

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 526**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2011** **PCT/US2011/051858**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012** **WO12125182**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2011** **E 11861101 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018** **EP 2683742**

54 Título: **Proteínas de fusión NPP1**

30 Prioridad:

11.03.2011 WO PCT/US2011/028233

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2019

73 Titular/es:

ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
100 College Street
New Haven, CT 06510, US

72 Inventor/es:

QUINN, ANTHONY;
HARVEY, ALEX J. y
XIA, ZHINAN

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 716 526 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión NPP1

5 ANTECEDENTES

- [0001]** La ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 (NPP1/ENPP1/PC-1) es una glicoproteína transmembrana de tipo II que forma un homodímero. La proteína escinde una variedad de sustratos, incluyendo las uniones de fosfodiésteres de nucleótidos y azúcares nucleótidos, y las uniones de pirofosfatos de nucleótidos y azúcares nucleótidos. La función de la proteína NPP1 es hidrolizar el nucleósido 5' trifosfato en los monofosfatos correspondientes y también hidrolizar los polifosfatos de diadenosina. Las mutaciones en el gen NPP1 han sido asociadas a la calcificación arterial idiopática de la infancia (IIAC), la resistencia a la insulina, el raquitismo hipofosfatémico y la osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna vertebral.
- 15 **[0002]** La IIAC, un raro trastorno autosómico recesivo y casi siempre fatal, se caracteriza por la calcificación de la lámina elástica interna de las arterias musculares y la estenosis debido a la proliferación mioíntimal. Existen más de 160 casos de IIAC reportados alrededor del mundo. Los síntomas de la enfermedad aparecen más a menudo en la infancia temprana y, desde los 6 meses de edad, la enfermedad es letal, generalmente a causa de una cardiomiopatía isquémica y otras complicaciones de arteriopatías obstructivas, incluyendo la estenosis arterial renal. En más de una docena de casos de IIAC reportados, las calcificaciones periarticulares de grandes articulaciones también se desarrollaron en la infancia. Rutsch y col. (2003) informaron que las mutaciones en ENPP1 se asocian con la IIAC caracterizada por las calcificaciones aórticas y periarticulares espontáneas en la vida temprana y la disminución sistemática de la actividad de nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa en las personas afectadas.
- 25 **[0003]** Johnson y col. (Journal of Bone and Mineral Research, 2003, 18(6): 994-1004) informaron que tanto la deficiencia de osteopontina (OPN) promovida por deficiencia de PP_i extracelular como la corrección de la deficiencia de OPN evitan que haya una hipercalcificación. Este documento no contiene ninguna enseñanza para el uso de moléculas de OPN o NPP1 solubles con fines terapéuticos.
- 30 **[0004]** Schmidt (Current Opinion in Drug Discovery & Development 2009, 12(2): 1-12) y Huang (Current Opinion in Biotechnology 2009, 20:692-699) analizan las proteínas de fusión, *p. ej.*, las proteínas de fusión Fc aprobadas para su uso en la clínica y aquellas que se encuentran actualmente en ensayos clínicos.
- [0005]** Si bien los defectos de la proteína NPP1 han sido implicados en una enfermedad tan grave como es el caso de la IIAC, no hay ningún tratamiento disponible en la técnica para aquellos afectados por la condición. Por lo tanto, se necesita urgentemente una composición, formulación y medicamento efectivos y seguros para el tratamiento de la IIAC, la resistencia a la insulina, el raquitismo hipofosfatémico y la osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna vertebral.

