la enzima PHEX normal está anclada en la membrana plasmática de los osteoblastos por un péptido hidrofóbico, la forma natural de PHEX no puede ser producida y purificada en cantidades suficientes para su uso en un preparado farmacéutico. Para evitar el problema, se diseñó y se produjo una forma soluble de PHEX recombinante (o sPHEX) en cultivos celulares, se purificó y se formuló para administración intravenosa (IV) (WO 00/50580). sPHEX se inyectó posteriormente en ratones *Hyp*, un modelo de ratón para el XLH, tal como se describe en la solicitud estadounidense pendiente de aprobación n.º 10/362.259. Se observó una mejora de diversos parámetros séricos relacionados con el hueso, incluida una reducción de los niveles anormalmente altos de fosfatasa alcalina sérica. Aunque estos experimentos fueron exitosos, se creyó que la eficacia del sPHEX terapéutico podría aumentar si la proteína recombinante se modificaba para promover su unión a los minerales óseos.

Por lo tanto, se necesitan medios para dirigir con éxito las proteínas a la matriz ósea.

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

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

WO 98/35703 A2 describe procedimientos y composiciones para la administración de agentes terapéuticos, que incluyen proteínas, al tejido óseo empleando conjugados de oligómeros peptídicos cargados negativamente.

Oda K y col. (1999; Journal of Biochemistry 126(2): 694-699) describe la purificación de una forma soluble de fosfatasa alcalina no específica de tejidos humanos (TNSALP).

La presente invención busca abordar estas y otras necesidades.

RESUMEN DE LA INVENCION:

- 5 La presente invención muestra que las moléculas grandes y complejas, como las proteínas, pueden fusionarse con péptidos ácidos para dirigirse con éxito al hueso *in vivo*.

La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 10 a. un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos como se presenta en la SEQ ID NO: 7;
- b. un polinucleótido codificante de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se presenta en la SEQ ID NO: 8;
- 15 c. una secuencia de nucleótidos completamente complementaria con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en a) o b); y
- d. una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar en condiciones de rigurosidad elevada con la secuencia de nucleótidos en c), donde las condiciones de rigurosidad alta comprenden: prehibridación e hibridación en 6 x SSC, 5 x reactivo de Denhardt, SDS al 0,5 % y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 68 °C; y lavados en 2 x SSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente durante 10 min; en 2 x SSC y SDS al 0,1 % a temperatura ambiente durante 10 min; y en 0,1 x SSC y SDS al 0,5 % a 65 °C tres veces durante 5 min; donde dicha molécula de ácido nucleico codifica una fosfatasa alcalina soluble activa que comprende en el extremo C una
- 20 secuencia de poliaspartato Dn, donde n=10 a 16.

Se describe un conjugado para administración ósea que tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en: A) X-Dn-Y-proteína-Z; y B) Z-proteína-Y-Dn-X, donde X está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido; Y está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido; Z está

30 ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido; y Dn es un poli aspartato donde n = 10 a 16. También se describe que la proteína en el conjugado para administración ósea es un gen regulador de fosfato soluble con homología para las endopeptidasas en el cromosoma X (SPHEX). También se describe que la estructura del conjugado es: X-Dn-Y-SPHEX-Z. Se describe que SPHEX tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 46 a 749 de la figura 10; 47 a 749 de la figura 10; 48 a 749 de la figura 10; 49 a 749 de la figura 10; 50 a 749 de la figura 10; 51 a 749 de la figura 10; 52 a 749 de la figura 10; 53 a 749 de la figura 10; y 54 a 749 de la figura 10.

Se describe que, en estos conjugados para administración ósea, n es 10. Además, se describe que, en este conjugado para administración ósea, n es 11. Además,

40 se describe que, en este conjugado para administración ósea, n es 12. Además, se describe que, en este conjugado para administración ósea, n es 13. Además, se describe que, en este conjugado para administración ósea, n es 14. Además, se describe que, en este conjugado para administración ósea, n es 15. Además, se describe que, en este conjugado para administración ósea, n es 16.

45 Además, se describe que el SPHEX consiste en la secuencia de aminoácidos 46 a 749 de la figura 10 y n=10.

Se describe que la proteína en el conjugado es una fosfatasa alcalina soluble (sALP).

Se describe que la estructura del conjugado es: Z-sALP-X-Dn-Y.

50 Se describe que sALP está codificado por la secuencia como se presenta en la figura 16A. Además, se describe que sALP tiene la secuencia como se presenta en la figura 16B. Se describe que, en estos conjugados para administración ósea, n es 10. Se describe que, en este conjugado para administración ósea, n es 11. Se describe que, en este conjugado para administración ósea, n es 12. Se describe que, en este conjugado para administración ósea, n es 13. Se describe que, en este conjugado para administración ósea, n es 14. Se describe que, en este conjugado para administración ósea, n es 15. Se describe que, en este conjugado para administración ósea, n es 16. Además, se describe que n=10.

Se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: un polinucleótido codificante de un polipéptido que comprende una secuencia de

60

aminoácidos como se presenta en la figura 8; un polinucleótido codificante de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se presenta en la figura 11; un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos como se presenta en la figura 7; una secuencia de nucleótidos completamente complementaria con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a), (b) o (c); y una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar en condiciones de rigurosidad elevada con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a), (b), (c) o (d), donde las condiciones de rigurosidad alta comprenden: prehibridación e hibridación en 6XSSC, 5Xreactivo de Denhardt, SDS al 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 68 °C; y lavados en 2XSSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente durante 10 min; en 2XSSC y SDS al 0,1 % a temperatura ambiente durante 10 min; y en 0,1XSSC y SDS al 0,5 % a 65 °C tres veces durante 5 minutos.

10

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

La invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos como se presenta en la figura 17A; un polinucleótido codificante de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se presenta en la figura 17B; una secuencia de nucleótidos completamente complementaria con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a) o (b); y una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar en condiciones de rigurosidad elevada con la secuencia de nucleótidos en (c), donde las condiciones de rigurosidad alta comprenden: prehibridación e hibridación en 6XSSC, 5Xreactivo de Denhardt, SDS al 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 68 °C; y lavados en 2XSSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente durante 10 min; en 2XSSC y SDS al 0,1 % a temperatura ambiente durante 10 min; y en 0,1XSSC y SDS al 0,5 % a 65 °C tres veces durante 5 minutos; donde dicha molécula de ácido nucleico codifica una fosfatasa alcalina soluble fisiológicamente activa que comprende en el extremo C una secuencia de poliaspartato D_n, donde n = 10 a 16.

También se describe una molécula de ácido nucleico aislada codificante de PHEX soluble funcional que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 54 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 53 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 52 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 51 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 50 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 49 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 48 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 47 a 749 como se presenta en la figura 10; un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 46 a 749 como se presenta en la figura 10; una secuencia de nucleótidos completamente complementaria con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a) a (i); y una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar en condiciones de rigurosidad elevada con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a) a (j), donde las condiciones de rigurosidad alta comprenden: prehibridación e hibridación en 6XSSC, 5Xreactivo de Denhardt, SDS al 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 68 °C; y lavados en 2XSSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente durante 10 min; en 2XSSC y SDS al 0,1 % a temperatura ambiente durante 10 min; y en 0,1XSSC y SDS al 0,5 % a 65 °C tres veces durante 5 minutos. Además, se describe que la molécula de ácido nucleico aislada además comprende en su extremo 5', un polinucleótido codificante de un poli-aspartato seleccionado del grupo que consiste en D₁₀ a D₁₆.

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

Se describe una composición para administración ósea que comprende un conjugado para administración ósea y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describe un procedimiento para administrar una proteína a tejido óseo de un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad efectiva de un conjugado para administración ósea tal como se describió.

60

También se describe un procedimiento para administrar sPHEX a tejido óseo de un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad efectiva de un conjugado para administración ósea.

5 También se describe un procedimiento para administrar ALP a tejido óseo de un mamífero que lo necesita que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad efectiva de un conjugado para administración ósea.

10 También se describe un procedimiento para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de gen regulador de fosfato funcional con homología para las endopeptidasas en el cromosoma X (PHEX) que comprende administrar a un mamífero que lo necesita un conjugado, donde dicho conjugado se encuentra en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se describe que la afección o la enfermedad es raquitismo hipofosfatémico ligado a X (XLH).

15 Se describe un procedimiento para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de fosfatasa alcalina funcional que comprende administrar a un mamífero que lo necesita un conjugado, donde dicho conjugado se encuentra en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se describe que la afección o la enfermedad es hipofosfatasa.

Se describe un conjugado para administración ósea para administrar una proteína al tejido óseo de un mamífero.

20 Se describe un uso de un conjugado para administración ósea para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de gen regulador de fosfato funcional con homología para las endopeptidasas en el cromosoma X (PHEX), donde dicho conjugado se encuentra en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 También se describe un uso de un conjugado para administración ósea en la fabricación de un medicamento para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de gen regulador de fosfato funcional con homología para las endopeptidasas en el cromosoma X (PHEX). Se describe que la afección o la enfermedad es raquitismo hipofosfatémico ligado a X (XLH).

30 También se describe un uso de un conjugado para administración ósea para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de fosfatasa alcalina funcional, donde dicho conjugado se encuentra en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 También se describe un uso de un conjugado para administración ósea de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de fosfatasa alcalina funcional, donde dicho conjugado se encuentra en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se describe que la afección o la enfermedad es hipofosfatasa.

40 También se describe un procedimiento para evaluar péptidos para uso en un conjugado de proteína-péptido para administración ósea que comprende las etapas de: fusionar un péptido candidato con una proteína indicadora para formar un conjugado de proteína-péptido; poner en contacto el conjugado con tejido óseo o la fase mineral del hueso; y donde el péptido candidato se selecciona cuando la presencia de la proteína indicadora en el tejido óseo o la fase mineral del hueso es mayor cuando se conjuga con el péptido candidato que cuando no lo hace.

45 Se describe un conjugado para administración ósea de una proteína fusionada a un péptido seleccionado del grupo que consiste en deca-aspartato (D₁₀) a hexadeca-aspartato (D₁₆).

Se describe que

50 el sPHEX está fusionado en su extremo N a D₁₀. Se describe que el sPHEX está fusionado en su extremo N a D₁₁. Se describe que el sPHEX está fusionado en su extremo N a D₁₂. Se describe que el sPHEX está fusionado en su extremo N a D₁₃. Se describe que el sPHEX está fusionado en su extremo N a D₁₄. Se describe que el sPHEX está fusionado en su extremo N a D₁₅. Se describe que el sPHEX está fusionado en su extremo N a D₁₆.

Se describe que en los conjugados

60 el sALP está fusionado en el extremo C a D₁₀. Se describe que

- el sALP está fusionado en el extremo C a D₁₁. Se describe que
 el sALP está fusionado en el extremo C a D₁₂. Se describe que
 el sALP está fusionado en el extremo C a D₁₃. Se describe que
 el sALP está fusionado en el extremo C a D₁₄. Se describe que
 5 el sALP está fusionado en el extremo C a D₁₅. Se describe que
 el sALP está fusionado en el extremo C a D₁₆.

sPHEX

- 10 Tal como se usa en la presente, sPHEX significa cualquier fragmento biológicamente activo soluble de PHEX o muteína de este. Los expertos en la técnica pueden preparar construcciones de expresión diferentes de las que se describen expresamente en la presente para la producción óptima de **sPHEX** en líneas celulares adecuadas transfectadas con este. Además, los expertos pueden diseñar fragmentos de ADNc codificantes de fragmentos biológicamente activos adecuados y muteínas de PHEX de origen natural que poseen la misma actividad biológica o
 15 similar que la enzima de longitud completa de origen natural.

- Para crear una fuente recombinante para sPHEX, se puede construir y evaluar una amplia serie de vectores de expresión en cuanto a la expresión de un ADNc de PHEX. Basándose en los experimentos de transfección transitoria, así como en las transfecciones estables, se puede identificar una construcción de expresión que
 20 proporcione un nivel particularmente alto de expresión.

Se describe cualquier sPHEX que comprende al menos una porción de ectodominio de PHEX natural que comienza con la cisteína en la posición 54 de la secuencia presentada en la figura 10.

- 25 Los conjugados invención por lo tanto son cualquier sPHEX que comprende este fragmento de 54-749 del PHEX natural, o el fragmento natural 53-749, o el fragmento natural 52-749, o preferentemente el fragmento natural 51-749, o el fragmento natural 50-749 o el fragmento natural 49-749 o el fragmento natural 48-749, o el fragmento natural 47-749, o el fragmento natural 46-749, junto con un poli-aspartato seleccionado del grupo que consiste en D₁₀ a D₁₆ fusionado inmediatamente corriente arriba de este fragmento.
 30

- El conjugado además puede comprender opcionalmente uno o más aminoácidos adicionales 1) corriente arriba del poli-aspartato; y/o 2) entre el poli-aspartato y el fragmento natural o el equivalente funcional. Estos aminoácidos pueden ser cualquier aminoácido. Se pueden seleccionar de forma independiente del grupo que consiste en cualquier aminoácido excepto la cisteína, la prolina y el triptófano, a saber, los aminoácidos que se sabe que
 35 inducen la formación de enlaces disulfuro o cambios en la conformación.

Estos aminoácidos pueden estar presentes en el conjugado cuando, por ejemplo, la estrategia de clonación utilizada para producirlo los introduce en estas ubicaciones.

- 40 De acuerdo con las estrategias de clonación específicas, los aminoácidos ubicados corriente arriba del poli-aspartato en el PHEX escindible recombinante se pueden seleccionar de acuerdo con parámetros conocidos para proporcionar un sustrato adecuado para enzimas específicas de la vía de secreción (p. ej., furina o peptidasa señal) de la célula hospedadora que se utilizará para escindir los PHEXs escindibles recombinantes producidos en un sPHEX dirigido a huesos secretado. La probabilidad de que una secuencia diseñada sea escindida por la peptidasa
 45 señal de la célula hospedadora se puede predecir mediante un algoritmo informático apropiado como el descrito en Bendtsen y col. (J Mol Biol. 16 de julio de 2004;340(4):783-95) y que está disponible en la Web en <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> que considera parámetros incluidos los siguientes: los aminoácidos en la posición -3 y -1 del sitio de escisión por la peptidasa señal tienen de forma deseable cadenas laterales pequeñas y no cargadas. Preferentemente, en la posición -1: Ala, Ser, Gly, Cys, Thr y, a veces, Gln, Pro y Leu. De forma similar,
 50 aquellos en la posición -3, deben ser preferentemente: Ala, Ser, Gly, Cys, Thr, Ile, Leu, Val. Además, los aminoácidos en la posición -6 y -4 del sitio de escisión son de forma deseable aquellos capaces de inducir la formación de residuos de giro beta (tal como Pro).

- Se describen conjugados que comprenden aminoácidos adicionales que se pueden seleccionar basándose en la estrategia de clonación utilizada para producir un PHEX recombinante escindible. Por lo tanto, el PHEX recombinante escindible descrito en los ejemplos 3 y 4 abajo contiene dichos aminoácidos adicionales corriente arriba del poli-aspartato y entre el poli-aspartato y la secuencia de ectodominio natural. Además, se describe un conjugado que comprende la secPHEX descrita en la solicitud copendiente n.ºWO 02/15918 preparada mediante la fusión del fragmento de extremo N NL-1 que comprende un sitio de furina para el ectodominio natural de PHEX con
 60 el vector pCDNA3/RSV/NL-1-PHEX, y un secPHEX que comprende un fragmento de inmunoglobulina en el extremo

N. Más específicamente, la figura 12 presenta esquemáticamente la estructura de secPHEXs que comprenden aminoácidos adicionales corriente arriba del fragmento del ectodominio de 46-749 PHEX natural. Las construcciones n.º 1 a 3 y 5 se pueden fusionar a un poli-aspartato y utilizarse como conjugados.

- 5 La construcción n.º 4 constituye un conjugado: comprende un poli-aspartato D₁₀ y un fragmento de ectodominio natural.

Los conjugados también abarcan adicionalmente sPHEXs que comprenden eliminaciones en el extremo C que no afectan su actividad enzimática.

10

Además, se describen conjugados donde el poli-aspartato estaría unido en el extremo C del fragmento de ectodominio de PHEX natural.

sALP

15

ALP es una proteína unida a membrana anclada a través de un glicolípido a su extremo C. Este anclaje de glicolípido (GPI) se agrega postraduccionalmente después de la eliminación de un extremo C hidrofóbico que actúa como anclaje de membrana transicional y como una señal para el agregado de GPI. Por lo tanto, el sALP utilizado en el ejemplo 6 en la presente está constituido por un ALP donde el primer aminoácido de la secuencia de extremo C hidrofóbica, a saber, alanina, es reemplazado por un codón de parada. El ALP soluble formado de este modo contiene todos los aminoácidos de la forma natural y, por lo tanto, anclada activa de ALP.

20

Los conjugados de sALP descritos son cualquier sALP junto con un poli-aspartato seleccionado del grupo que consiste en D₁₀ a D₁₆ fusionado inmediatamente corriente abajo de este fragmento.

25

El conjugado además puede comprender opcionalmente uno o más aminoácidos adicionales 1) corriente arriba del poli-aspartato; y/o 2) entre el poli-aspartato y el fragmento de sALP natural o el equivalente funcional. Este es el caso, por ejemplo, cuando la estrategia de clonación utilizada para producir el conjugado de direccionamiento óseo introduce aminoácidos exógenos en estas ubicaciones. Sin embargo, los aminoácidos exógenos se deben seleccionar de modo que no proporcionen un sitio de transaminación adicional. La probabilidad de que una secuencia diseñada sea escindida por la transaminasa de la célula hospedadora se puede predecir según lo descrito por Ikezawa (Biol Pharm. Bull. 2002, 25(4) 409-417).

30

Los conjugados descritos también abarcan adicionalmente sALPs que comprenden eliminaciones en el extremo N que no afectan su actividad enzimática.

35

Además, se describen conjugados donde el poli-aspartato estaría unido en el extremo N del fragmento anclado a ALP natural o su fragmento biológicamente activo.

40

El término "proteína recombinante" se utiliza en la presente para hacer referencia a una proteína codificada por un ácido nucleico manipulado genéticamente insertado en una célula hospedadora procariota o eucariota. El ácido nucleico se ubica generalmente dentro de un vector, tal como un plásmido o un virus, según sea adecuado para la célula hospedadora. Aunque *E. coli* se ha utilizado como un hospedador para expresar los conjugados descritos en los ejemplos presentados en la presente, un experto en la técnica comprenderá que se puede usar una serie de otros hospedadores para producir proteínas recombinantes de acuerdo con los procedimientos que son rutina en la técnica. Se describen procedimientos representativos en Maniatis y col. Cold Springs Harbor Laboratory (1989). "Proteína escindible recombinante", según se usa en la presente, se refiere a una proteína recombinante que se puede escindir por una enzima del hospedador para producir una proteína secretada/soluble. I

45

50

El término "fragmento de ectodominio" significa en la presente, cuando se utiliza con relación a PHEX, el fragmento de PHEX que se ubica fuera de la membrana celular cuando se encuentra en su forma natural.

La expresión "tejido óseo" se utiliza en la presente para referirse a un tejido sintetizado por osteoblastos compuesto por una matriz orgánica que contiene mayoritariamente colágeno y mineralizada por el depósito de cristales de hidroxiapatita.

55

Las proteínas de fusión comprendidas por los conjugados para administración ósea son útiles para el tratamiento terapéutico de las afecciones de defectos óseos porque proporcionan una cantidad efectiva de la proteína de fusión al hueso. La proteína de fusión se proporciona en forma de una composición farmacéutica en cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable estándar, y se administra mediante cualquier procedimiento estándar, por ejemplo,

60

mediante inyección intravenosa.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se utiliza en la presente para hacer referencia, cuando se elige la administración parenteral como vía de administración, a disolventes, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables. Algunos ejemplos de disolventes no acuosos son el propilenglicol, el polietilenglicol, el aceite vegetal, el aceite de pescado y los ésteres orgánicos inyectables. Los disolventes acuosos incluyen agua; soluciones de agua-alcohol; solución salina fisiológica; vehículos parenterales médicos amortiguados que incluyen solución de cloruro de sodio, solución de dextrosa de Ringer, solución de dextrosa más cloruro de sodio, regeneradores de fluidos y nutrientes; regeneradores de electrolitos; solución de Ringer que contiene lactosa o aceites fijos.

El término "cantidad efectiva" se utiliza en la presente para hacer referencia a la cantidad mínima de una composición farmacéutica que se debe administrar a un mamífero para lograr un efecto terapéutico significativo. Las dosificaciones dependerán de muchos factores, incluido el modo de administración. Típicamente, la cantidad de proteína presente dentro de una dosis única será una cantidad que impida, retrase o trate de forma efectiva una afección no deseada relacionada con los huesos sin inducir toxicidad significativa. En particular, una cantidad efectiva del conjugado y las composiciones comprenderá una cantidad de proteína de fusión que provocará un alivio significativo de los síntomas clínicos de la afección.

La cantidad efectiva se puede proporcionar por día, por semana, por mes o fracciones de estos. Típicamente, se puede administrar una composición farmacéutica en una cantidad de entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por día (p. ej., 10 mg, 50 mg, 100 mg o 250 mg). Las dosificaciones se pueden proporcionar en un régimen de dosificación única o múltiple. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cantidad efectiva es una dosis en el intervalo de entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 25 gramos del conjugado que se va a dirigir al hueso por día, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 10 gramos del conjugado que se va a dirigir al hueso por día, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 5 gramos del conjugado que se va a dirigir al hueso por día, aproximadamente 1 gramo del conjugado que se va a dirigir al hueso por día, entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 25 gramos del conjugado que se va a dirigir al hueso por semana, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 10 gramos del conjugado que se va a dirigir al hueso por semana, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 5 gramos del conjugado que se va a dirigir al hueso cada dos días y aproximadamente 1 gramo del conjugado que se va a dirigir al hueso una vez por semana.

Esto es solo una guía, ya que la dosis real debe ser seleccionada cuidadosamente y titulada por el médico tratante basándose en los factores clínicos exclusivos para cada paciente. La dosis diaria óptima será determinada por los procedimientos conocidos en la técnica y se verá afectada por factores tales como la edad del paciente y otros factores clínicamente pertinentes. Además, los pacientes pueden estar tomando medicamentos para otras enfermedades o afecciones. Los otros medicamentos se pueden continuar durante el tiempo que la proteína para administración al hueso se proporcione al paciente, pero es aconsejable, en particular, en dichos casos, comenzar con dosis bajas para determinar si se experimentan efectos secundarios adversos.

La expresión "condiciones de rigurosidad elevada" se refiere a condiciones que permiten secuencias con una homología alta para la unión. Sin limitarse en ese sentido, se enumeran ejemplos de dichas afecciones en el manual "Molecular cloning, a laboratory manual, segunda edición de 1989 de Sambrook *col.*: 6XSSC o 6XSSPE, con o sin reactivo de Denhardt, SDS al 0,5 % y la temperatura utilizada para obtener condiciones de rigurosidad elevada suele ser de aproximadamente 68 °C (véanse las páginas 9.47 a 9.55 de Sambrook) para el ácido nucleico de 300 a 1500 nucleótidos. Aunque la temperatura óptima que se va a utilizar para una sonda de ácido nucleico específica se puede calcular empíricamente, y aunque existe la posibilidad de alternativas en las condiciones del amortiguador seleccionadas, dentro de estos intervalos de condiciones muy conocidos, el ácido nucleico captado no variará significativamente. De hecho, Sambrook indica claramente que la "elección depende en gran medida de la preferencia personal" (véase la página 9.47). Sambrook especifica que la fórmula para calcular la temperatura óptima que varía de acuerdo con la fracción de guanina y citosina en la sonda de ácido nucleico y la longitud de la sonda ($10 \text{ a } 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ inferior que T_m donde $T_m = 81,5 \text{ }^{\circ}\text{C} + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41(\text{fracción G+C}) - 0,63 (\% \text{ de formamida} - (600/l))$) (véanse las páginas 9,50 y 9,51 de Sambrook).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

En los dibujos adjuntos:

La figura 1 presenta el estado de pureza de las proteínas GST y GST-D₁₀ en un gel de poliacrilamida SDS después

de la cromatografía de CL-4B:

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

La figura 3 proporciona una representación esquemática del plásmido pCDNA3-RSV- D₁₀sPHEX-vector NEO;

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

La figura 5 presenta un análisis de SDS-PAGE teñido Sypro-ruby™ de las diferentes fracciones recolectadas a través del procedimiento de purificación de D₁₀SPHEX;

La figura 6 muestra la variación en los niveles de fosfatasa alcalina sérica (ALP) observados en ratones Hyp inyectados diariamente con dosis i.v. de sPHEX y D₁₀-sPHEX durante 14 días. Los valores U/l representan la disminución observada entre el día -3 (correspondiente en la gráfica a 0 U/l) y el día 15 del régimen de inyección y son el promedio de las medidas realizadas en 6 animales;

La figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ADN recombinante codificante de una proteína escindible para producir D₁₀-sPHEX (SEO ID NO: 1):

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

La figura 9 compara la unión a la fase mineral del hueso de las proteínas (A. GST B. sPHEX) con el de sus contrapartes fusionadas a deca-aspartato;

La figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos de un PHEX natural (o unido a membrana) (SEO ID NO: 3):

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

La figura 12 ilustra esquemáticamente la estructura y las actividades de diversas construcciones de secPHEX:

La figura 12 ilustra gráficamente a través de medición fluorimétrica la actividad de la fosfatasa alcalina en el extracto celular soluble y el medio usado de HEK293 transfectadas transitoriamente con los vectores de expresión codificantes de sALP-D₁₀ y sALP;

25 La figura 14 ilustra gráficamente la detección de sALP y sALP-D₁₀ por análisis de transferencia Western con el anticuerpo B4-78 específico en los medios usados y el extracto celular de HEK-293 después de la transfección transitoria. (Panel A: tinción roja de Ponceau; Panel B: análisis de transferencia α -B4-78). A la izquierda se muestran los tamaños de los marcadores de peso molecular;

La figura 15 muestra gráficamente la unión a la fase mineral ósea de un deca-aspartato fusionado a la fosfatasa alcalina secretada:

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

La figura 17 muestra A. la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 7): codificante de un conjugado de la presente invención, a saber, sALP-D₁₀; y B. la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de ese conjugado; y

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

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

Se muestra que los péptidos poli-aspartícos específicos fusionados en marco a una proteína, como se ejemplifica en la presente por la proteína glutatión-S-transferasa (GST), utilizada como una proteína indicadora, por sPHEX y por sALP, pueden aumentar significativamente la capacidad de unión ósea de estas proteínas.

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

45 TABLA 1: SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS UTILIZADOS EN LOS EJEMPLOS 1 A 7

D ₆	SEQ ID NO:9.	5'-GATCCGATGACGATGACGATGACGC-3'
	SEQ ID NO:10	5'-GGCCGCGTCATCGTCATCGTCATCG-3'
D ₁₀	SEQ ID NO:11	5'-GATCCGATGACGATGACGATGACGATGACGATGACGC-3'
	SEQ ID NO:12	5'-GGCCGCGTCATCGTCATOGTCATCGTCATCGTCATCG-3'
D ₁₆	SEQ ID NO:13	5'- GATCCGATGACGATGACGATGACGATGACGATGACGATGAC GATGACGATGACGC-3'
	SEQ ID NO:14	5'- GGCCGCGTCATCGTCATCGTCATCGTCATCGTCATCQTCAT CQTCATCGTCATCG-3'
hMEPE	SEQ ID NO:15	5'- GATCCGATGACAGTAGTGAGTCATCTGACAGTGGCAGTTCA AGTGAGAGCGATGGTGACGC-3'
	SEO ID NO:16	5'-

		GGCCGCGTCACCATCGCTCTCACTTGAAGTCCACTGTCAG ATGACTCACTACTGTCATCG-3'
hStatherin	SEQ ID NO:17	5'- GATCCGATTCACTGAAGAGAAAATTTTTCGCTAGAATTGGAA GATTCGGTGC-3'
	SEQ ID NO:18	5'- GGCCGCACCGAATCTTCCAATTCTACGCAAAAATTTCTCTTC AGATGAATCG-3'
hMGP	SEQ ID NO:19	5'- GATCCTGTTATGAATCACATGAAAGCATGGAATCTTATGAAC TTAATCCCTTCATTGC-3'
	SEQ ID NO:20	5'- GGCCGCAATGAAGGGATTAAGTTTCATAAGATTCCATGCTTT CATGTGATTCATAACAG-3,
hOsteopontin	SEQ ID NO:21	5'- GATCCCAGAATGCTGTGTCCTCTGAAGAAACCAATGACTTTA AAGC-3'
	SEQ ID NO:22	5'- GGCCGCTTTAAAGTCATTGGTTTCTTCAGAGGACACAGCAT TCTGG-3'
hBSP2	SEQ ID NO:23	5'- GATCCGGCAGTAGTGACTCATCCGAAGAAAATGGAGATGACAGTTTCTCAGAGGAGGAGGAGAAK 3'
	SEQ ID NO:24	5'-GGCCGCTTCTCTCTCTCTTCTGAACTGTCATCTCCATTTCCTCGGATGAGTCACTACTGCTC 3'
hIGFBP5	SEQ ID NO:25	5'- GATCCCGCAAAGGATTCTACAAGAGAAAGCAGTGCAAACCT TCCCGTGGGCGCAAGCGTGC-3'
	SEQ ID NO:26	5'- GGCCGCACGCTTGCGGCCACGGGAAGGTTTGCACTGCTTT CTCTTGATAGAATCCTTTGCGG-3'
M81736 CBS	SEQ ID NO:21	5'-AGTCGGGATCCGGAACAAGCAGCGTGTCTAC-3'
	SEQ ID NO:28	5'-AGATCGCGGCCGCTCAATTGTGCACGGTGTGATTAAAGG- 3'
D ₁₀	SEQ ID NO:29	5'-CCGGAGATGACGATGACGATGACGATGACGATGACT-3'
	SEQ ID NO:30	3'-TCTACTGCTACTGCTACTGCTACTGCTACTGAGGCC-5'

EJEMPLO 1**Unión ósea de GST-D₆, GST-D₁₀ y GST-D₁₆**

5

Se utilizó tecnología de ADN recombinante para generar un plásmido que contiene un ácido nucleico codificante de GST seguido en marco por un ácido nucleico codificante de un péptido ácido D₆, D₁₀ o D₁₆. Para obtener los conjugados de GST-D₆, GST-D₁₀ y GST-D₁₆, el oligonucleótido de SEQ ID NO:9 (véase la tabla 1) se mezcló en primer lugar con el oligonucleótido de SEQ ID NO:10, el oligonucleótido de SEQ ID NO:11 mezclado con el oligonucleótido de SEQ ID NO:12, y el oligonucleótido de SEQ ID NO:13 mezclado con el oligonucleótido de SEQ ID NO:14. Este procedimiento generó oligonucleótidos dúplex codificantes para D₆, D₁₀ y D₁₆, respectivamente, y que tienen extremidades compatibles con la clonación en el plásmido pGEX3T-4 (Pharmacia biotechnology) predigerido con las endonucleasas de restricción BamHI y NotI. Se transformaron los vectores pGEX3T-4 en proteasa AP401 menos la cepa de bacterias *E. coli* (*lon::mini tetRara-Δlac-pro nalA argEam rifRthil* [*F'pro AB lacIq Z M15*]).

15

Se utilizaron colonias bacterianas positivas para sembrar un precultivo de 10 ml de medios YT dobles y 100 mg/litro de ampicilina. Se cultivaron las bacterias durante la noche a 37 °C en un agitador orbital a 250 rpm. Se agregó el precultivo a 500 ml de medio de ampicilina YT doble nuevo en un matraz de 2 litros Erlenmeyer. Se dejó crecer a las bacterias a 37 °C bajo agitación orbital hasta alcanzar una densidad óptica a 595 nm de 0,7. Después, se indujo la expresión de proteínas mediante el agregado de 500 μl de solución de IPTG 0,1 M y se volvieron a colocar en incubación las bacterias durante 2 horas. Se centrifugaron las bacterias a 8000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se suspendió el sedimento en 25 ml de PBS helado que contenía inhibidor de proteasa en cápsulas de EDTA completo (Boehringer Mannheim) y se congeló a -20 °C.

20

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

Se dializaron GST y GST fusionado a péptidos contra PBS y se fijó la concentración a 2 mg/ml. Se inició la reacción de yodación agregando 2 perlas de yodo enjuagadas con PBS a 2 mCi de Na¹²⁵I (100µCi/µl, ICN) disuelto en 500 µl de PBS. Se incubaron las perlas a temperatura ambiente durante cinco minutos antes de agregar 1 mg de proteína dializada. La reacción de yodación avanzó durante 15 minutos antes de que se eliminara la perla y se enjuagara en 500 ml de PBS. A los 1,5 ml finales de solución de proteína yodada, se agregaron 15 µl de NaI 6 mM para diluir la radiactividad no específica. Después, se desaló la mezcla utilizando columnas de filtración en gel de PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech) equilibradas con PBS. Se eluyeron las proteínas en el volumen vacío. Se concentraron y se dializaron contra el amortiguador *in vivo* (PO₄ de sodio 1 mM a pH 7,4 y NaCl 150 mM) utilizando cartuchos Centriprep-YM10™ (Amicon). Se midió la radiactividad utilizando un contador de radiación gamma, se evaluó la concentración de proteínas mediante el ensayo Bradford y se reveló la unión química de ¹²⁵I a las proteínas mediante autorradiografía de SDS-PAGE seco. Se mantuvieron las muestras yodadas a 4 °C.

25 Capacidad de unión ósea de las proteínas de fusión de los péptidos GST-poli-aspárticos comparada con la de GST sola

Se inyectaron las proteínas de fusión a GST yodadas en ratones con anestesia de isoflurano como un bolo intravenoso a través de la vena subclavia. Se inyectó una dosis de 1 mg de proteína yodada/por kg de peso corporal. Se estableció el volumen de dosis máximo en 10 ml/kg. La duración del tratamiento fue de sesenta minutos. Diez y sesenta minutos después de la inyección, se tomaron muestras de sangre (0,1 a 0,2 ml) a través de la vena subclavia con anestesia en tubos activadores de la coagulación de suero/gel Microvette™ (Sarstedt, #20.1291). En la necropsia, se tomaron muestras de sangre y se sacrificaron los animales mediante desangrado del corazón con anestesia de isoflurano. Se recogieron los órganos (riñones, hígado, fémures, tibias y tiroides), se enjuagaron en solución salina al 0,9 % USP, se secaron en gasa y se transfirieron a tubos contadores de gamma. Se pesaron las muestras de suero y los órganos y se midió la radiactividad. Se expresaron los resultados como porcentaje de la dosis inyectada. Ni D₁₀-GST, ni D₁₆-GST promovieron la unión a otros órganos diferentes del hueso. Esto mostró la especificidad de estos conjugados con respecto al hueso (no se muestran los datos).

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

El hecho de que D₆, un péptido que se ha demostrado que administra con éxito moléculas pequeñas al hueso, no pueda administrar con éxito una proteína, a saber, GST, al hueso demuestra que no se puede predecir si un péptido ácido específico que se sabe que administra con eficacia una molécula pequeña al hueso también resultará efectivo para administrar una proteína al hueso.

EJEMPLO 2

50 Capacidad de unión de GST fusionada con diversos péptidos

La fosfoglicoproteína extracelular de matriz humana (hMEPE) es una proteína sintetizada por osteoblastos que muestra similitudes importantes con un grupo de fósforo-glicoproteínas de la matriz mineral de huesos y dientes, proteínas que se sabe que se unen naturalmente a la matriz ósea (8). Cabe señalar que hMEPE presenta en su extremo carboxi una secuencia de 18 residuos de aminoácidos (DDSSSSDSGSSSESDDG) (SEQ ID NO: 31) similar a los péptidos ácidos que se encuentran en la fosforina de dentina y la sialofosfoproteína de dentina, que se sabe que se unen a la matriz ósea (8).

La estaterina humana (hStatherin) es una proteína sintetizada por las glándulas salivales, que de modo similar a la histatina modula directamente la nucleación y/o el crecimiento de la hidroxiapatita. Cabe señalar que la hStatherin

presenta una secuencia de 15 residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 34 (DSSEKFLRRIGRFG) (SEQ ID NO: 32) que se ha demostrado que se unen estrechamente a la hidroxiapatita (9).

La proteína Gla de la matriz humana (hMGP) es una proteína sintetizada por células musculares lisas vasculares y condrocitos que funciona como inhibidor de la polimerización de hidroxiapatita al unirse a núcleos cristalinos. Cabe señalar que hMGP presenta en su extremo amino una secuencia de 17 residuos de aminoácidos en las posiciones 19 a 35 del marco de lectura abierto (CYESHESMESYELNPFI) (SEQ ID NO: 33) similar a los péptidos de ácido carboxiglutámicos gamma fosforilados que se encuentran en la osteocalcina que se sabe que se unen a la matriz ósea, y se cree que promueve la unión a la matriz ósea (10).

La osteopontina humana (hOPN) es una proteína sintetizada por osteoblastos que regula el crecimiento de cristales de hidroxiapatita. Esta proteína pertenece a la familia de sialofosfoproteína ósea. Cabe señalar que hOPN presenta una secuencia de 13 residuos de aminoácidos (QNAVSSEETNDFK) (SEQ ID NO: 34) en las posiciones 58 a 70 del marco de lectura abierto. Esta secuencia muestra un nivel alto de homología entre las especies de mamíferos. La predicción de la estructura secundaria hace que esta secuencia sea adecuada para la exposición a disolventes y se demostró que esta secuencia está fosforilada en sus residuos de serina. Se cree que esta última característica afecta la unión a la matriz ósea (11).

La sialoproteína ósea humana II (hBSP2) es una proteína sintetizada por osteoblastos que muestra similitudes importantes con un grupo de fósforo-glicoproteínas de la matriz mineral de huesos y dientes, proteínas que se sabe que se unen naturalmente a la matriz ósea. Cabe señalar que hBSP2 presenta en su extremo amino una secuencia de 18 residuos de aminoácidos en las posiciones 62 a 79 del marco de lectura abierto (GSSDSSEENGDDSEEEEE) (SEQ ID NO: 35) similar a los péptidos ácidos que se encuentran en la fosforina de dentina y MEPE, y se cree que promueve la unión a la matriz ósea (8).

La proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina humano-5 (hIGFBP5) es sintetizada por osteoblastos. Esta proteína, de forma similar a las proteínas de la familia IGFBP, se cree que regula la función de los osteoblastos en el proceso de remodelación ósea. Cabe señalar que la hIGFBP5 presenta una secuencia de 18 residuos de aminoácidos en las posiciones 221 a 238 del marco de lectura abierto (RKGIFYKRKQCKPSRGRKR) (SEQ ID NO: 36) que se ha demostrado que se unen estrechamente a la hidroxiapatita (12).