40 RESUMEN

- [0006]** La presente invención y las realizaciones preferidas de la misma se describen en las reivindicaciones adjuntas. De manera más general, esta descripción se refiere a las proteínas de fusión de los dominios truncados de NPP1 (es decir, un componente NPP1) fusionado a un grupo diana. La función del grupo diana es mejorar la efectividad de la focalización de la proteína de fusión NPP1 en la importancia clínica o biológica de un sitio (*p. ej.*, el área de calcificación en un sujeto que necesita disminuir dicha calcificación). Sin desear limitar la descripción a cualquier teoría o mecanismo de operación particular, se cree que el componente NPP1 puede inhibir la calcificación a través de la mejora de la formación de pirofosfatos (PP_i) y/o la escisión del pirofosfato a fin de producir fosfatos solubles (P_i) y/o aumentar la disponibilidad de monofosfato de adenosina (AMP) y/o adenosina. Se contempla que el grupo diana puede adjuntarse al extremo N y/o C del componente NPP1 en cualquier posición útil. De manera adicional, la proteína de fusión NPP1 descrita en esta invención también puede incluir uno o más fragmentos Fc, PEG, un ligador polipeptídico u otros polipéptidos adicionales a fin de mejorar la actividad enzimática, la estabilidad y la focalización.
- [0007]** Las proteínas de fusión de la descripción pueden usarse para tratar una amplia variedad de condiciones en un sujeto. Cualquier condición que pueda tratarse de manera beneficiosa mediante la administración de una proteína de fusión se incluye dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, dicho alcance comprende el tratamiento de condiciones que pueden mejorar a través de la reducción y/o eliminación de una o más estructuras de calcificación y/o la prevención de la formación de estructuras de calcificación en un sujeto tal como un mamífero, por ejemplo, un paciente humano. Para el tratamiento mediante el empleo de las proteínas de fusión de la invención, se contemplan condiciones tales como el bloqueo arterial. En una realización particularmente útil, la condición a tratar es la calcificación arterial generalizada de la infancia, también conocida como calcificación arterial idiopática de la infancia y calcificación de medios arteriales de la infancia. Para el tratamiento mediante el empleo de las proteínas de fusión de la invención, también se contemplan condiciones tales como la resistencia a la insulina, el raquitismo hipofosfatémico y la osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna vertebral.

[0008] Las proteínas de fusión de la descripción pueden producirse en cualquier sistema de expresión de proteínas útil, incluyendo, entre otros, un cultivo celular (*p. ej.*, células CHO, células COS, HEK203), bacterias como la *Escherichia coli* (*E. Coli*) y animales transgénicos, incluyendo, entre otros, mamíferos y aves (*p. ej.*, pollos, codornices, patos y pavos).

5

[0009] La fabricación de composiciones farmacéuticas (o formulaciones farmacéuticas) es conocida en la técnica y las mismas son contempladas para su uso según las proteínas de fusión de la descripción.

[0010] En general, la dosis de proteínas de fusión que se administrará a un sujeto variará dependiendo de factores conocidos, como edad, salud y peso del receptor, el tipo de tratamiento simultáneo, frecuencia de tratamiento, y similares. Normalmente, una dosis de ingrediente activo (es decir, la proteína de fusión) puede estar entre aproximadamente 0,0001 y 50 miligramos por kilogramo de peso corporal. La dosis precisa, frecuencia de administración y período de tiempo de tratamiento pueden ser determinados por un médico experto en la materia de administración de proteínas terapéuticas.

10
15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0011]

20 La Fig. 1 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína NPP1 de tipo salvaje. Las regiones citosólicas y transmembrana están subrayadas. Los sitios de N-glicosilación potencial están en negrita. PSCAKE en cursiva es el inicio de la NPP1 soluble, que incluye la región rica en cisteína.

La Fig. 2 ilustra la secuencia de aminoácidos del dominio(s) catalítico(s) de la proteína NPP1 sin grupo diana unido ("sssNPP1").

25

La Fig. 3 ilustra la secuencia de aminoácidos de la TAGsssNPP1. El grupo diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos se fusiona al extremo N de la sssNPP1. El péptido señal está subrayado y el grupo diana está indicado en negrita.

30

La Fig. 4 ilustra la secuencia de aminoácidos de TAGsssNP1 que contiene el grupo diana de diez residuos de ácido aspártico consecutivos fusionados al extremo C de la sssNPP1. El péptido señal está subrayado y el grupo diana está indicado en negrita.

35 La Fig. 5 ilustra la secuencia de ácidos nucleicos de la proteína de fusión TAGssNPP1. El grupo diana de ocho residuos ácidos aspárticos consecutivos se fusiona al extremo N de la ssNPP1.

La Fig. 6 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión TAGssNPP1. El grupo diana de ocho residuos ácidos aspárticos consecutivos se fusiona al extremo N de la ssNPP1. El péptido señal está subrayado y el grupo diana está indicado en negrita.

40

La Fig. 7 ilustra la secuencia de ácidos nucleicos de la ssNPP1.

La Fig. 8 ilustra la secuencia de aminoácidos de la ssNPP1. El péptido señal está subrayado.

45

La Fig. 9 ilustra la secuencia de ácidos nucleicos de sNPP1.

La Fig. 10 ilustra la secuencia de aminoácidos de la sNPP1. El péptido señal está subrayado.

50 La Fig. 11 ilustra la secuencia de ácidos nucleicos de la TAGsNPP1. El grupo diana de ocho residuos ácidos aspárticos consecutivos se fusiona al extremo N de la sNPP1.

La Fig. 12 ilustra la secuencia de aminoácidos de la TAGsNPP1. El grupo diana de ocho residuos ácidos aspárticos consecutivos se fusiona al extremo N de la ssNPP1. El péptido señal está subrayado y el grupo diana está indicado en negrita.

55

La Fig. 13 ilustra la secuencia de ácidos nucleicos de la TAGsNPP1. El grupo diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos se fusiona al extremo C de la sNPP1.

60 La Fig. 14 ilustra la secuencia de aminoácidos de la TAGsNPP1. El grupo diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos se fusiona al extremo N de la sNPP1. El péptido señal está subrayado y el grupo diana está indicado en negrita.

La Fig. 15 ilustra la secuencia de aminoácidos de un péptido ligador.

65

La Fig. 16 ilustra la secuencia de aminoácidos de un segmento de inmunoglobulina Fc.

La Fig. 17 ilustra la secuencia de aminoácidos de TAGssNP1 que contiene el grupo diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos fusionados al extremo N de la sssNP1 por medio de un péptido ligador. El segmento Fc se fusiona al extremo N del grupo diana. El péptido señal está subrayado y el grupo diana está indicado en negrita. El péptido ligador está en cursiva.

La Fig. 18 ilustra la secuencia de aminoácidos de TAGssNP1 que contiene el grupo diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos fusionados al extremo C de la sssNP1 por medio de un péptido ligador. El segmento Fc se fusiona al extremo N de la sssNP1. El péptido señal está subrayado y el grupo diana está indicado en negrita. El péptido ligador está en cursiva.

La Fig. 19 es una representación esquemática de un vector de expresión (es decir, pTT22) que contiene un constructo de la TAGsNP1. El grupo diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos se fusiona al extremo C de la sNP1.

La Fig. 20 ilustra el análisis Western blot de la TAGsNP1. Condición en reducción; NR: condición sin reducción.

La Fig. 21 demuestra la actividad enzimática de la TAGsNP1 producida y aislada de células HEK293.

Las Fig. 22A-22C ilustran los esquemas de los constructos de la proteína de fusión TAGNP1 descrita en esta invención.

La Fig. 23 demuestra los niveles de calcificación de las células del músculo liso aórtico humano tratadas con sNP1 (WT) soluble, TAGsNP1 (D8 fusionadas al extremo C de sNP1), y sNP1-Fc.

La Fig. 24 muestra una representación esquemática de un vector de expresión (es decir, pTT22) que contiene un constructo de la TAGsNP1. El grupo diana de ocho residuos de ácido aspártico consecutivos (D8) fusionado al extremo C de la sNP1.

La Fig. 25 muestra la secuencia de ácidos nucleicos de una proteína de fusión TAGsNP1.

La Fig. 26 muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión TAGsNP1.

La Fig. 27 muestra una representación esquemática de un vector de expresión (es decir, pTT22) que contiene un constructo de fusión de la sNP1-Fc.

La Fig. 28 muestra la secuencia de ácidos nucleicos de una proteína de fusión sNP1-Fc.