La adhesina de colágeno de *staphylococcus aureus* (M81736) es una proteína expresada en la superficie de *S.aureus* que promueve la unión de las bacterias a la matriz de colágeno del hueso de mamíferos y tejidos cartilaginosos. Se informó que dicha unión era fundamental para el desarrollo de patógenosis como la osteomielitis y la artritis infecciosa. Cabe señalar que se informó que el dominio de unión a colágeno (CBS) de esta adhesina abarca 151 residuos de aminoácidos (G168 a N318) del marco de lectura abierto de la proteína (13, 14). La secuencia primaria de aminoácidos es la siguiente:

GTSSVFYYKTGDMLPEDTTHVRWFLNINNEKSYVSKDITI
KDQIQGGQQLDLSTLNINVTGTHSNYYSGQSAITDFEKAFFPGSKITVDNTKNTI
DVTIPQGYGSYNSFSINYKTKITNEQQKEFVNNSQAWYQEHGKEEVNGKSFN
HTVHN. (SEQ ID NO: 37)

se construyeron plásmidos que contenían las secuencias de péptidos ácidos derivados de hMEPE, hStatherin, hMGP, hOPN, hBSP2, hIGFBP5 y CBS después de GST en marco para determinar si podían promover el direccionamiento óseo de una proteína recombinante. Se utilizó tecnología de ADN recombinante tal como se describe en el ejemplo 1 para generar plásmidos para péptidos derivados de hMEPE, hStatherin, hMGP, hOPN, hBSP2 y hIGFBP5. Los pares de oligonucleótidos identificados en la tabla 1 para cada uno de estos péptidos se mezclaron para obtener la proteína de fusión de GST-péptido ácido correspondiente. Este procedimiento generó oligonucleótidos dúplex codificantes para estos péptidos ácidos y que tienen extremidades compatibles con la clonación en el plásmido pGEX3T-4 (Pharmacia biotechnology) predigeridos con las endonucleasas de restricción BamHI y NotI.

Se construyó un plásmido que contenía CBS del siguiente modo. Se obtuvo un gen sintético correspondiente a la secuencia de la CBS a partir de Bio S&T (Montreal) y se insertó en el plásmido pLIV Select. Los oligonucleótidos de SEQ ID NO: 27 y 28 se utilizaron como cebadores en las reacciones de PCR con el plásmido pLIV Select que

contenía el gen CBS para ampliar las secuencias específicas de CBS. Se transformaron los vectores pGEX-4T-3 en proteasa AP401 menos la cepa de bacterias *E. coli* (*lon::mini tetRara- Δlac-pro naIA argEamrRthil* [*F'pro AB lacIq Z M15*]).

- 5 Se realizaron la producción y la purificación de proteínas y la farmacodistribución de la proteína de fusión yodada como se describe en el ejemplo 1.

Ninguno de estos péptidos ácidos de GST se unió a los huesos (no se muestra el resultado).

- 10 El hecho de que el péptido derivado de la estaterina, un péptido que se ha demostrado que administra con éxito una pequeña parte de osteopontina al hueso, no pueda administrar con éxito la proteína GST al hueso demuestra que no se puede predecir si un péptido ácido específico que se sabe que administra con eficacia un péptido pequeño al hueso también resultará efectivo para administrar una proteína al hueso.

15 **EJEMPLO 3**

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

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

25 **Vector de expresión de D₁₀sPHEX**

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

30

5'-

CAGTCAAGGTCTCTTATCCGGAAGTCTCCAAGCTAAACAGG-3' (SEQ ID NO: 38)

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

- 35 Se insertó la secuencia del hexámero BspEI (subrayada) en marco con y corriente arriba de la secuencia de ADN de sPHEX. Esta construcción codifica una proteína recombinante que se puede escindir entre la leucina y la serina en las posiciones 41 y 42, respectivamente en la figura 8. Por lo tanto, está constituida por dos aminoácidos exógenos, seguidos corriente abajo por un deca-aspartato, que a su vez está seguido por dos aminoácidos exógenos adicionales. Estos 4 aminoácidos exógenos derivan de la estrategia de clonación utilizada para producir el
- 40 conjugado. Se demostró que estos aminoácidos exógenos no anulan la actividad enzimática del conjugado (véase la figura 12 que muestra la actividad específica de esta construcción), pero se puede prescindir de ellos. Corriente abajo de estos aminoácidos exógenos hay un fragmento de ectodominio de PHEX natural que comienza, por lo tanto, con la serina en la posición 46 de la secuencia presentada en la figura 10. Se escindió el vector pCDNA3-RSV-NEO modificado con BspEI y después se digirió con fosfatasa alcalina para eliminar los grupos fosfato 5'. Un
- 45 dúplex de oligonucleótido codificante para deca-aspartato: [5'-CCGGAGATGACGATGACGATGACGATGACGATGACT-3' (SEQ ID NO: 29) y 3'-TCTACTGCTACTGCTACTGCTACTGCTACTGAGGCC-5' (SEQ ID NO: 30)] se fosforiló en primer lugar en sus extremos 5' con la polinucleótido cinasa T4 y se ligó al vector digerido BspEI. Esto proporcionó el vector pCDNA3-RSV-D₁₀sPHEX-NEO (figure 3). Este vector comprendía la secuencia presentada en la figura 7, que codifica el
- 50 PHEX escindible recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos presentada en la figura 8.

Expresión de D₁₀sPHEX recombinante

- Para inducir la expresión estable de la proteína D₁₀sPHEX, se transfectó el vector pCDNA3-RSV-D₁₀sPHEX-NEO en las células LLC-PK1 (células de riñón porcino; ATCC n.º CRL-1392) utilizando el kit de transfección de liposoma

- Lipofectamine-Plus™ (Invitrogen). Se seleccionaron las células transfectadas mediante el agregado de 400 µg/ml G-418 (Life Technologies) al medio. Se seleccionaron clones de células resistentes a G-418 para la expresión de D₁₀sPHEX utilizando el ensayo enzimático fluorescente PHEX [Campos M. y col. Biochem. J. (2003) 373, 271-9]. Se calculó el peso molecular aparente de la proteína recuperada en el medio usado mediante inmunotransferencia
- 5 utilizando un anticuerpo monoclonal elevado contra un fragmento de PHEX humano recombinante (K121-E294) como se describió anteriormente (Ruchon AF y col. J. Bone Miner. Res. (2000) 15, 1440-1450). Se utilizó un clon resistente a G-418 que expresa 1 a 2 mg de D₁₀sPHEX por litro para la producción de proteína. Se sembraron las células en Cellstack-10™ (Coming) a una densidad de 7×10^7 en 1,75 litros de medio (199 medio, FBS al 6 %, piruvato de Na 1 mM, penicilina 1×10^5 U/litro, estreptomycin 100 mg/litro y G-418 al 1 %. Se aumentó la expresión de
- 10 D₁₀sPHEX mediante incubación de las células en 1,75 litros de DMEM + butirato de sodio 10 mM durante cuatro días a 37 °C y CO₂ al 5 % antes de la recolección del medio usado.

Purificación y caracterización

- 15 Se centrifugó el sobrenadante celular a 500 x g durante 5 minutos a 4 °C y se filtró en fibra de vidrio (Fisher, APFC09050) y se concentró 10 a 40 veces utilizando un dispositivo de filtración de flujo tangencial Ultrasette™ 30 (Pall Canada). El pH de la solución se llevó a 5,6 con ácido acético 1 M antes de una diálisis durante la noche a 4 °C contra acetato de sodio 50 mM, NaCl 100 mM pH 5,6 (amortiguador SP). Se cargó el sobrenadante dializado a una velocidad de flujo de 4 ml/min, en una columna de intercambio catiónico de SulfoPropyl-Sepharose de 20 ml
- 20 (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada anteriormente con amortiguador SP. Se lavó la columna con el mismo amortiguador a la misma velocidad de flujo hasta que se alcanzó la referencia de absorbancia de 280 nm. Después, se eluyó la mayoría de las proteínas contaminantes con una etapa de NaCl 226 mM en el amortiguador SP. Después, se eluyó D₁₀sPHEX con una etapa de NaCl 280 mM (figura 4A). Se analizaron las fracciones mediante SDS-PAGE y con el ensayo de la actividad enzimática PHEX. Se agruparon las fracciones que contenían sPHEX y
- 25 se dializaron ampliamente contra MOPS 20 mM pH 7, NaCl 250 mM antes de cargarse en una columna Blue-Sepharose™ HP de 5 ml (Amersham Pharmacia) a 5 ml/min. Se enjuagó la columna a la misma velocidad de flujo con el mismo amortiguador y se recuperó la mayoría de la proteína D₁₀sPHEX mediante el aumento de la concentración de NaCl en etapas hasta 350 mM (figura 4B). La pureza de la fracción final fue mayor que el 95 %. Alternativamente, la Blue-Sepharose™ se pudo reemplazar por Heparin-Sepharose™ (Amersham Pharmacia) en la
- 30 cual D₁₀sPHEX se une estrechamente en un intervalo de pH (5 a 8). Se eluyó D₁₀sPHEX mediante el uso de gradiente de NaCl. Se determinó la pureza como mayor que el 90 %. Se concentró D₁₀sPHEX y se dializó contra PO₄ de sodio 1 mM pH 7,4, NaCl 150 mM utilizando cartuchos Centriprep-50™. Se filtró la muestra dializada en un entorno estéril en una membrana de 0,22 µm. Se demostró que D₁₀sPHEX purificado permanece estable durante meses a 4 °C. Se determinaron las concentraciones de proteínas mediante el procedimiento de Bradford. (Kit de
- 35 ensayo de proteína DC; Biorad) con albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Se evaluó la pureza de la proteína mediante tinción con Sypro-Ruby™ (Molecular Probes) de las proteínas resueltas en SDS-PAGE 4-12 % (figura 3). Se determinó la actividad enzimática de D₁₀sPHEX utilizando el sustrato fluorogénico.

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

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

- 45 Por lo tanto, se investigó el posible efecto terapéutico de D₁₀sPHEX y sPHEX con inyección intravenosa de bolo a ratones Hyp/Y durante un período de 2 semanas.

- Se dializaron D₁₀sPHEX y sPHEX contra el vehículo y se filtraron las soluciones a través de un filtro de proteína de unión baja de 0,22 µm. Se dividieron en alícuotas las soluciones y se analizaron nuevamente para detectar la actividad enzimática y la concentración mediante ensayo enzimático fluorogénico y el procedimiento de Bradford, respectivamente.

- Se anestesió a cada ratón con isoflurano vaporizado (2 %) y D₁₀sPHEX, o se inyectó sPHEX como un bolo intravenoso a través de la vena subclavia. La dosis fue 5 mg/kg de peso corporal para cada grupo. Se trataron los animales una vez al día durante 14 días consecutivos. Se recogieron las muestras de sangre (0,1-0,2 ml) a través de la vena subclavia con anestesia en los días del estudio - 3 y +15 (antes de la necropsia, 24 horas después de la última inyección). Se evaluaron los niveles totales de fosfatasa alcalina (ALP) en suero diluido (30 µl de muestra de suero con 90 µl de solución salina al 0,9 % USP). Aunque las dosificaciones adecuadas para los pacientes humanos
- 60 no son proporcionales a las utilizadas en los ratones, estas dosificaciones predicen los intervalos de dosificaciones

que pueden ser adecuados en los seres humanos utilizando las tablas publicadas.

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

5

EJEMPLO 4

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

10 Marcado con fluoresceína de proteínas purificadas

Se marcaron proteínas purificadas recombinantes con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Molecular Probes F143). Se realizó la reacción mediante el agregado de proteínas a fosfato de sodio 10 mM, amortiguador de NaCl 50 mM pH 7 a una concentración de proteína final de 1 mg/ml. La reacción de marcado inició mediante el agregado de FITC
15 disuelto en DMSO en una concentración de 20 mg/ml para alcanzar una proporción molar de 20:1 con respecto a la concentración de proteína. Se dejó reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora. Se separó la proteína marcada de la fluoresceína libre en una columna PD-10™ (Pharmacia) antes de la diálisis en el amortiguador de unión (fosfato de sodio 1 mM NaCl 150 mM, pH 7,4).

20 Preparación de la fase mineral de los huesos

Se diseccionaron huesos largos de una rata y se trituraron hasta convertirlos en polvo en un mortero enfriado con nitrógeno líquido. El polvo se mantuvo a -80 °C o se utilizó directamente. Se lavó una alícuota del polvo (300 mg) 3 veces con 8 ml de PBS y se le agregaron 8 ml de HCl 1 M. Se mantuvo la mezcla en suspensión en un mezclador
25 giratorio durante 1 hora a temperatura ambiente. Se centrifugó la fracción insoluble y se recogió el sobrenadante ácido claro. Esta solución ácida permaneció estable a temperatura ambiente durante al menos dos semanas.

Reacción de unión

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

40

Resultados

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

EJEMPLO 5

La fusión de D₁₀ a sPHEX aumenta su unión al hueso

50

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

55 En cambio, D₆-sPHEX se construyó y se evaluó después de la inyección *in vivo* en animales (como se describe en el ejemplo 1 arriba) y no promovió la unión de las proteínas recombinantes al hueso (no se muestran los datos).

EJEMPLO 6

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

5

10

20

35

30

35

40

50

55

que contenía Tween 20™ al 0,05 % (PBST) y leche deshidratada 5 %. Después, se incubó la membrana secuencialmente a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-hBAP (mAb 4B-78, Developmental Studies Hybridoma Bank) (1:1000 en PBST con leche deshidratada al 5 %) y una IgG de conejo anti-ratón acoplada con peroxidasa de rábano picante (Sigma) (1:12000 en PBST con leche deshidratada al 5 %). Se desarrolló la señal con Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus™ (PerkinElmer).

La actividad enzimática de ALP medida en los medios acondicionados de HEK293 después de la transfección transitoria fue muy alta y de magnitud similar para pCDNA3-RSV-sALP-NEO (sALP) y pCDNA3-RSV-sALP-D₁₀-NEO (sALP-D₁₀) (figura 13). Esta actividad fue específica del ADN del plásmido transfectado, ya que no se podía detectar en las células con transfección simulada (simulación). La actividad relativa medida en los medios fue 35 veces mayor que la medida en los extractos celulares, lo que demuestra la naturaleza secretora de sALP y sALP-D₁₀. En consecuencia, para sALP y sALP-D₁₀, la inmunotransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal elevado contra fosfatasa alcalina humana no específica de tejido recombinante (mAb 4B-78, Developmental Studies Hybridoma Bank) reveló una señal mucho más fuerte en los medios acondicionados que en los extractos celulares (figura 14B, comparar los carriles 2, 3 frente a 5, 6). No se visualizó ninguna señal en las muestras transfectadas de forma simulada (figura 14B, carriles 4 y 7). La señal que aparece en las células con transfección simulada consiste en la traza de BSA. El peso molecular aparente de la proteína detectada se calculó en 70 kDa en los extractos celulares (flecha) y ligeramente superior en los medios acondicionados (punta de flecha). Se realizó una tinción con rojo Ponceau de la membrana para monitorizar la carga uniforme de las muestras (figura 14A).

Generación de células HEK293 que segregan constitutivamente sALP y sALP-D₁₀

Para inducir la expresión estable de las proteínas sALP y sALP-D₁₀, se transfectaron los vectores pCDNA3-RSV-sALP-NEO y pCDNA3-RSV-sALP-D₁₀-NEO por separado en células HEK-293S utilizando el kit Lipofectamine-Plus liposome transfection kit™ (Invitrogen). Se seleccionaron las células transfectadas mediante el agregado de 800 µg/ml G418 (Life Technologies) al medio. Para cada transfección, se analizó un grupo de células resistentes a G-418 para la expresión de sALP o sALP-D₁₀ en el medio de cultivo usado utilizando el ensayo enzimático fluorescente de ALP. Los medios acondicionados recogidos de las líneas celulares estables se utilizaron para el estudio del ensayo de unión en el mineral óseo.

Unión a la fase mineral reconstituida del hueso

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

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

Dicha proteína de fusión se puede dirigir directamente a los huesos donde la acumulación de PPI inhibe la mineralización esquelética.

EJEMPLO 7

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

Se cultivaron las células UMR106 hasta la confluencia. Después, se cultivaron durante otros 7 días en medio que contenía β-glicerofosfato 10 mM para inducir la mineralización. A lo largo de este período de cultivo de 7 días, se

trataron las células con o sin pirofosfato (PPi) 75 μ M, un inhibidor de la mineralización y un sustrato de fosfatasa alcalina. Para evaluar la capacidad de la fosfatasa alcalina de rescatar la inhibición de la mineralización inducida por PPi, se cultivaron células tratadas con o sin PPi con concentraciones variadas de D₁₀-sALP semipurificado producido a partir de HEK293, células de riñón embrionarias humanas. Se evaluó la mineralización mediante absorción de ⁴⁵Ca. Los parámetros utilizados para este experimento se presentan en la tabla 2 abajo.

TABLA 2 - PARÁMETROS UTILIZADOS EN D₁₀-ALP SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA MINERALIZACIÓN INDUCIDA POR PPi

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

10 7 días de tratamiento con PPi produjeron una disminución del 43 % en la mineralización. El cotratamiento de los cultivos con D₁₀sALP produjo un rescate que responde a la dosis de esta inhibición de la mineralización. El tratamiento con 1,5 unidades de D₁₀-sALP produjo una disminución del 30 %, 3 y 4,5 unidades una disminución del 24 % y 6 unidades produjeron una disminución del 15 % en la mineralización, lo que corresponde a un rescate del 65 % de la inhibición de la mineralización inducida por PPi.

15

Estos resultados muestran que el tratamiento de los osteoblastos mineralizantes con D₁₀-sALP rescata de forma que responde a la dosis la inhibición de la mineralización inducida por PPi.

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

20

REFERENCIAS:

- 25 1-Weinberg, JM (2003) An overview of infliximab, etanercept, efalizumab, and alefacept as biologic therapy for psoriasis. Clin Ther 25: 2487-2505.
- 2-Whyte MP, Valdes R Jr, Ryan LM, McAlister WH (1982) Infantile hypophosphatasia: enzyme replacement therapy by intravenous infusion of alkaline phosphatase-rich plasma from patients with Paget bone disease. J Pediatr 101: 379-386.
- 30 3-Whyte MP, Kurtzberg J, McAlister WH, Mumm S, Podgornik MN, Coburn S, Ryan LM, Miller CR, Gottesman GS, Smith AK, Douville J, Waters-Pick B, Armstrong RD, Martin PL (2003) Marrow cell transplantation for infantile hypophosphatasia. J Bone Miner Res 18: 624-636.
- 4-Fujisaki J, Tokunaga Y, Takahashi T, Shimojo F, Kimura S, Hata T (1997) Osteotropic drug delivery system (ODDS) based on bisphosphonic prodrugs. IV: Effects of osteotropic estradiol on bone mineral density and uterine weight in ovariectomized rats. J Drug Targeting 6: 129-138.
- 35 5-Uludag H, Gao T, Wohl GR, Kantoci D, Zemicke RF (2000) Bone affinity of a bisphosphonate-conjugated protein in vivo. Biotechnol Prog 16: 1115-1118.
- 6-Sekido T, Sakura N, Higashi Y, Miya K, Nitta Y, Nomura M, Sawanishi H, Morito K, Masamune Y, Kasugai S, Yokogawa K, Miyamoto K-I (2001) Novel drug delivery system to bone using acidic oligopeptides: pharmacokinetic characteristics and pharmacological potential. J Drug Targeting 9: 111-121.
- 40 7-Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA (1994) Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. Biochem J 300: 723-728.
- 8-Rowe PSN, de Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ, Oudet CL (2000) MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. Genomics 67: 54-68.
- 45 9-Gilbert M, Shaw WJ, Long JR, Nelson K, Droby GP, Giachelli CM, Stayton PS (2000) Chimeric peptides of statherin and osteopontin that bind hydroxyapatite and mediate cell adhesion. J Biol Chem 275: 16213-16218.
- 10-Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG (1992) Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bones. Clin Orthop 281: 275-294.

11-Salih E, Ashkar S, Gerstenfeld FC, Glimcher MJ (1997) Identification of the phosphorylated sites of metabolically 32P-labeled osteopontin from cultured chicken osteoblasts. J Biol Chem 272: 13966-13973.

12-Campbell PG, Andress DL (1997) Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-5-(201-218) region regulates hydroxyapatite and IGF-I binding. Am J Physiol 273: E1005-E1013.

5 13-Patti JM, House-Pompeo K, Boles JO, Garza N, Gurusiddappa S, Hook M (1995) Critical residues in the ligand-binding site of the Staphylococcus aureus collagen-binding adhesin (MSCRAMM). J Biol Chem 270: 12005-12011.

14-Symersky J, Patti JM, Carson M, House-Pompeo K, Teale M, Moore D, Jin L, Schneider A, DeLucas LJ, Hook M, Narayana SV (1997) Structure of the collagen-binding domain from a Staphylococcus aureus adhesin. Nat Struct Biol 4: 833-838.

10

Se describe:

1. Un conjugado para administración ósea que tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:

15

A) X-D_n-Y-proteína-Z;

y

B) Z-proteína-Y-D_n-X,

20

donde X está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido;

Y está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido;

Z está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido; y

D_n es un poli aspartato donde n = 10 a 16.

25

2. Un conjugado para administración ósea como se menciona en 1, donde la proteína es un gen regulador de fosfato soluble con homología para las endopeptidasas en el cromosoma X (sPHEX).

3. Un conjugado para administración ósea como se menciona en 2, donde dicha estructura es: X-D_n-Y-sPHEX-Z.

30

4. Un conjugado para administración ósea como se menciona en 3, donde sPHEX tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 46 a 749 de la figura 10; 47 a 749 de la figura 10; 48 a 749 de la figura 10; 49 a 749 de la figura 10; 50 a 749 de la figura 10; 51 a 749 de la figura 10; 52 a 749 de la figura 10; 53 a 749 de la figura 10; y 54 a 749 de la figura 10.

35

5. Un conjugado para administración ósea como se menciona en 3, donde el sPHEX consiste en la secuencia de aminoácidos 46 a 749 de la figura 10 y n=10.

6. Un conjugado para administración ósea como se menciona en 1, donde la proteína es una fosfatasa alcalina soluble (sALP).

40

7. Un conjugado para administración ósea como se menciona en 6, donde dicha estructura es: Z-sALP-X-D_n-Y.

8. Un conjugado para administración ósea como se menciona en 7, donde sALP está codificado por la secuencia como se presenta en la figura 16A.

45

9. Un conjugado para administración ósea como se menciona en 7, donde el sALP tiene la secuencia como se presenta en la figura 16B.

50 10. Un conjugado para administración ósea como se menciona en 7, donde n=10.

11. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

55 a) un polinucleótido codificante de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se presenta en la figura 8;

b) un polinucleótido codificante de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se presenta en la figura 11;

c) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos como se presenta en la figura 7;

60 d) una secuencia de nucleótidos completamente complementaria con cualquiera de las secuencias de nucleótidos

en (a), (b) o (c); y

- e) una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar en condiciones de rigurosidad elevada con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a), (b), (c) o (d), donde las condiciones de rigurosidad alta comprenden: prehibridación e hibridación en 6XSSC, 5Xreactivo de Denhardt, SDS al 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 68 °C; y lavados en 2XSSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente durante 10 min; en 2XSSC y SDS al 0,1 % a temperatura ambiente durante 10 min; y en 0,1XSSC y SDS al 0,5 % a 65 °C tres veces durante 5 minutos.

12. Un vector recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos aislada de 11.

13. Una célula hospedadora recombinante que comprende el vector de 12. La presente invención se refiere a:

14. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos como se presenta en la figura 17A;
b) un polinucleótido codificante de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se presenta en la figura 17B;
c) una secuencia de nucleótidos completamente complementaria con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a) o (b); y
d) una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar en condiciones de rigurosidad elevada con la secuencia de nucleótidos en (c), donde las condiciones de rigurosidad alta comprenden: prehibridación e hibridación en 6XSSC, 5Xreactivo de Denhardt, SDS al 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 68 °C; y lavados en 2XSSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente durante 10 min; en 2XSSC y SDS al 0,1 % a temperatura ambiente durante 10 min; y en 0,1XSSC y SDS al 0,5 % a 65 °C tres veces durante 5 minutos; donde dicha molécula de ácido nucleico codifica una fosfatasa alcalina soluble activa que comprende en el extremo C una secuencia de poliaspartato D_n, donde n = 10 a 16.

Se describe:

15. Una molécula de ácido nucleico aislada codificante de PHEX soluble funcional que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- a) un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 54 a 749 como se presenta en la figura 10;
b) un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 53 a 749 como se presenta en la figura 10;
c) un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 52 a 749 como se presenta en la figura 10;
d) un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 51 a 749 como se presenta en la figura 10;
e) un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 50 a 749 como se presenta en la figura 10;
f) un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 49 a 749 como se presenta en la figura 10;
g) un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 48 a 749 como se presenta en la figura 10;
h) un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 47 a 749 como se presenta en la figura 10;
i) un polinucleótido codificante de un sPHEX que comprende los aminoácidos 46 a 749 como se presenta en la figura 10;
j) una secuencia de nucleótidos completamente complementaria con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a) a (i); y
k) una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar en condiciones de rigurosidad elevada con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en (a) a (j), donde las condiciones de rigurosidad alta comprenden: prehibridación e hibridación en 6XSSC, 5Xreactivo de Denhardt, SDS al 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 68 °C; y lavados en 2XSSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente durante 10 min; en 2XSSC y SDS al 0,1 % a temperatura ambiente durante 10 min; y en 0,1XSSC y SDS al 0,5 % a 65 °C tres veces durante 5 minutos.

16. Una molécula de ácido nucleico aislada como se menciona en 15 que además comprende en su extremo 5', un polinucleótido codificante de un poli-aspartato seleccionado del grupo que consiste en D₁₀ a D₁₆.

17. Un polipéptido de sPHEX aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 a) los aminoácidos 54 a 749 como se presenta en la figura 10;
- b) los aminoácidos 53 a 749 como se presenta en la figura 10;
- c) los aminoácidos 52 a 749 como se presenta en la figura 10;
- d) los aminoácidos 51 a 749 como se presenta en la figura 10;
- 10 e) los aminoácidos 50 a 749 como se presenta en la figura 10;
- f) los aminoácidos 49 a 749 como se presenta en la figura 10;
- g) los aminoácidos 48 a 749 como se presenta en la figura 10;
- h) los aminoácidos 47 a 749 como se presenta en la figura 10; y
- i) los aminoácidos 46 a 749 como se presenta en la figura 10.

15 18. Una composición para administración ósea que comprende un conjugado para administración ósea como se menciona en 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

19. Un uso de un conjugado para administración ósea como se menciona en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para administrar una proteína al tejido óseo de un mamífero.

20. Un uso de un conjugado para administración ósea como se menciona en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de gen regulador de fosfato funcional con homología para las endopeptidasas en el cromosoma X (PHEX), donde dicho conjugado se encuentra en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

21. Un uso de un conjugado para administración ósea como se menciona en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 en la fabricación de un medicamento para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de gen regulador de fosfato funcional con homología para las endopeptidasas en el cromosoma X (PHEX).

22. Un uso como se menciona en 20 o 21, donde la afección o la enfermedad es raquitismo hipofosfático ligado a X (XLH).

23. Un uso de un conjugado para administración ósea como se menciona en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de fosfatasa alcalina funcional, donde dicho conjugado se encuentra en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

24. Un uso de un conjugado para administración ósea como se menciona en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 en la fabricación de un medicamento para tratar una afección o enfermedad relacionada con un defecto óseo caracterizado por una falta de o una cantidad insuficiente de fosfatasa alcalina funcional, donde dicho conjugado se encuentra en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25. Un uso como se menciona en 23 o 24, donde la afección o la enfermedad es hipofosfatasia.

26. Un procedimiento para evaluar péptidos para uso en un conjugado de proteína-péptido para administración ósea que comprende las etapas de:

50 fusionar un péptido candidato con una proteína indicadora para formar un conjugado de proteína-péptido; poner en contacto el conjugado con tejido óseo o la fase mineral del hueso; y donde el péptido candidato se selecciona cuando la presencia de la proteína indicadora en el tejido óseo o la fase mineral del hueso es mayor cuando se conjuga con el péptido candidato que cuando no lo hace.

55 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ENOBIA PHARMA INC.
Crine, Philippe
Loisel, Thomas
60 Lemire, Isabelle

Boileau, Guy

<120> CONJUGADOS PARA ADMINISTRACIÓN ÓSEA Y PROCEDIMIENTO DE USO DE ESTOS PARA DIRIGIR PROTEÍNAS AL HUESO

5

<130> 12987.50

<140> PCT/CA05/000615

<141> 2005-04-21

10

<150> US 60/563,828

<151> 2004-04-21

<150> US 60/614,984

15

<151> 2004-10-04

<150> US 60/590,347

<151> 2004-07-23

20 <160> 44

<170> Versión de patente 3.2

<210> 1

25

<211> 2280

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30

<223> Conjugado escindible codificante

<400> 1

atggaagcag aaacagggag cagcgtggag actggaaaga aggccaacag aggcactcga	60
attgccctgg tcgtgtttgt cctgacagtg atcgctcaac aaacaaccag tcaaggtctc	120
ttatccggag atgacgatga cgatgacgat gacgatgact ccggaagtct ccaagctaaa	180
caggagtact gcctgaagcc agaatgcac gaagcggctg ctgccatctt aagtaaagta	240
aatctgtctg tggatccttg tgataatttc ttccggttcg ctgtgatgg ctggataagc	300
aataatccaa ttcccgaaga tatgccaaagc tatggggttt atccttggtc gagacataat	360
gttgacctca agttgaagga acttttggag aaatcaatca gtagaaggcg ggacaccgaa	420
gccatacaga aagccaaaat cctttattca tcctgcatga atgagaaagc gattgaaaaa	480
gcagatgcc aagcactgct acacatccta cggcattcac ctttccgctg gcccggtgctt	540
gaatctaata ttggccctga aggggttttg tcagagagaa agttcagcct tctgcagaca	600

ES 2 687 786 T3

```

cttgcaacgt ttcgtggta atacagcaat tctgtgttca tccgtttgta tgtgtcccct 660
gatgacaaag catccaatga acatatcttg aagctggacc aagcaacact ctccctggcc 720
gtgaggggaag actaccttga taacagtaca gaagccaagt cttatcgga tgccctttac 780
aagttcatgg tggatactgc cgtgctttta ggagctaaca gttccagagc agagcatgac 840
atgaagtcag tgctcagatt ggaaattaag atagctgaga taatgattcc acatgaaaac 900
cgaaccagcg aggccatgta caacaaaatg aacatttctg aactgagtgc tatgattccc 960
cagttcgact ggctgggcta catcaagaag gtcattgaca ccagactcta ccccatctg 1020
aaagacatca gccctccga gaatgtgtg gtcgcgtcc cgcagtactt taaagatttg 1080
tttaggatat tagggctga gagaaagaag accattgcca actatttgggt gtggagaatg 1140
gtttattcca gaattccaaa ccttagcagg cgctttcagt atagatggct ggaattctca 1200
agggtaatcc aggggaccac aactttgctg cctcaatggg acaaagtgtt aaactttatt 1260
gaaagtgcc tcccttatgt tgttgaaaag atgtttgtag atgtgtactt ccaggaagat 1320
aagaaggaaa tgatggagga attggttgag ggcgttcgct gggcctttat tgacatgcta 1380
gagaaagaaa atgagtggat ggatgcagga acgaaaagga aagccaaaga aaaggcgaga 1440
gctgttttgg caaaagtgg ctatccagag ttataatga atgatactca tgttaatgaa 1500
gacctcaaag ctatcaagtt ttcagaagcc gactactttg gcaacgtcct acaaactcgc 1560
aagtatttag cacagtctga tttcttctgg ctaagaaaag ccgttccaaa aacagagtgg 1620
tttacaatc cgacgactgt caatgccttc tacagtgcac ccaccaacca gatccgattt 1680
ccagcaggag agtccagaa gcctttcttt tggggaacag aatatcctcg atctctgagt 1740
tatggtgcta taggagtaat tgcggacat gaatttacac atggatttga taataatggt 1800
agaaaatatg ataaaaatgg aaacctggat ccttgggtgt ctactgaatc agaagaaaag 1860
ttaaggaaa aaacaaaatg catgattaac cagtatagca actattattg gaagaaagct 1920
ggcttaaatg tcaaggggaa gaggaccctg ggagaaaata ttgctgataa tggaggcctg 1980
cggaagctt ttagggctta caggaaatgg ataaatgaca gaaggcaggg acttgaggag 2040
cctcttctac caggcatcac attcaccaac aaccagctct tcttctgag ttatgctcat 2100
gtgaggtgca attctacag accagaagct gcccgagaac aagtccaaat tgggtgctcac 2160
agtccccctc agtttaggggt caatggtgca attagtaact ttgaagaatt ccagaaagct 2220
ttaactgtc caccaattc cacgatgaac agaggcatgg actcctgccg actctggtag 2280

```

<210> 2

<211> 759

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220

ES 2 687 786 T3

<223> Conjugado de PHEX escindible

<400> 2

```

Met Glu Ala Glu Thr Gly Ser Ser Val Glu Thr Gly Lys Lys Ala Asn
 1              5              10              15

Arg Gly Thr Arg Ile Ala Leu Val Val Phe Val Leu Thr Val Ile Ala
      20              25              30

Gln Gln Thr Thr Ser Gln Gly Leu Leu Ser Gly Asp Asp Asp Asp Asp
      35              40              45

Asp Asp Asp Asp Asp Ser Gly Ser Leu Gln Ala Lys Gln Glu Tyr Cys
 50              55              60

Leu Lys Pro Glu Cys Ile Glu Ala Ala Ala Ala Ile Leu Ser Lys Val
65              70              75              80

Asn Leu Ser Val Asp Pro Cys Asp Asn Phe Phe Arg Phe Ala Cys Asp
      85              90              95

Gly Trp Ile Ser Asn Asn Pro Ile Pro Glu Asp Met Pro Ser Tyr Gly
      100              105              110

Val Tyr Pro Trp Leu Arg His Asn Val Asp Leu Lys Leu Lys Glu Leu
      115              120              125

Leu Glu Lys Ser Ile Ser Arg Arg Arg Asp Thr Glu Ala Ile Gln Lys
      130              135              140

Ala Lys Ile Leu Tyr Ser Ser Cys Met Asn Glu Lys Ala Ile Glu Lys
145              150              155              160

Ala Asp Ala Lys Pro Leu Leu His Ile Leu Arg His Ser Pro Phe Arg
      165              170              175

Trp Pro Val Leu Glu Ser Asn Ile Gly Pro Glu Gly Val Trp Ser Glu
      180              185              190

```

ES 2 687 786 T3

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

ES 2 687 786 T3

Val Asn Phe Ile Glu Ser Ala Leu Pro Tyr Val Val Gly Lys Met Phe
420 425 430

Val Asp Val Tyr Phe Gln Glu Asp Lys Lys Glu Met Met Glu Glu Leu
435 440 445

Val Glu Gly Val Arg Trp Ala Phe Ile Asp Met Leu Glu Lys Glu Asn
450 455 460

Glu Trp Met Asp Ala Gly Thr Lys Arg Lys Ala Lys Glu Lys Ala Arg
465 470 475 480

Ala Val Leu Ala Lys Val Gly Tyr Pro Glu Phe Ile Met Asn Asp Thr
485 490 495

His Val Asn Glu Asp Leu Lys Ala Ile Lys Phe Ser Glu Ala Asp Tyr
500 505 510

Phe Gly Asn Val Leu Gln Thr Arg Lys Tyr Leu Ala Gln Ser Asp Phe
515 520 525

Phe Trp Leu Arg Lys Ala Val Pro Lys Thr Glu Trp Phe Thr Asn Pro
530 535 540

Thr Thr Val Asn Ala Phe Tyr Ser Ala Ser Thr Asn Gln Ile Arg Phe
545 550 555 560

Pro Ala Gly Glu Leu Gln Lys Pro Phe Phe Trp Gly Thr Glu Tyr Pro
565 570 575

Arg Ser Leu Ser Tyr Gly Ala Ile Gly Val Ile Val Gly His Glu Phe
580 585 590

Thr His Gly Phe Asp Asn Asn Gly Arg Lys Tyr Asp Lys Asn Gly Asn
595 600 605

Leu Asp Pro Trp Trp Ser Thr Glu Ser Glu Glu Lys Phe Lys Glu Lys
610 615 620

Thr Lys Cys Met Ile Asn Gln Tyr Ser Asn Tyr Tyr Trp Lys Lys Ala
625 630 635 640

ES 2 687 786 T3

Gly Leu Asn Val Lys Gly Lys Arg Thr Leu Gly Glu Asn Ile Ala Asp
645 650 655

Asn Gly Gly Leu Arg Glu Ala Phe Arg Ala Tyr Arg Lys Trp Ile Asn
660 665 670

Asp Arg Arg Gln Gly Leu Glu Glu Pro Leu Leu Pro Gly Ile Thr Phe
675 680 685

Thr Asn Asn Gln Leu Phe Phe Leu Ser Tyr Ala His Val Arg Cys Asn
690 695 700

Ser Tyr Arg Pro Glu Ala Ala Arg Glu Gln Val Gln Ile Gly Ala His
705 710 715 720

Ser Pro Pro Gln Phe Arg Val Asn Gly Ala Ile Ser Asn Phe Glu Glu
725 730 735

Phe Gln Lys Ala Phe Asn Cys Pro Pro Asn Ser Thr Met Asn Arg Gly
740 745 750

Met Asp Ser Cys Arg Leu Trp
755

<210> 3

<211> 749

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PHEX humano natural

10

<400> 3

Met Glu Ala Glu Thr Gly Ser Ser Val Glu Thr Gly Lys Lys Ala Asn
1 5 10 15

Arg Gly Thr Arg Ile Ala Leu Val Val Phe Val Gly Gly Thr Leu Val
20 25 30

Leu Gly Thr Ile Leu Phe Leu Val Ser Gln Gly Leu Leu Ser Leu Gln
35 40 45

Ala Lys Gln Glu Tyr Cys Leu Lys Pro Glu Cys Ile Glu Ala Ala Ala
50 55 60

ES 2 687 786 T3

Ala Ile Leu Ser Lys Val Asn Leu Ser Val Asp Pro Cys Asp Asn Phe
65 70 75 80

Phe Arg Phe Ala Cys Asp Gly Trp Ile Ser Asn Asn Pro Ile Pro Glu
85 90 95

Asp Met Pro Ser Tyr Gly Val Tyr Pro Trp Leu Arg His Asn Val Asp
100 105 110

Leu Lys Leu Lys Glu Leu Leu Glu Lys Ser Ile Ser Arg Arg Arg Asp
115 120 125

Thr Glu Ala Ile Gln Lys Ala Lys Ile Leu Tyr Ser Ser Cys Met Asn
130 135 140

Glu Lys Ala Ile Glu Lys Ala Asp Ala Lys Pro Leu Leu His Ile Leu
145 150 155 160

Arg His Ser Pro Phe Arg Trp Pro Val Leu Glu Ser Asn Ile Gly Pro
165 170 175

Glu Gly Val Trp Ser Glu Arg Lys Phe Ser Leu Leu Gln Thr Leu Ala
180 185 190

Thr Phe Arg Gly Gln Tyr Ser Asn Ser Val Phe Ile Arg Leu Tyr Val
195 200 205

Ser Pro Asp Asp Lys Ala Ser Asn Glu His Ile Leu Lys Leu Asp Gln
210 215 220

Ala Thr Leu Ser Leu Ala Val Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Asn Ser Thr
225 230 235 240