La Fig. 29 muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión sNP1-Fc.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0012] La presente descripción proporciona proteínas de fusión NPP1 humanas innovadoras que son solubles y contienen uno (o varios) dominios biológicamente activos y truncados de NPP1 (es decir, componentes de NPP1 que contienen al menos un dominio catalítico extracelular de NPP1 de ocurrencia natural para la actividad de pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa) y uno o más grupos diana (es decir, "TAG"). Las proteínas de fusión NPP1 de la presente descripción comprenden al menos el dominio NPP1 esencial para llevar a cabo la actividad de la pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa. Por consiguiente, la descripción presenta proteínas de fusión aisladas que comprenden los residuos de aminoácidos A205 a L591 de la SEQ ID NO:1 fusionadas a uno o más grupos diana. El grupo diana puede fusionarse de manera recombinante o unirse químicamente (*p. ej.*, unión covalente, iónica, hidrofóbica y fuerza de Van der Waals) al componente NPP1 por medio de procedimientos conocidos en la técnica y dirigir el componente NPP1 a un determinado sitio objetivo donde el componente NPP1 unido tendrá un efecto deseable (*p. ej.*, catálisis de una reacción tal como solubilizar un sustrato, como PPI, o prevenir la formación de un sustrato, como PPI) en un sujeto al que se administra la proteína de fusión de la presente descripción.

Las TAGNP1

[0013] Todas las proteínas de fusión NPP1 ("TAGNP1") de la presente descripción presentan los dominios transmembrana y citosólicos del extremo N de la NPP1 humana de ocurrencia natural que fue eliminada. De manera opcional, las proteínas de fusión TAGNP1 de la presente descripción también pueden contener una truncación del extremo C de la NPP1 de tipo salvaje en varias longitudes. La secuencia de aminoácidos de toda la NPP1 de tipo salvaje se especifica en la SEQ ID NO:1.

[0014] En un caso, la proteína de fusión contiene un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos

A205 a L591 de la SEQ ID NO:1 ("sssNPP1") fusionados a un TAG ya sea en el extremo N o C del polipéptido ("TAGsssNPP1"). En un caso, la proteína de fusión comprende un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos A205 a D925 de la SEQ ID NO:1 ("ssNPP1") fusionados a un TAG ya sea en el extremo N o C ("TAGssNPP1"). En un caso, la proteína de fusión comprende un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos P99 a D925 de la SEQ ID NO:1 ("sNPP1") fusionados a un TAG ya sea en el extremo N o C del polipéptido ("TAGsNPP1"). En esta invención también se describe cualquier fragmento consecutivo de sNPP1 que comprende al menos los residuos de aminoácidos A205 a L591 de la SEQ ID NO:1 y el fragmento polipeptídico se fusiona a un TAG ya sea en el extremo N o C.

- 10 **[0015]** Cuando se expresan en un cultivo celular o animal transgénico, las proteínas de fusión TAGNPP1 además pueden comprender un péptido señal (o secuencia líder) en su extremo N. El péptido señal dirige, de manera conjunta y posterior a la traducción, el transporte de las proteínas de fusión TAGNPP1 a través de las organelas subcelulares de la célula que expresa las proteínas de fusión TAGNPP1, determinando de ese modo la modificación posterior a la traducción de las proteínas de fusión TAGNPP1. Debe entenderse eso porque el péptido señal se escinde en la etapa conjunta o posterior a la traducción de la proteína de fusión. Las proteínas de fusión TAGNPP1 generalmente carecen del péptido señal una vez que este ha sido secretado y aislado. Por consiguiente, en los casos que se dirigen a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión TAGNPP1 que se describen, también se contemplan las secuencias líderes, tal como se usan en la presente descripción. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos especificada en la SEQ ID NO:2 contiene un ejemplo de la secuencia líder para TAGNPP1 en su extremo 5'.

- [0016]** Cada una de las proteínas de fusión descritas en esta invención se contempla con uno o más grupos diana ("TAG"). El componente TAG, según la presente descripción, comprende cuatro o más aminoácidos con carga negativa, como el ácido aspártico y el ácido glutámico. El componente TAG puede ser una extensión de residuos de aminoácidos con carga negativa, por ejemplo, ácidos aspárticos y/o ácidos glutámicos que presentan aproximadamente entre 4 y 20 residuos de aminoácidos de longitud. El TAG puede fusionarse al extremo N o C del componente NPP1. El TAG también puede fusionarse a los extremos N y C del componente NPP1. Por consiguiente, la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión TAGsNPP1, por ejemplo, incluye PSCAKE a través del extremo C del componente NPP1 y uno o más grupos diana (*p. ej.*, un marcador de ácido poliglutámico o un marcador de ácido poliaspártico) en el extremo N y/o C del componente NPP1. La proteína de fusión que comprende el componente NPP1 que presenta el TAG fusionado al extremo C es un caso particularmente útil. En un caso muy específico, el TAG que presenta una extensión de ocho ácidos aspárticos se emplea tal como se puede ver en las secuencias ejemplares para la TAGsNPP1 y la TAGssNPP1 en las Figuras, aunque cualquier número útil de residuos de aminoácidos con carga negativa (*p. ej.*, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18) puede usarse conforme a la descripción. El componente TAG se indica como "A" en las Figuras.