Glu Ala Lys Ser Tyr Arg Asp Ala Leu Tyr Lys Phe Met Val Asp Thr
245 250 255

Ala Val Leu Leu Gly Ala Asn Ser Ser Arg Ala Glu His Asp Met Lys
260 265 270

Ser Val Leu Arg Leu Glu Ile Lys Ile Ala Glu Ile Met Ile Pro His
275 280 285

ES 2 687 786 T3

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

ES 2 687 786 T3

515	520	525
Glu Trp Phe Thr Asn Pro Thr Thr Val Asn Ala Phe Tyr Ser Ala Ser		
530	535	540
Thr Asn Gln Ile Arg Phe Pro Ala Gly Glu Leu Gln Lys Pro Phe Phe		
545	550	555
Trp Gly Thr Glu Tyr Pro Arg Ser Leu Ser Tyr Gly Ala Ile Gly Val		
565	570	575
Ile Val Gly His Glu Phe Thr His Gly Phe Asp Asn Asn Gly Arg Lys		
580	585	590
Tyr Asp Lys Asn Gly Asn Leu Asp Pro Trp Trp Ser Thr Glu Ser Glu		
595	600	605
Glu Lys Phe Lys Glu Lys Thr Lys Cys Met Ile Asn Gln Tyr Ser Asn		
610	615	620
Tyr Tyr Trp Lys Lys Ala Gly Leu Asn Val Lys Gly Lys Arg Thr Leu		
625	630	635
Gly Glu Asn Ile Ala Asp Asn Gly Gly Leu Arg Glu Ala Phe Arg Ala		
645	650	655
Tyr Arg Lys Trp Ile Asn Asp Arg Arg Gln Gly Leu Glu Glu Pro Leu		
660	665	670
Leu Pro Gly Ile Thr Phe Thr Asn Asn Gln Leu Phe Phe Leu Ser Tyr		
675	680	685
Ala His Val Arg Cys Asn Ser Tyr Arg Pro Glu Ala Ala Arg Glu Gln		
690	695	700
Val Gln Ile Gly Ala His Ser Pro Pro Gln Phe Arg Val Asn Gly Ala		
705	710	715
Ile Ser Asn Ser Glu Glu Phe Gln Lys Ala Phe Asn Cys Pro Pro Asn		
725	730	735
Ser Thr Met Asn Arg Gly Met Asp Ser Cys Arg Leu Trp		
740	745	

<210> 4
 <211> 718
 5 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>

ES 2 687 786 T3

<223> Conjugado de PHEX soluble

<400> 4

```

Ser Gly Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Ser Gly Ser Leu
1          5          10          15

Gln Ala Lys Gln Glu Tyr Cys Leu Lys Pro Glu Cys Ile Glu Ala Ala
20          25          30

Ala Ala Ile Leu Ser Lys Val Asn Leu Ser Val Asp Pro Cys Asp Asn
35          40          45

Phe Phe Arg Phe Ala Cys Asp Gly Trp Ile Ser Asn Asn Pro Ile Pro
50          55          60

Glu Asp Met Pro Ser Tyr Gly Val Tyr Pro Trp Leu Arg His Asn Val
65          70          75          80

Asp Leu Lys Leu Lys Glu Leu Leu Glu Lys Ser Ile Ser Arg Arg Arg
85          90          95

Asp Thr Glu Ala Ile Gln Lys Ala Lys Ile Leu Tyr Ser Ser Cys Met
100         105         110

Asn Glu Lys Ala Ile Glu Lys Ala Asp Ala Lys Pro Leu Leu His Ile
115         120         125

Leu Arg His Ser Pro Phe Arg Trp Pro Val Leu Glu Ser Asn Ile Gly
130         135         140

Pro Glu Gly Val Trp Ser Glu Arg Lys Phe Ser Leu Leu Gln Thr Leu
145         150         155         160

Ala Thr Phe Arg Gly Gln Tyr Ser Asn Ser Val Phe Ile Arg Leu Tyr
165         170         175

Val Ser Pro Asp Asp Lys Ala Ser Asn Glu His Ile Leu Lys Leu Asp

```

ES 2 687 786 T3

180	185	190
Gln Ala Thr Leu Ser Leu Ala Val Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Asn Ser		
195	200	205
Thr Glu Ala Lys Ser Tyr Arg Asp Ala Leu Tyr Lys Phe Met Val Asp		
210	215	220
Thr Ala Val Leu Leu Gly Ala Asn Ser Ser Arg Ala Glu His Asp Met		
225	230	235
Lys Ser Val Leu Arg Leu Glu Ile Lys Ile Ala Glu Ile Met Ile Pro		
245	250	255
His Glu Asn Arg Thr Ser Glu Ala Met Tyr Asn Lys Met Asn Ile Ser		
260	265	270
Glu Leu Ser Ala Met Ile Pro Gln Phe Asp Trp Leu Gly Tyr Ile Lys		
275	280	285
Lys Val Ile Asp Thr Arg Leu Tyr Pro His Leu Lys Asp Ile Ser Pro		
290	295	300
Ser Glu Asn Val Val Val Arg Val Pro Gln Tyr Phe Lys Asp Leu Phe		
305	310	315
Arg Ile Leu Gly Ser Glu Arg Lys Lys Thr Ile Ala Asn Tyr Leu Val		
325	330	335
Trp Arg Met Val Tyr Ser Arg Ile Pro Asn Leu Ser Arg Arg Phe Gln		
340	345	350
Tyr, Arg Trp Leu Glu Phe Ser Arg Val Ile Gln Gly Thr Thr Thr Leu		
355	360	365
Leu Pro Gln Trp Asp Lys Cys Val Asn Phe Ile Glu Ser Ala Leu Pro		
370	375	380
Tyr Val Val Gly Lys Met Phe Val Asp Val Tyr Phe Gln Glu Asp Lys		
385	390	395
Lys Glu Met Met Glu Glu Leu Val Glu Gly Val Arg Trp Ala Phe Ile		
405	410	415

ES 2 687 786 T3

Asp Met Leu Glu Lys Glu Asn Glu Trp Met Asp Ala Gly Thr Lys Arg
 420 425 430
 Lys Ala Lys Glu Lys Ala Arg Ala Val Leu Ala Lys Val Gly Tyr Pro
 435 440 445
 Glu Phe Ile Met Asn Asp Thr His Val Asn Glu Asp Leu Lys Ala Ile
 450 455 460
 Lys Phe Ser Glu Ala Asp Tyr Phe Gly Asn Val Leu Gln Thr Arg Lys
 465 470 475 480
 Tyr Leu Ala Gln Ser Asp Phe Phe Trp Leu Arg Lys Ala Val Pro Lys
 485 490 495
 Thr Glu Trp Phe Thr Asn Pro Thr Thr Val Asn Ala Phe Tyr Ser Ala
 500 505 510
 Ser Thr Asn Gln Ile Arg Phe Pro Ala Gly Glu Leu Gln Lys Pro Phe
 515 520 525
 Phe Trp Gly Thr Glu Tyr Pro Arg Ser Leu Ser Tyr Gly Ala Ile Gly
 530 535 540
 Val Ile Val Gly His Glu Phe Thr His Gly Phe Asp Asn Asn Gly Arg
 545 550 555 560
 Lys Tyr Asp Lys Asn Gly Asn Leu Asp Pro Trp Trp Ser Thr Glu Ser
 565 570 575
 Glu Glu Lys Phe Lys Glu Lys Thr Lys Cys Met Ile Asn Gln Tyr Ser
 580 585 590
 Asn Tyr Tyr Trp Lys Lys Ala Gly Leu Asn Val Lys Gly Lys Arg Thr
 595 600 605
 Leu Gly Glu Asn Ile Ala Asp Asn Gly Gly Leu Arg Glu Ala Phe Arg
 610 615 620
 Ala Tyr Arg Lys Trp Ile Asn Asp Arg Arg Gln Gly Leu Glu Glu Pro
 625 630 635 640

ES 2 687 786 T3

Leu Leu Pro Gly Ile Thr Phe Thr Asn Asn Gln Leu Phe Phe Leu Ser
 645 650 655
 Tyr Ala His Val Arg Cys Asn Ser Tyr Arg Pro Glu Ala Ala Arg Glu
 660 665 670
 Gln Val Gln Ile Gly Ala His Ser Pro Pro Gln Phe Arg Val Asn Gly
 675 680 685
 Ala Ile Ser Asn Phe Glu Glu Phe Gln Lys Ala Phe Asn Cys Pro Pro
 690 695 700
 Asn Ser Thr Met Asn Arg Gly Met Asp Ser Cys Arg Leu Trp
 705 710 715

<210> 5
 <211> 1524
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fosfatasa alcalina soluble codificante

10

<400> 5
 ggatccacca tgatttcacc attcttagta ctggccattg gcacctgcct tactaactcc 60
 ttagtgccag agaaagagaa agacccaag tactggcgag accaagcgca agagacactg 120
 aaatatgccc tggagcttca gaagctcaac accaacgtgg ctaagaatgt catcatgttc 180
 ctgggagatg ggatgggtgt ctccacagtg acggctgccc gcatcctcaa gggtcagctc 240
 caccacaacc ctggggagga gaccaggctg gagatggaca agttcccctt cgtggccctc 300
 tccaagacgt acaacaccaa tgcccaggtc cctgacagcg ccggcaccgc caccgcctac 360
 ctgtgtgggg tgaaggccaa tgagggcacc gtgggggtaa gcgcagccac tgagcgttcc 420
 cgggtgaaca ccaccaggg gaacgaggtc acctccatcc tgcgctgggc caaggacgct 480
 gggaaatctg tgggcattgt gaccaccacg agagtgaacc atgccacccc cagcgcggcc 540
 tacgcccact cggtgaccg ggactggtac tcagacaacg agatgcccc tgaggccttg 600
 agccagggct gtaaggacat cgcctaccag ctcatgcata acatcaggga cattgacgtg 660
 atcatggggg gtggccggaa atacatgtac cccaagaata aaactgatgt ggagtatgag 720
 agtgacgaga aagccagggg cagcaggctg gacggcctgg acctcggtga cacctggaag 780
 agcttcaaac cgagatacaa gcactccac ttcatctgga accgcacgga actcctgacc 840

ES 2 687 786 T3

```

cttgaccccc acaatgtgga ctacctattg ggtctcttcg agccagggga catgcagtac    900
gagctgaaca ggaacaacgt gacggaccgc tcactctccg agatggtggt ggtggccatc    960
cagatcctgc ggaagaaccc caaaggcttc ttcttgctgg tggaaggagg cagaattgac   1020
cacgggcacc atgaaggaaa agccaagcag gccctgcatg aggcggtgga gatggaccgg   1080
gccatcgggc aggcaggcag cttgacctcc tcggaagaca ctctgaccgt ggtcactgcg   1140
gaccattccc acgtcttcac atttggtgga tacaccccc gtggcaactc tatctttggt   1200
ctggccccc tcttgagtga cacagacaag aagcccttca ctgccatcct gtatggcaat   1260
gggcctggct acaagggtgt ggcggtgaa cgagagaatg tctccatggt ggactatgct   1320
cacaacaact accaggcgca gtctgctgtg cccctgcgcc acgagacca cggcggggag   1380
gacgtggccg tcttctccaa gggcccatg gcgcacctgc tgacggcgt ccacgagcag   1440
aactacgtcc cccacgtgat ggcgtatgca gcctgcatg gggccaacct cggccactgt   1500
gtcctgcca gctcgtagtc taga                                           1524

```

<210> 6

<211> 502

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fosfatasa alcalina soluble

10

<400> 6

```

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 687 786 T3

85	90	95
Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly		
100	105	110
Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val		
115	120	125
Gly Val Ser Ala Ala Thr Glu Arg Ser Arg Cys Asn Thr Thr Gln Gly		
130	135	140
Asn Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser		
145	150	155
Val Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala		
165	170	175
Ala Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met		
180	185	190
Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu		
195	200	205
Met His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys		
210	215	220
Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu		
225	230	235
Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp		
245	250	255
Lys Ser Phe Lys Pro Arg Tyr Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg		
260	265	270
Thr Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val Asp Tyr Leu Leu Gly		
275	280	285
Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val		
290	295	300
Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val Ala Ile Gln Ile Leu		
305	310	315
		320

ES 2 687 786 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Ala Pro Ala Ser Ser
500

<210> 7

<211> 1554

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Conjugado de fosfatasa alcalina soluble codificante

10

<400> 7

ES 2 687 786 T3

```

ggatccacca tgatttcacc attttagta ctggccattg gcacctgcct tactaactcc      60
ttagtgccag agaaagagaa agacccaag tactggcgag accaagcgca agagacactg     120
aaatatgccc tggagcttca gaagctcaac accaacgtgg ctaagaatgt catcatgttc     180
ctgggagatg ggatgggtgt ctccacagtg acggctgccc gcatcctcaa gggtcagctc     240
caccacaacc ctggggagga gaccaggctg gagatggaca agttcccctt cgtggccctc     300
tccaagacgt acaacaccaa tgcccaggtc cctgacagcg ccggcaccgc caccgcctac     360
ctgtgtgggg tgaaggccaa tgagggcacc gtgggggtaa ggcagccac tgagcgttcc     420
cggtgcaaca ccacccaggg gaacgaggtc acctccatcc tgcgctgggc caaggacgct     480
gggaaatctg tgggcattgt gaccaccacg agagtgaacc atgccacccc cagcgccgcc     540
tacgccact cggtgaccg ggactggtag tcagacaacg agatgcccc tgaggccttg     600
agccagggct gtaaggacat cgctaccag ctcatgcata acatcaggga cattgacgtg     660
atcatggggg gtggccgga atacatgtac cccaagaata aaactgatgt ggagtatgag     720
agtgcagaga aagccagggg cagcaggctg gacggcctgg acctcggtga cacctggaag     780
agcttcaaac cgagatacaa gcactccac ttcactctga accgcacgga actcctgacc     840
cttgaccccc acaatgtgga ctacctattg ggtctcttcg agccagggga catgcagtac     900
gagctgaaca ggaacaacgt gacggaccgc tcaactctcg agatgggtgt ggtggccatc     960
cagatcctgc ggaagaaccc caaaggcttc ttcttctgtg tggaggagg cagaattgac    1020
cacgggcacc atgaaggaaa agccaagcag gccttgcctg aggcggtgga gatggaccgg    1080
gccatcgggc aggcaggcag cttgacctcc tcggaagaca ctctgaccgt ggctcactgcg    1140
gaccattccc acgtcttcac atttggtgga tacaccccc gtggcaactc tatctttggt    1200
ctggccccc tgctgagtga cacagacaag aagcccttca ctgccatcct gtatggcaat    1260
gggcctggct acaagggtgt gggcggtgaa cgagagaatg tctccatggt ggactatgct    1320
cacaacaact accaggcgca gtctgctgtg cccttgcgcc acgagacca cggcggggag    1380
gacgtggccg tcttctccaa gggcccatg gcgcacctgc tgcacggcgt ccacgagcag    1440
aactacgtcc cccacgtgat ggcgtatgca gcttgcctg gggccaacct cggccaactgt    1500
gctcctgcca gctcggtatg cgacgatgat gacgatgat acgactagtc taga          1554

```

<210> 8

<211> 512

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Conjugado de fosfatasa alcalina soluble

10

<400> 8

ES 2 687 786 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 687 786 T3

195	200	205
Met His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys		
210	215	220
Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu		
225	230	235 240
Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp		
	245	250 255
Lys Ser Phe Lys Pro Arg Tyr Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg		
	260	265 270
Thr Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val Asp Tyr Leu Leu Gly		
	275	280 285
Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val		
	290	295 300
Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val Ala Ile Gln Ile Leu		
305	310	315 320
Arg Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile		
	325	330 335
Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala		
	340	345 350
Val Glu Met Asp Arg Ala Ile Gly Gln Ala Gly Ser Leu Thr Ser Ser		
	355	360 365
Glu Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr		
	370	375 380
Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro		
385	390	395 400
Met Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly		
	405	410 415
Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser		
	420	425 430

ES 2 687 786 T3

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

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

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

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

Cys Ala Pro Ala Ser Ser Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
500 505 510

<210> 9

<211> 25

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

10

<400> 9

gatccgatga cgatgacgat gacgc

25

<210> 10

15 <211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido

<400> 10

ggccgcgtca tcgtcatcgt catcg

25

25 <210> 11

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Oligonucleótido

<400> 11

gatccgatga cgatgacgat gacgatgacg atgacgc

37

35

<210> 12

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

40

<220>

<223> Oligonucleótido

	<400> 12 ggccgcgtca tcgtcatcgt catcgtcatc gtcacg	37
5	<210> 13 <211> 55 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 13 gatccgatga cgatgacgat gacgatgacg atgacgatga cgatgacgat gacgc	55
15	<210> 14 <211> 55 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido	
25	<400> 14 ggccgcgtca tcgtcatcgt catcgtcatc gtcacgtca tcgtcatcgt catcg	55
30	<210> 15 <211> 61 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
35	<400> 15 gatccgatga cagtagtgag tcactgaca gtggcagttc aagtgagagc gatggtgacg	60
	c	61
40	<210> 16 <211> 61 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido	
50	<400> 16 ggccgcgtca ccactgctct cactgaact gccactgtca gatgactcac tactgtcatc	60
	g	61
55	<210> 17 <211> 52 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
60	<400> 17	

	gatccgattc atctgaagag aaatttttgc gtagaattgg aagattcggg gc	52
	<210> 18	
	<211> 55	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
10	<400> 18	
	ggcgcgaccg aatcttccaa ttctacgcaa aaatttctct tcagatgaat cg	52
	<210> 19	
15	<211> 58	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido	
	<400> 19	
	gatcctgtta tgaatcacat gaaagcatgg aatcttatga acttaatccc ttcattgc	58
25	<210> 20	
	<211> 58	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 20	
	ggcgcgcaatg aagggattaa gttcataaga ttccatgctt tcatgtgatt cataacag	58
35	<210> 21	
	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 21	
45	gatcccagaa tgctgtgtcc tctgaagaaa ccaatgactt taaagc	46
	<210> 22	
	<211> 46	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
55	<400> 22	
	ggcgcgttta aagtcattgg ttcttcaga ggacacagca ttctgg	46
	<210> 23	
	<211> 64	
60	<212> ADN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
5	<400> 23	
	gatccggcag tagtgactca tccgaagaaa atggagatga cagttcagaa gaggaggagg	60
	aagc	64
10	<210> 24	
	<211> 64	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 24	
20	ggccgcttcc tctctctt ctgaactgtc atctccattt tcttcggatg agtcactact	60
	gccg	64
	<210> 25	
25	<211> 61	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> Oligonucleótido	
	<400> 25	
	gatcccgcaa aggattctac aagagaaagc agtgcaaacc ttcccgtggc cgcaagcgtg	60
35	c	61
	<210> 26	
	<211> 61	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
45	<400> 26	
	ggccgcacgc ttgcggccac gggaaggtt gcactgcttt ctctgtaga atcctttgcg	60
	g	61
50	<210> 27	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 27	
60	agtcgggatc cggaacaagc agcgtgttct ac	32

<210> 28
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 28
 10 agatcgcggc cgctcaattg tgcacggtgt gattaaagg 39
 <210> 29
 <211> 36
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 20 <400> 29
 ccggagatga cgatgacgat gacgatgacg atgact 36
 <210> 30
 <211> 36
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 30
 <400> 30
 tctactgcta ctgctactgc tactgctact gaggcc 36
 <210> 31
 35 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Fragmento humano de MEPE
 <400> 31
 Asp Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ser Asp
 1 5 10 15
 Gly Asp
 45 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Fragmento humano de estateterina
 <400> 32
 Asp Ser Ser Glu Glu Lys Phe Leu Arg Arg Ile Gly Arg Phe Gly
 1 5 10 15
 55

<210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Fragmento humano de MGP

 <400> 33
 Cys Tyr Glu Ser His Glu Ser Met Glu Ser Tyr Glu Leu Asn Pro Phe
 1 5 10 15
 10 Ile

 <210> 34
 <211> 13
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento humano de OPN
 20
 <400> 34
 Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu Glu Thr Asn Asp Phe Lys
 1 5 10

 <210> 35
 25 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Fragmento humano de BSP2

 <400> 35
 Gly Ser Ser Asp Ser Ser Glu Glu Asn Gly Asp Asp Ser Ser Glu Glu
 1 5 10 15

 Glu Glu

 35 <210> 36
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Fragmento humano de IGFBP5

 <400> 36
 Arg Lys Gly Phe Tyr Lys Arg Lys Gln Cys Lys Pro Ser Arg Gly Arg
 1 5 10 15

 Lys Arg
 45
 <210> 37
 <211> 151
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio de unión a colágeno de adhesina de colágeno de staphilococcus aureus M81736

5

<400> 37

Gly Thr Ser Ser Val Phe Tyr Tyr Lys Thr Gly Asp Met Leu Pro Glu
1 5 10 15

Asp Thr Thr His Val Arg Trp Phe Leu Asn Ile Asn Asn Glu Lys Ser
20 25 30

Tyr Val Ser Lys Asp Ile Thr Ile Lys Asp Gln Ile Gln Gly Gly Gln
35 40 45

Gln Leu Asp Leu Ser Thr Leu Asn Ile Asn Val Thr Gly Thr His Ser
50 55 60

Asn Tyr Tyr Ser Gly Gln Ser Ala Ile Thr Asp Phe Glu Lys Ala Phe
65 70 75 80

Pro Gly Ser Lys Ile Thr Val Asp Asn Thr Lys Asn Thr Ile Asp Val
85 90 95

Thr Ile Pro Gln Gly Tyr Gly Ser Tyr Asn Ser Phe Ser Ile Asn Tyr
100 105 110

Lys Thr Lys Ile Thr Asn Glu Gln Gln Lys Glu Phe Val Asn Asn Ser
115 120 125

Gln Ala Trp Tyr Gln Glu His Gly Lys Glu Glu Val Asn Gly Lys Ser
130 135 140

Phe Asn His Thr Val His Asn
145 150

<210> 38

10 <211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador de oligonucleótidos

<400> 38

cagtcaaggt ctcttatccg gaagtctcca agctaaacag g

41

20 <210> 39

<211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Cebador de oligonucleótidos

<400> 39

	ctgttttagct tggagacttc cggataagag accttgactg g	41
	<210> 40	
	<211> 25	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótidos	
10	<400> 40	
	gataaagcag gtcttggggt gcacc	25
	<210> 41	
15	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de oligonucleótidos	
	<400> 41	
	gttggcatct gtcacgggct tgtgg	25
25	<210> 42	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótidos	
	<400> 42	
	tggtaccacc atgatttcac cattcttagt ac	32
35	<210> 43	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótidos	
	<400> 43	
45	ttctagacta cgagctggca ggagcacagt ggccg	35
	<210> 44	
	<211> 65	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótidos	
55	<400> 44	
	ttctagacta gtcgtcatca tcgtcatcat cgtcgtcatc cgagctggca ggagcacagt	60
	ggccg	65

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
 - 5 a. Un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos como se presenta en la SEQ ID NO: 7;
 - b. Un polinucleótido codificante de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se presenta en la SEQ ID NO: 8;
 - c. Una secuencia de nucleótidos completamente complementaria con cualquiera de las secuencias de nucleótidos en a) o b); y
 - 10 d. Una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar en condiciones de rigurosidad elevada con la secuencia de nucleótidos en c), donde las condiciones de rigurosidad alta comprenden: prehibridación e hibridación en 6 x SSC, 5 x reactivo de Denhardt, SDS al 0,5 % y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 68 °C; y lavados en 2 x SSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente durante 10 min; en 2 x SSC y SDS al 0,1 % a temperatura ambiente durante 10 min; y en 0,1 x SSC y SDS al 0,5 % a 65 °C tres veces durante 5 min; donde dicha
 - 15 molécula de ácido nucleico codifica una fosfatasa alcalina soluble activa que comprende en el extremo C una secuencia de poliaspartato D_n, donde n=10 a 16.
-
2. Una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una secuencia de polinucleótidos codificante de la fosfatasa alcalina soluble activa que comprende en el extremo C una
 - 20 secuencia de poliaspartato D₁₀(sALP- D₁₀).
-
3. Un vector recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos aislada de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.
-
- 25 4. Una célula hospedadora recombinante que comprende el vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 3.
-
5. El vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, que es pCDNA3-RSV-sALP-D₁₀-NEO, donde dicho sALP-D₁₀ tiene la secuencia de nucleótidos como se presenta en SEQ ID NO: 7.
- 30 6. Una célula hospedadora recombinante que comprende el vector recombinante de la reivindicación 5, donde la célula hospedadora es una célula HEK293.
-
7. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido en b) es
- 35 la fosfatasa alcalina soluble que comprende en el extremo C una secuencia de poliaspartato D₁₀(sALP-D₁₀).
-
8. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1, donde la fosfatasa alcalina soluble activa disminuye los niveles de PPI extracelulares.
-
- 40 9. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1, donde la fosfatasa alcalina soluble activa es una fosfatasa alcalina biológicamente activa.

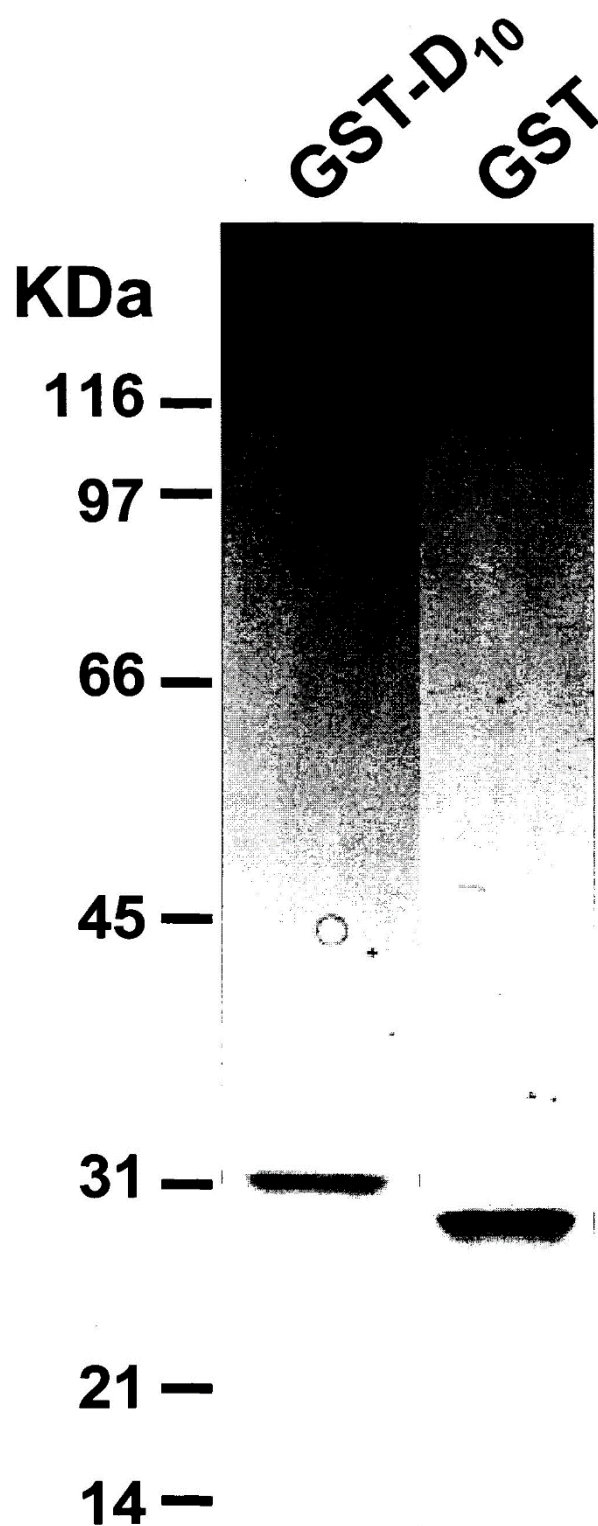


Figura 1

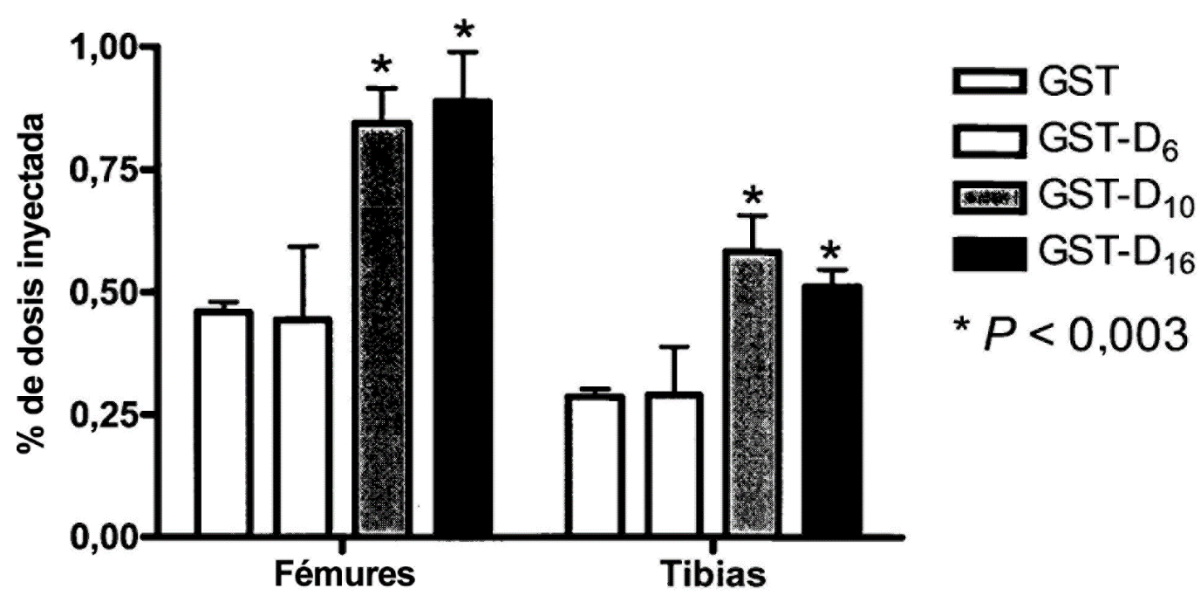


Figura 2

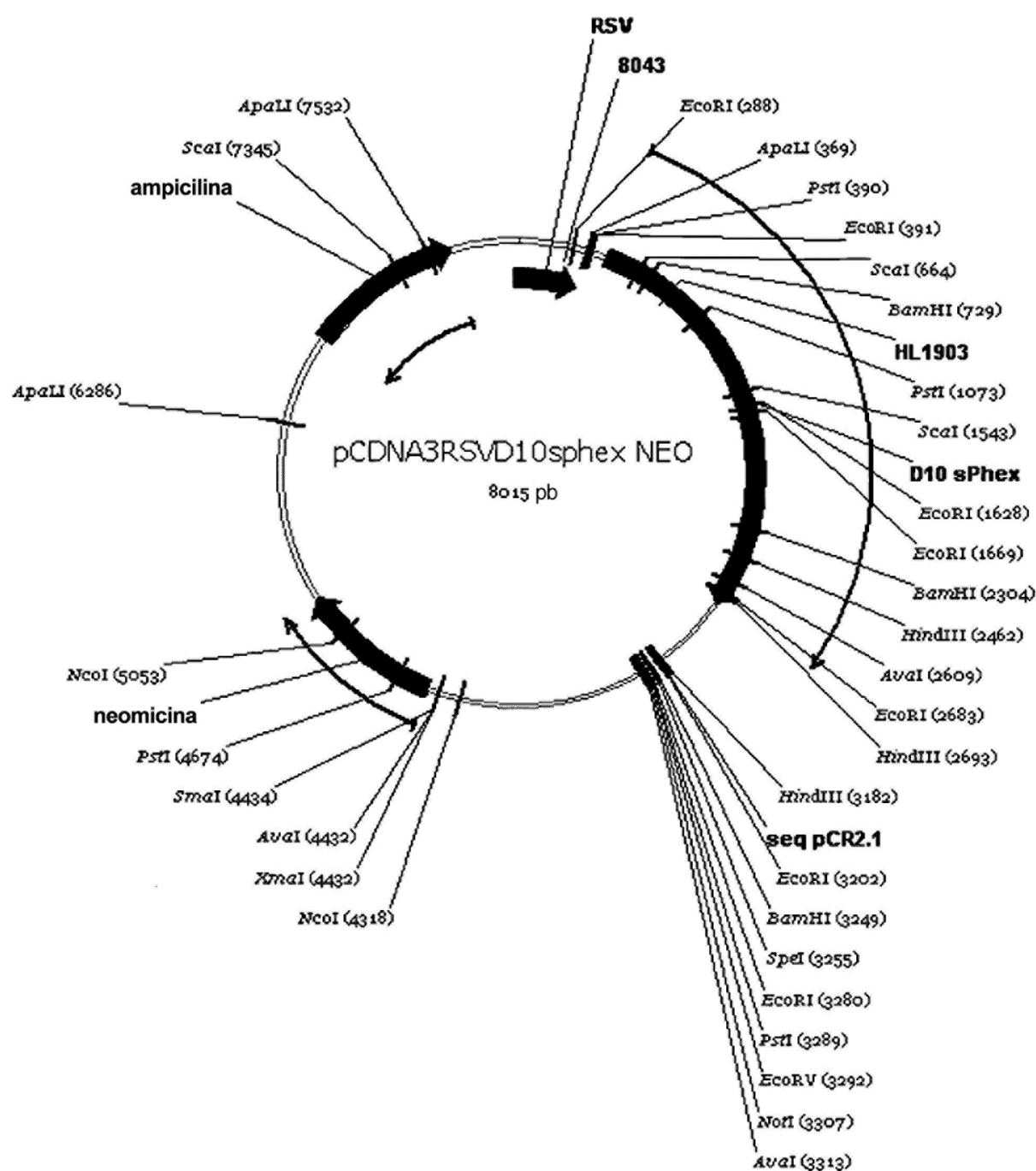


Figura 3

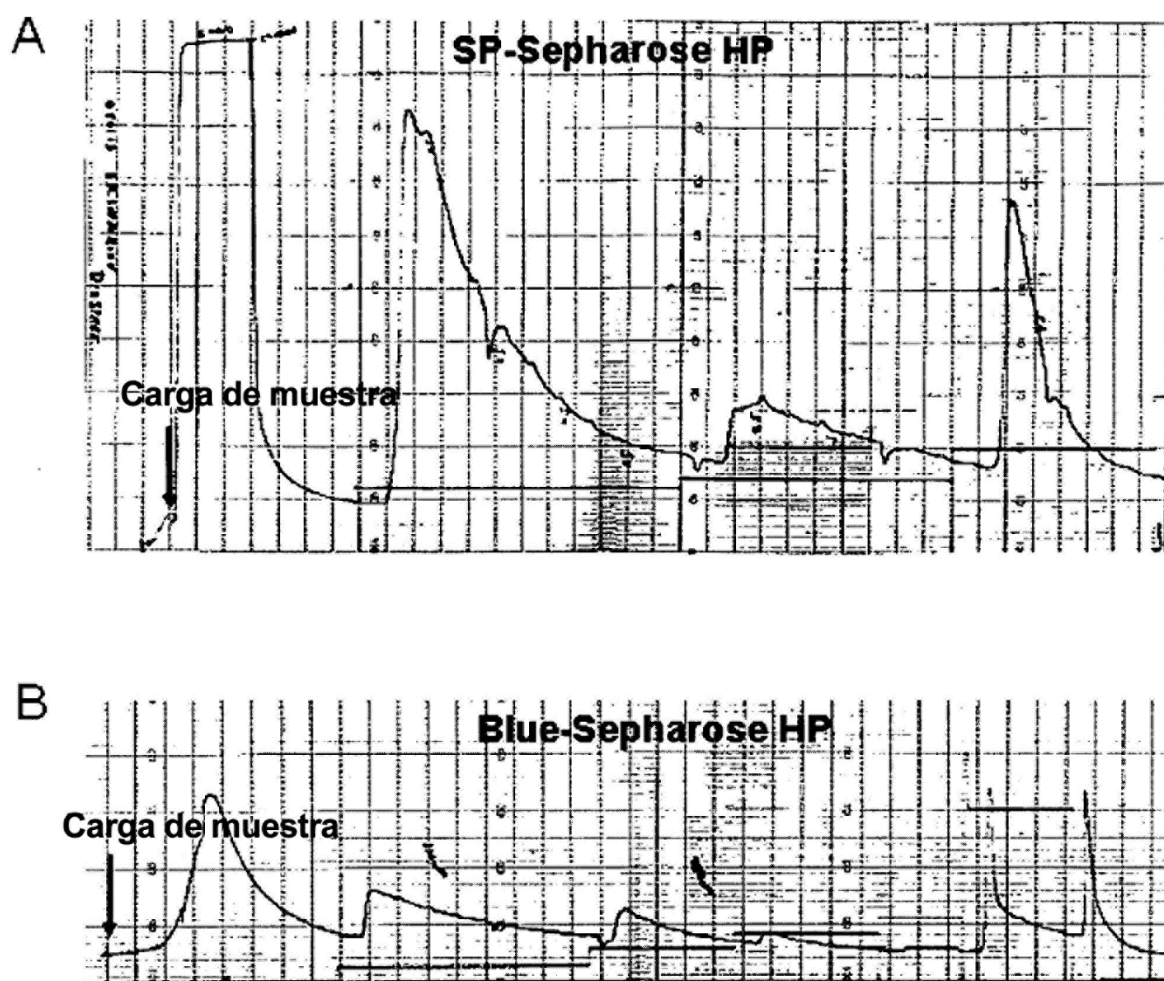


Figura 4

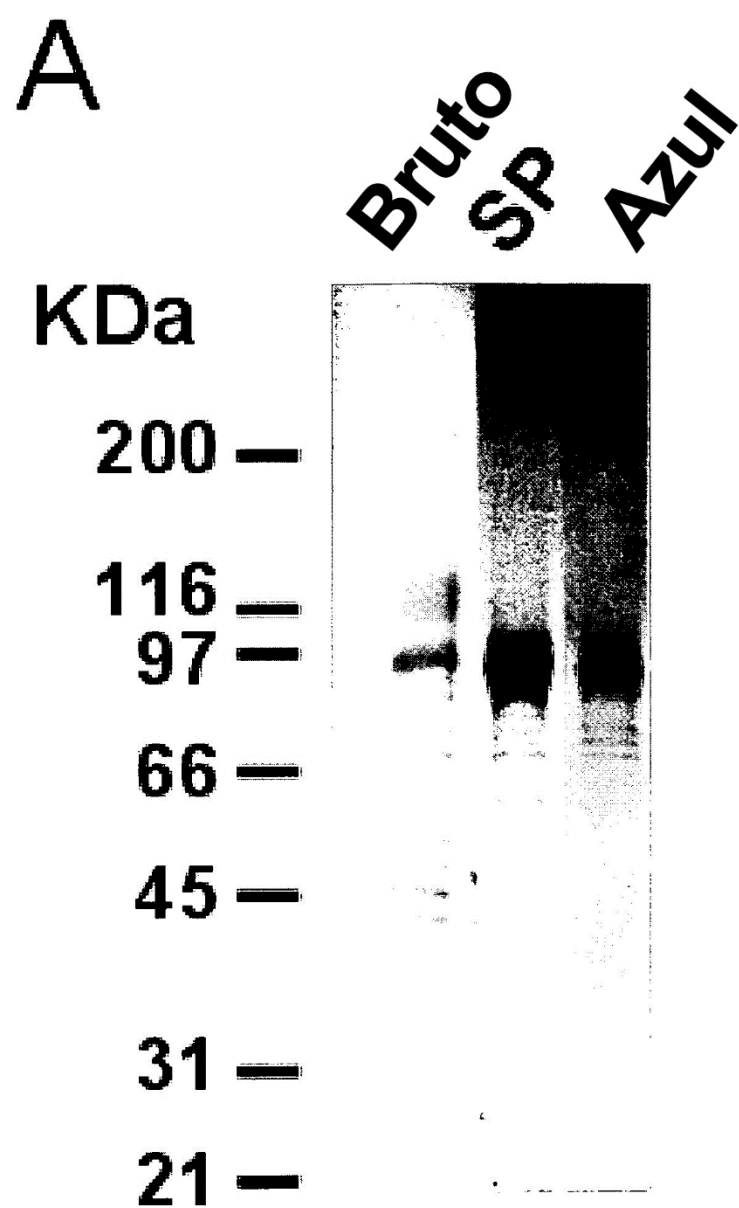


Figura 5

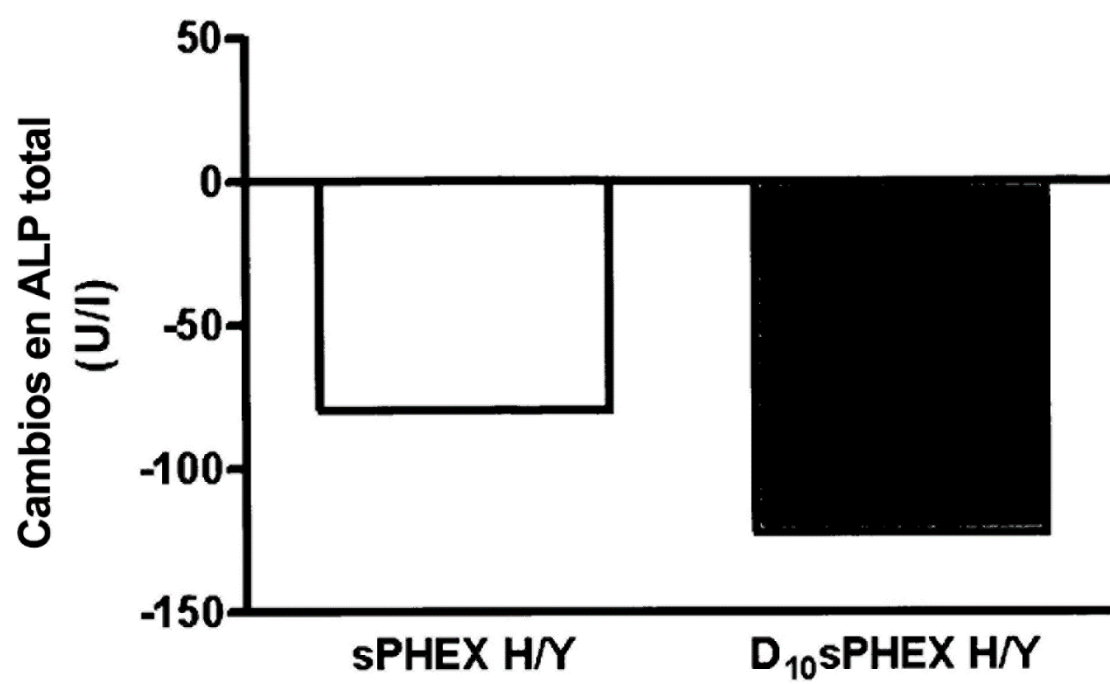


Figura 6

atggaagcagaaacagggagcagcgtggagactggaaagaaggccaacagaggcac
tcgaaattgccctgggtcgtgtttgtcctgacagtgatcgctcaacaaacaaccagtc
aaggtctcttatccggagatgacgatgacgatgacgatgactccggaagt
ctccaagctaaacaggagtagtgcctgaagccagaatgcatcgaagcggctgctgc
catcttaagtaaagtaaattctgtctgtggatccttgtgataatttcttccggttcg
cttgtgatggctggataagcaataatccaattcccgaagatatgccaagctatggg
gtttatccttggctgagacataatgttgacctcaagttgaaggaaacttttggagaa
atcaatcagtagaaggcgggacaccgaagccatacagaaagccaaaatcctttatt
catcctgcatgaatgagaaagcgattgaaaaagcagatgccaaagccactgctacac
atcctacggcattcacctttccgctggcccgctgcttgaatctaataattggccctga
aggggtttggctcagagagaaagttcagccttctgcagacacttgcaacgtttcgtg
gtcaatacagcaatttctgtgttcacccgtttgtatgtgtccctgatgacaaagca
tccaatgaacatatcttgaagctggaccaagcaacactctccctggccgtgagggga
agactaccttgataacagtacagaagccaagtttatcgggatgccctttacaagt
tcatgggtgatactgccgtgcttttaggagctaacagttccagagcagagcatgac
atgaagtcagtgctcagattggaaattaagatagctgagataatgattccacatga
aaaccgaaccagcagggccatgtacaacaaaatgaacatttctgaactgagtgtcta
tgattccccagttcgactggctgggctacatcaagaaggtcattgacaccagactc
tacccecatctgaaagacatcagccctccgagaatgtggtggtccgcgtcccgca
gtactttaaagatttgtttaggatattagggctctgagagaaagaagaccattgcc
actatttgggtgtggagaatggtttattccagaattccaaaccttagcaggcgcttt
cagtatagatggctggaattctcaagggtaatccaggggaccacaactttgctgcc
tcaatgggacaaatgtgtaaactttattgaaagtgccctcccttatgttgttggaa
agatgtttgtagatgtgtacttccaggaagataagaaggaaatgatggaggaattg
gttgagggcggttcgctgggcctttattgacatgctagagaaagaaaatgagtggat
ggatgcaggaacgaaaaggaaagccaaagaaaaggcgagagctgttttggcaaaag
ttggctatccagagtttataatgaatgatactcatgttaatgaagacctcaaagct
atcaagttttcagaagccgactactttggcaacgtcctacaaactcgcaagtattt
agcacagtctgatttcttctggctaagaaaagccgttccaaaaacagagtggttta
caaatccgacgactgtcaatgccttctacagtgcacccaccaaccagatccgattt
ccagcaggagagctccagaagcctttcttttggggaacagaatatcctcgatctct
gagttatgggtgctataggagtaattgtcggacatgaatttacacatggatttgata
ataatggtagaaaatatgataaaaatggaaacctggatccttgggtggtctactgaa
tcagaagaaaagtttaaggaaaaaacaatgcatgattaaccagtatagcaacta
ttattggaagaaagctggcttaaatgtcaaggggaagaggaccctgggagaaaata
ttgctgataatggaggcctgcgggaagcttttagggcttacaggaaatggataaat
gacagaaggcagggacttgaggagcctcttctaccaggcatcacattcaccaacaa
ccagctcttcttctctgagttatgctcatgtgaggtgcaattcctacagaccagaag
ctgcccagagaacaagtccaaattgggtgctcacagtccccctcagtttagggtaaat
gggtgcaattagtaactttgaagaattccagaaagcttttaactgtccaccaattc
cacgatgaacagaggcatggactcctgccgactctggtag

Figura 7

MEAETGSSVETGKKANRGTRIALVVFVLTVIAQQTTTSQGLLSGDDDDDDDDDDSGS
 LQAKQEYCLKPECIEAAAAILSKVNLSVDPCDNFFRFACDGWISNNPIPEDMPSYG
 VYPWLRHNVDLKLKELLEKSISRRTDEAIQKAKILYSSCMNEKAIEKADAKPLLH
 ILRHSPFRWPVLESNIGPEGVWSEKFSLLQTLATFRGQYSNSVFIRLYVSPDDKA
 SNEHILKLDQATLSLAVREDYLDNSTEAKSYRDALYKFMVDTAVLLGANSSRAEHD
 MKSVLRLEIKIAEIMIPHENRTSEAMYNKMNI SELSAMIPQFDWLGYIKKVIDTRL
 YPHLKDISPSENVVVRVPQYFKDLFRILGSEKKTIANYLWVRMVYSRI PNLSRRF
 QYRWLEFSRVIQGT TLLPQWDKCVNFIESALPYVVGKMFVDVYFQEDKKEMMEEL
 VEGVRWAFIDMLEKENEWMDAGTKRKAKEKARAVLAKVGYPEFIMNDTHVNEDLKA
 IKFSEADYFGNVLQTRKYLAQSDFFWLRKAVPKTEWFTNPTTVNAFY SASTNQIRF
 PAGELQKPFFWGTEYPRSLSYGAIGVIVGHEFTHGFDNNGRKYDKNGNLD PWWSTE
 SEEKFKEKTKCMINQYSNYYWKKAGLVKGKRTLGENIADNGGLREAFRAYRKWIN
 DRRQGLEEPLPGITFTNNQLFFLSYAHVRCNSYRPEAAREQVQIGAHSP PQFRVN
 GAISNFEEFQKAFNCPPNSTMNRGMDSCRLW

Figura 8

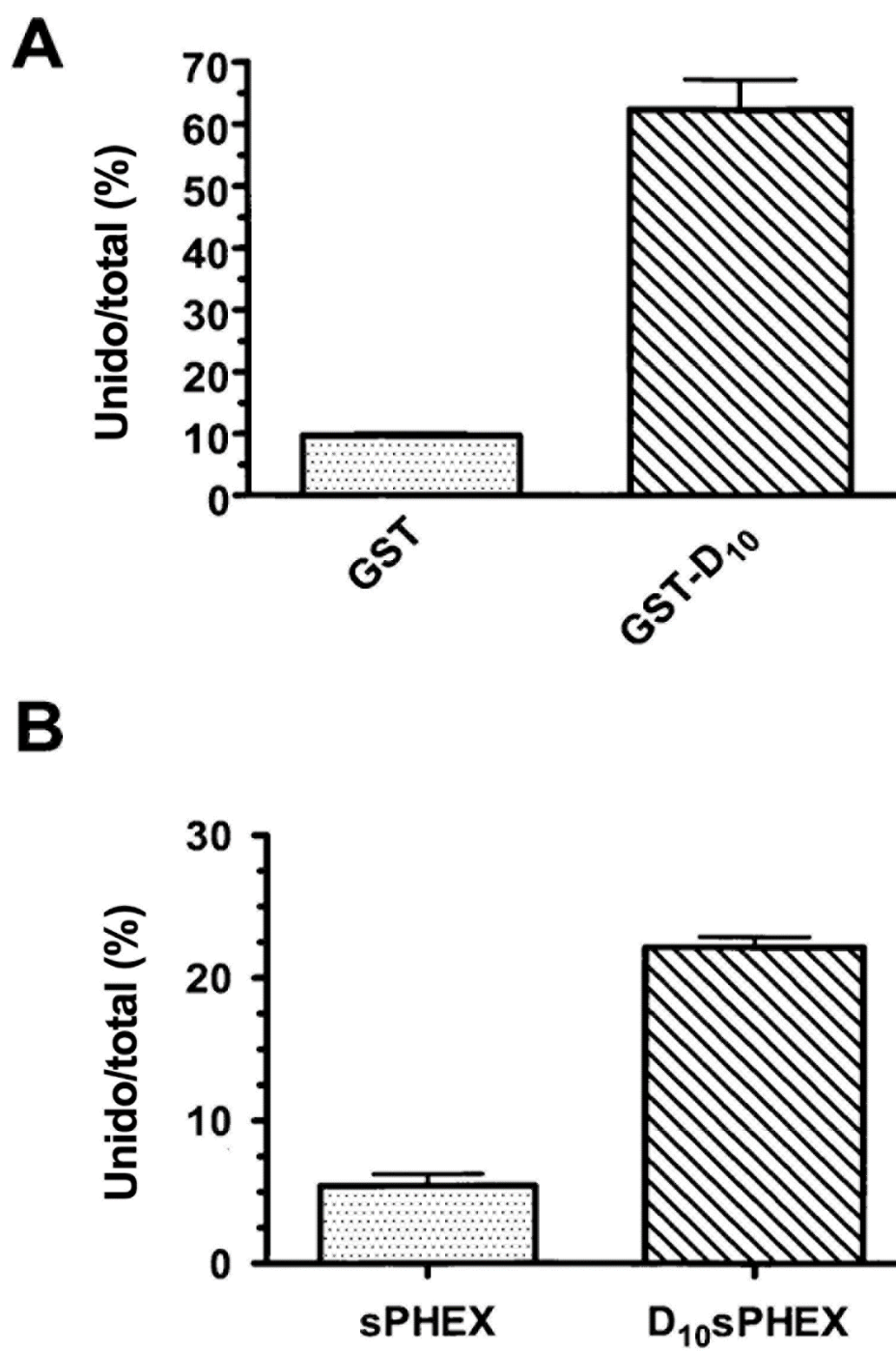


Figura 9

```

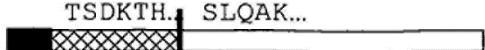
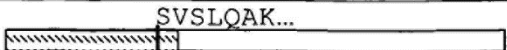
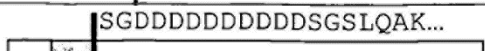
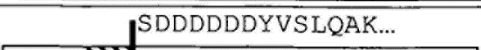
1   MEAETGSSVE TGKKANRGTR IALVVFVGGT LVLGTILFLV SQGLLSLQAK QEYCLKPECI
61  EAAAAILSKV NLSVDPCDNF FRFACDGWIS NNPIPEDMPS YGVYPWLRHN VDLKLKELLE
121 KSISRRRDTE AIQKAKILYS SCMNEKAIEK ADAKPLLHIL RHSPFRWPVL ESNIGPEGVW
181 SERKFSLLOT LATFRGQYSN SVFIRLYVSP DDKASNEHIL KLDQATLSLA VREDYLDNST
241 EAKSYRDALY KFMVDTAVLL GANSSRAEHD MKSVLRLEIK IAEIMIPHEN RTSEAMYNKM
301 NISELSAMIP QFDWLGYYKK VIDTRLYPHL KDISPSENVV VRVPQYFKDL FRILGSEKKK
361 TIANYLVWRM VYSRIPNLSR RFQYRWLEFS RVIQGTTLTLL PQWDKCVNFI ESALPYVVGK
421 MFVDVYFQED KKEMMEELVE GVRWAFIDML EKENEWMDAG TKRKAKEKAR AVLAKVGYPE
481 FIMNDTHVNE DLKAIKFSEA DYFGNVLQTR KYLAQSDFFW LRKAVPKTEW FTNPTTVNAF
541 YSASTNQIRF PAGELQKPFF WGTEYPRSL S YGAIGVIVGH EFTHGFDNNG RKYDKNGNLD
601 PWWSTESEEEK FKEKTKCMIN QYSNYYWKKA GLNVKGKRTL GENIADNGGL REAFRAYRKW
661 INDRRQGLEE PLLPGITFTN NQLFFLSYAH VRCNSYRPEA AREQVQIGAH SPPQFRVNGA
721 ISNSEEFQKA FNCPPNSTMN RGMDSCRLW

```

Figura 10

SGDDDDDDDDDDSGSLQAKQEYCLKPECIEAAAAILSKVNLSVDPCDNFFRFACDG
WISNNPIPEDMPSYGVYPWLRHNVDLKLKELLEKSISRRTDEAIQKAKILYSSCM
NEKAIEKADAKPLLHILRHSPFRWPVLESNIGPEGVWSERKFSLQLATFRGQYS
NSVFIRLYVSPDDKASNEHILKLDQATLSLAVREDYLDNSTEAKSYRDALYKFMVD
TAVLLGANSSRAEHDMKSVLRLLEIKIAEIMIPHENRTSEAMYNKMNISELSAMIPQ
FDWLGYIKKVIDTRLYPHLKDIPSENVVVRVPQYFKDLFRILGSEKKTIANYL
WRMVYSRIPNLSRRFQYRWLEFSRVIQGTTLTPQWDKCVNFIESALPYVVGKMFV
DVYFQEDKKEMMEELVEGVRWAFIDMLEKENEWMDAGTKRKAKEKARAVLAKVGYP
EFIMNDTHVNEDLKAIFSEADYFGNVLQTRKYLAQSDFFWLRKAVPKTEWFTNPT
TVNAFYASTNQIRFPAGELQKPFFWGTEYPRSLSYGAIGVIVGHEFTHGFDNNGR
KYDKNGNLDPWVSTEESEKFKKTKCMINQYSNYWKKAGLNVKGKRTLGENIADN
GGLREAFRAYRKWINDRRQGLEEPLLPGITFTNNQLFFLSYAHVRCNSYRPEAARE
QVQIGAHSPQFRVNGAISNFEEFQKAFNCPPNSTMNRGMDSCLW

Figura 11

	Construcción de proteína	Actividad específica (UAF/seg/μg)	Representación esquemática
1	sPHEX	12,3	
2	Fc-sPHEX	5,75	
3	pCDNA3-RSV-NL1 furina-sPHEX	N/A	
4	D ₁₀ sPHEX	12,0	
5	D ₆ sPHEX	8,55	

 : Representa el dominio transmembrana mutado de PHEX

 : Representa el péptido señal de IgG1 humano

 : Representa la bisagra de dominios de cadena pesada de IgG1 humano, CH2 y CH3

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

| : Sitio de escisión de furina

| : Sitio de escisión de señal de peptidasa

Figura 12

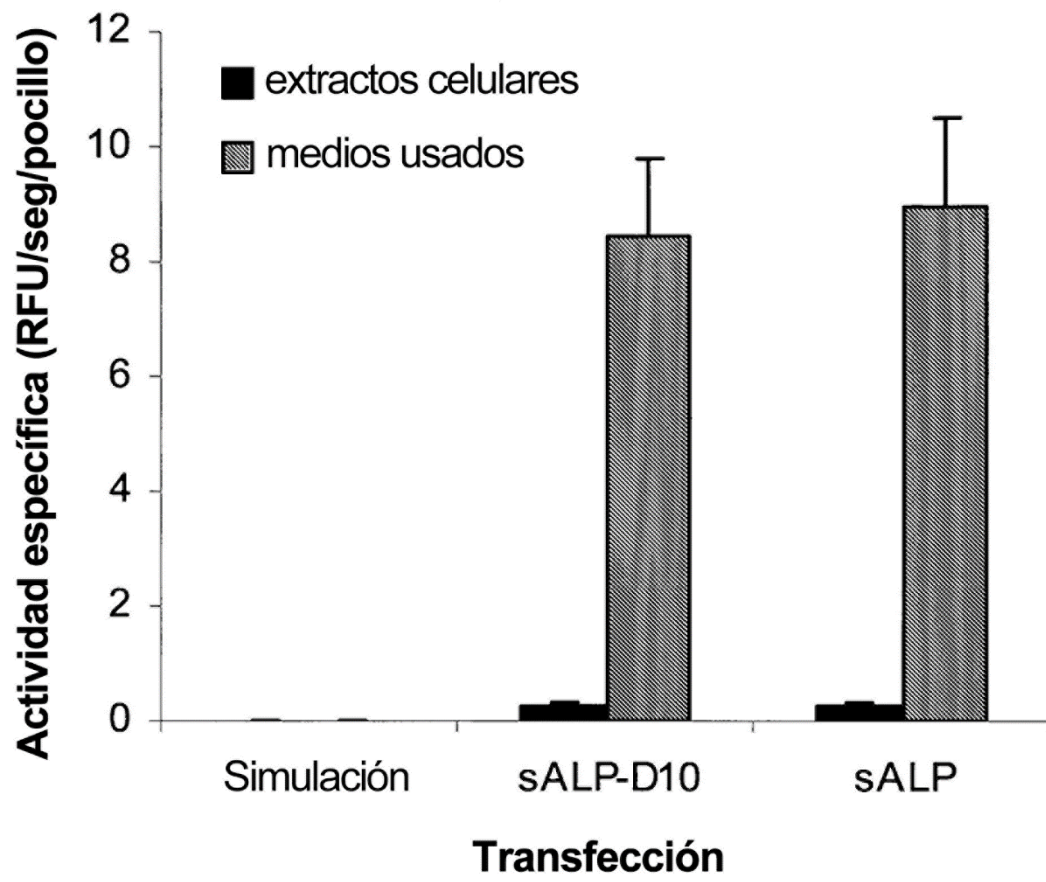


Figura 13

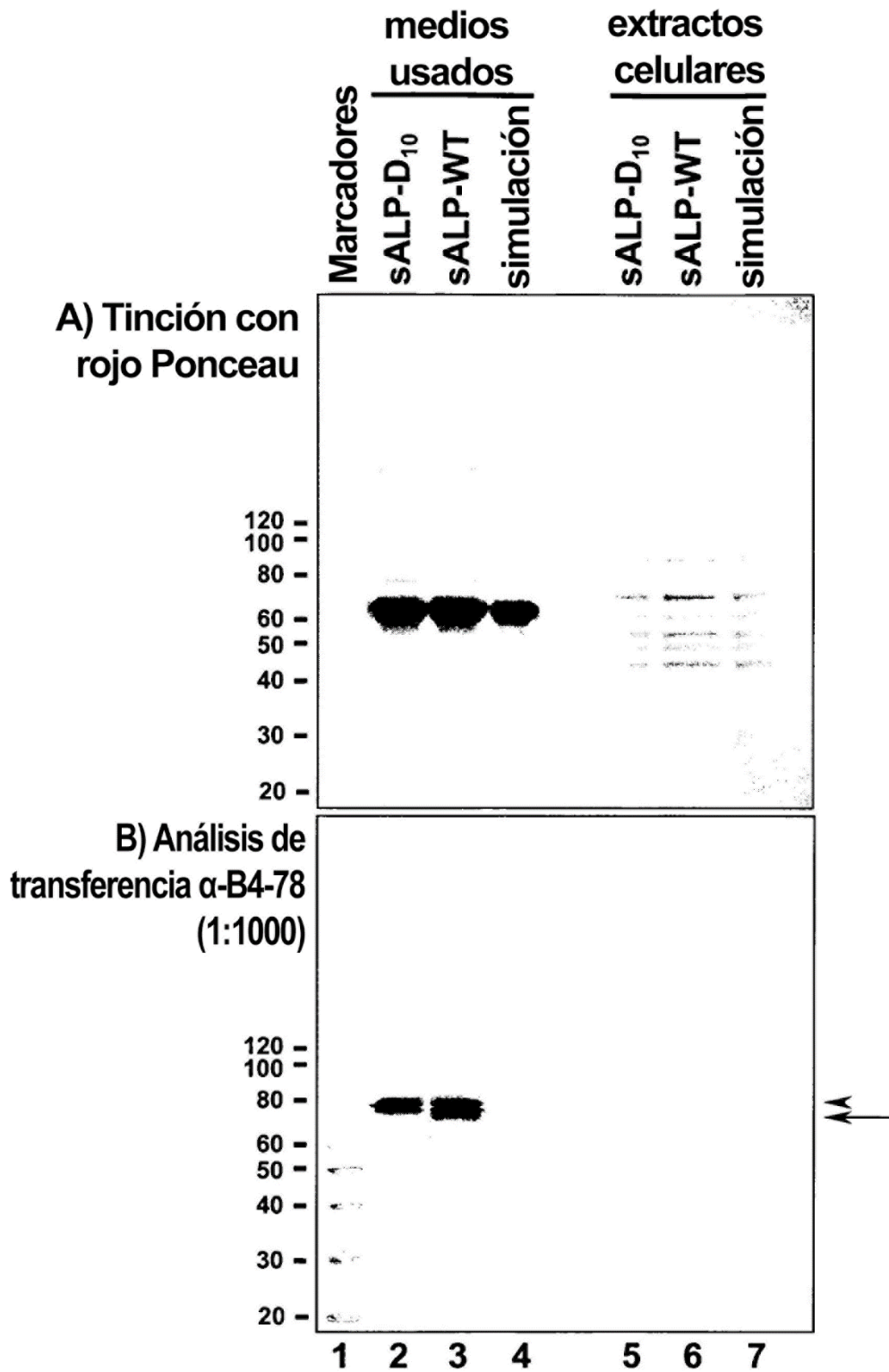


Figura 14

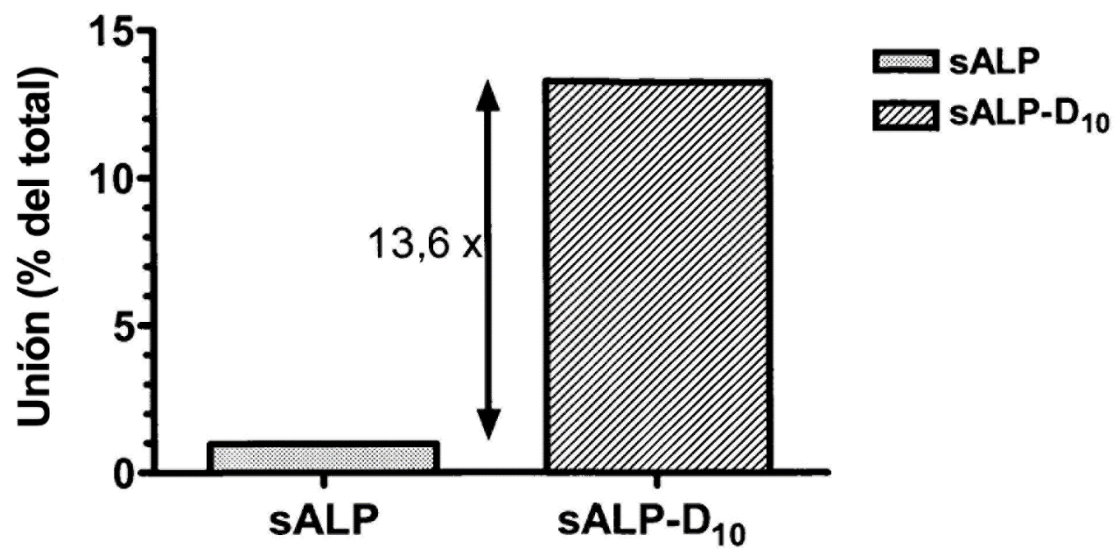


Figura 15

A

BamHI
~~~~~

```

1   GGATCCACCA TGATTTACCA ATTCTTAGTA CTGGCCATTG GCACCTGCCT TACTAACTCC TTAGTGCCAG
71  AGAAAGAGAA AGACCCCAAG TACTGGCGAG ACCAAGCGCA AGAGACACTG AAATATGCCC TGGAGCTTCA
141 GAAGCTCAAC ACCAACGTGG CTAAGAATGT CATCATGTTT CTGGGAGATG GGATGGGTGT CTCCACAGTG
211 ACGGCTGCCC GCATCCTCAA GGGTCAGCTC CACCACAACC CTGGGGAGGA GACCAGGCTG GAGATGGACA
281 AGTTCCTCTT CGTGGCCCTC TCCAAGACGT ACAACACCAA TGCCAGGTC CCTGACAGCG CCGGCACCGC
351 CACCGCCTAC CTGTGTGGGG TGAAGGCCAA TGAGGGCACC GTGGGGGTAA GCGCAGCCAC TGAGCGTTCC
421 CGGTGCAACA CCACCCAGGG GAACGAGGTC ACCTCCATCC TGGCTGGGC CAAGGACGCT GGGAAATCTG
491 TGGGCATTGT GACCACCACG AGAGTGAACC ATGCCACCCC CAGCGCCGCC TACGCCACT CGGCTGACCG
561 GGATGGTAC TCAGACAACG AGATGCCCCC TGAGGCCTTG AGCCAGGGCT GTAAGGACAT CGCCTACCAG
631 CTCATGCATA ACATCAGGGA CATTGACGTG ATCATGGGGG GTGGCCGGAA ATACATGTAC CCCAAGAATA
701 AAACTGATGT GGAGTATGAG AGTGACGAGA AAGCCAGGGG CACGAGGCTG GACGGCCTGG ACCTCGTTGA
771 CACCTGGAAG AGCTTCAAAC CGAGATACAA GCACTCCAC TTCATCTGGA ACCGCACGGA ACTCCTGACC
841 CTTGACCCCC ACAATGTGGA CTACCTATTG GGTCTCTTCG AGCCAGGGGA CATGCAGTAC GAGCTGAACA
911 GGAACAACGT GACGGACCCG TCACTCTCCG AGATGGTGGT GGTGGCCATC CAGATCCTGC GGAAGAACCC
981 CAAAGGCTTC TTCTTGCTGG TGGAAAGGAG CAGAAATTGAC CACGGGCACC ATGAAGGAAA AGCCAAGCAG
1051 GCCCTGCATG AGGCGGTGGA GATGGACCGG GCCATCGGGC AGGCAGGCAG CTTGACCTCC TCGGAAGACA
1121 CTCTGACCGT GGTCACTGCG GACCATTTCC ACGTCTTCAC ATTGGTGGA TACACCCCC GTGGCAACTC
1191 TATCTTTGGT CTGGCCCCCA TGCTGAGTGA CACAGACAAG AAGCCCTTCA CTGCCATCCT GTATGGCAAT
1261 GGGCCTGGCT ACAAGGTGGT GGGCGGTGAA CGAGAGAATG TCTCCATGGT GGACTATGCT CACAACAAC
1331 ACCAGGCGCA GTCTGCTGTG CCCCTGCGCC ACGAGACCCA CGGCGGGGAG GACGTGGCCG TCTTCTCAA
1401 GGGCCCCATG GCGCACCTGC TGCACGGCGT CCACGAGCAG AACTACGTCC CCCACGTGAT GCGGTATGCA
                                     XbaI
                                     ~~~~~
1471 GCCTGCATCG GGGCCAACCT CGGCCACTGT GCTCCTGCCA GCTCGTAGTC TAGA

```

B

```

1 MISPFVLAI GTCLTNSLVP EKEKDPKYWR DQAQETLKYA LELQKLNTNV
51 AKNVIMFLGD GMGVSTVTAA RILKGQLHHN PGEETRLEMD KFPFVALSKT
101 YNTNAQVPDS AGTATAYLCG VKANEGTVGV SAATERSRCN TTQGNEVTSI
151 LRWAKDAGKS VGIVTTTRVN HATPSAAYAH SADRDWYSDN EMPPEALSQG
201 CKDIAYQLMH NIRDIDVIMG GGRKYMYPKN KTDVEYESDE KARGTRLDGL
251 DLVDTWKSFK PRYKSHFIW NRTELLTLDP HNVLYLLGLF EPGDMQYELN
301 RNNVTDPSLS EMVVVAIQIL RKNPKGFFLL VEGGRIDHGH HEGKAKQALH
351 EAVEMDRAIG QAGSLTSSD TLTVVTADHS HVFTFGGYTP RGNSIFGLAP
401 MLSDDTKKPF TAILYNGPG YKVVGGEREN VSMVDYAHNN YQAQSAVPLR
451 HETHGGEDVA VFSKGPM AHL LHVHEQNYV PHVMAYAACI GANLGHCAPA
501 SS

```

Figura 16

A

BamHI  
~~~~~

```

1 GGATCCACCA TGATTTCACC ATTCTTAGTA CTGGCCATTG GCACCTGCCT TACTAACTCC TTAGTGCCAG
71 AGAAAGAGAA AGACCCCAAG TACTGGCGAG ACCAAGCGCA AGAGACACTG AAATATGCCC TGGAGCTTCA
141 GAAGCTCAAC ACCAACGTGG CTAAGAATGT CATCATGTTC CTGGGAGATG GGATGGGTGT CTCCACAGTG
211 ACGGCTGCCC GCATCCTCAA GGGTCAGCTC CACCACAACC CTGGGGAGGA GACCAGGCTG GAGATGGACA
281 AGTTCCCTTT CGTGGCCCTC TCCAAGACGT ACAACACCAA TGCCCAGGTC CCTGACAGCG CCGGCACCGC
351 CACCGCCTAC CTGTGTGGGG TGAAGGCCAA TGAGGGCACC GTGGGGGTAA GCGCAGCCAC TGAGCGTTCC
421 CGGTGCAACA CCACCCAGGG GAACGAGGTC ACCTCCATCC TGCCTGGGC CAAGGACGCT GGGAAATCTG
491 TGGGCATTGT GACCACCACG AGAGTGAACC ATGCCACCCC CAGCGCCGCC TACGCCCACT CGGCTGACCG
561 GGAATGGTAC TCAGACAACG AGATGCCCCC TGAGGCCTTG AGCCAGGGCT GTAAGGACAT CGCCTACCAG
631 CTCATGCATA ACATCAGGGA CATTGACGTG ATCATGGGGG GTGGCCGGAA ATACATGTAC CCAAGAATA
701 AAATGATGTG GGAGTATGAG AGTGACGAGA AAGCCAGGGG CACGAGGCTG GACGGCCTGG ACCTCGTTGA
771 CACCTGGAAG AGCTTCAAAC CGAGATACAA GCACTCCCAC TTCATCTGGA ACCGCACGGA ACTCCTGACC
841 CTTGACCCCC ACAATGTGGA CTACCTATTG GGTCTCTTCG AGCCAGGGGA CATGCAGTAC GAGCTGAACA
911 GGAACAACGT GACGGACCCG TCACTCTCCG AGATGGTGGT GGTGGCCATC CAGATCCTGC GGAAGAACCC
981 CAAAGGCTTC TTCTTGCTGG TGAAGGAGG CAGAATTGAC CACGGGCACC ATGAAGGAAA AGCCAAGCAG
1051 GCCCTGCATG AGGCGGTGGA GATGGACCGG GCCATCGGGC AGGCAGGCAG CTTGACCTCC TCGGAAGACA
1121 CTCTGACCGT GGTCACTGCG GACCAATCCC ACGTCTTCAC ATTTGGTGGA TACACCCCC GTGGCAACTC
1191 TATCTTTGGT CTGGCCCCCA TGCTGAGTGA CACAGACAAG AAGCCCTTCA CTGCCATCCT GTATGGCAAT
1261 GGGCTTGGCT ACAAGGTGGT GGGCGGTGAA CGAGAGAATG TCTCATGGT GGACTATGCT CACAACAAC
1331 ACCAGGCGCA GTCTGTGTG CCCCTGCGCC ACAGACCCA CGGCGGGGAG GACGTGGCCG TCTTCTCCAA
1401 GGGCCCCATG GCGCACCTGC TGCACGGCGT CCACGAGCAG AACTACGTCC CCCACGTGAT GCGGTATGCA
1471 GCCTGCATCG GGGCCAACCT CGGCCACTGT GCTCCTGCCA GCTCGGATGA CGACGATGAT GACGATGATG

```

XbaI  
~~~~~

```

1541 ACGACTAGTC TAGA

```

B

```

1 MISPFVLAI GTCLTNSLVP EKEKDPKYWR DQAQETLKYA LELQKLNTNV
51 AKNVIMFLGD GMGVSTVTAA RILKGQLHHN PGEETRLEMD KFPFVALSKT
101 YNTNAQVPDS AGTATAYLCG VKANEGTVGV SAATERSRCN TTQGNEVTSI
151 LRWAKDAGKS VGIVTTTRVN HATPSAAYAH SADRWDYSDN EMPPEALSQG
201 CKDIAYQLMH NIRDIDVIMG GGRKMYMPKN KTDVEYESDE KARGTRLDGL
251 DLVDTWKSFK PRYKSHFIW NRTELLTLDP HNVLYLLGLF EPGDMQYELN
301 RNNVTDPSLS EMVVVAIQIL RKNPKGFLL VEGGRIDHGH HEGKAKQALH
351 EAVEMDRAIG QAGSLTSSD TLTVVTADHS HVFTFGGYTP RGNSIFGLAP
401 MLSDTDKPPF TAILYGNPG YKVVGEREN VSMVDYAHNN YQAQSAVPLR
451 HETHGGEDVA VFSKGPM AHL LHVHEQNYV PHVMAYAACI GANLGHCAPA
501 SSDDDDDDDD DD

```

Figura 17

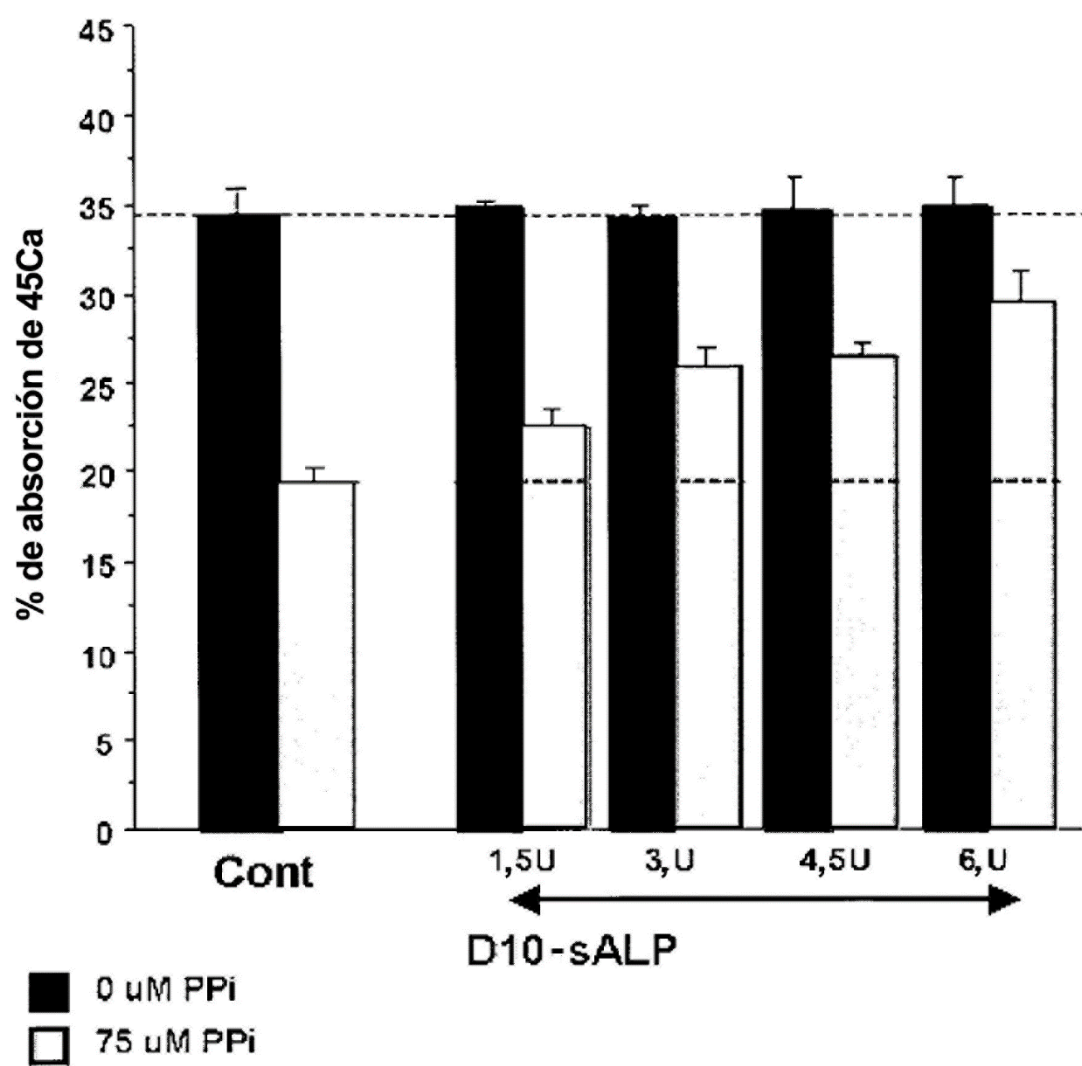


Figura 18