- [0017]** La descripción también abarca polinucleótidos que codifican varias proteínas de fusión TAGNPP1 descritas en esta invención. Por consiguiente, cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifique la secuencia de aminoácidos de cualquier proteína de fusión TAGNPP1 puede usarse para generar moléculas recombinantes que expresen la proteína de fusión TAGNPP1 correspondiente. En un caso particular, la descripción abarca el polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:2, como se muestra en la FIG. 2.

- [0018]** Dentro de ciertos casos específicos, la proteína de fusión comprende múltiples polipéptidos, tal como se describe en esta invención, o al menos comprende un polipéptido, tal como se describe en esta invención, y una secuencia no relacionada. Ciertos polipéptidos preferidos pueden, por ejemplo, colaborar con la dimerización y estabilidad o minimizar la agregación de las proteínas de fusión. Por ejemplo, el polipéptido adicional puede ser la región Fc de la inmunoglobulina G1 para aumentar la estabilidad en el suero. El uso del segmento Fc es conocido en la técnica y se describe en la Patente de EE.UU. N.º 7.902.151 y la Patente de EE.UU. N.º 7.858.297. La región rica en cisteína de la NPP1 de tipo salvaje (es decir, PSCAKE hasta NEPQCP; la secuencia de aminoácidos desde P99 a P204 de la SEQ ID NO:1) puede emplearse a fin de facilitar la dimerización de las proteínas de fusión TAGNPP1.

- [0019]** En otro caso, el polietilenglicol (PEG) puede conjugarse con las proteínas de fusión TAGNPP1. Es posible seleccionar otros polipéptidos a fin de minimizar la agregación e inmunogenicidad, para aumentar la solubilidad de la proteína o permitir que la proteína sea focalizada para sitios deseados con importancia clínica o biológica.

- [0020]** La TAGNPP1 también puede fusionarse a, o conjugarse con, un ligador polipeptídico adecuado u otra secuencia por cuestiones de facilidad de identificación, síntesis o purificación de la proteína de fusión, o para preservar mejor la estructura nativa del componente NPP1 que puede mejorar la actividad y focalización de la TAGNPP1. Específicamente, puede emplearse una secuencia de ligador peptídico a fin de separar el primer y el segundo componente polipeptídico mediante una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido incorpore sus estructuras secundarias y terciarias. Dicha secuencia de ligador peptídico se incorpora a la proteína de fusión entre el componente NPP1 y el componente TAG con el uso de técnicas estándares conocidas en la técnica. Las secuencias de ligador peptídico adecuadas pueden escogerse en base a su capacidad de adoptar una conformación flexible y extendida y su incapacidad de adoptar una estructura secundaria que podría interactuar con la porción funcional en NPP1, TAG u otros polipéptidos secundarios descritos en esta invención (*p. ej.*, Fc). Las secuencias de ligador

peptídico preferidas contienen residuos de Gly, His, Asn y Ser. Los ligadores peptídicos útiles incluyen, entre otros, poli-Gly, poli-His, poli-Asn o poli-Ser. Otros aminoácidos neutrales cercanos, como Thr y Ala también pueden usarse en la secuencia del ligador. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse de manera útil como ligadores incluyen aquellas descritas en Maratea y col., Gene 40:39-46, 1985; Murphy y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 83:8258-8262, 1986; Patente de EE.UU. N.º 4.935.233 y Patente de EE.UU. N.º 4.751.180. La secuencia del ligador puede ser de entre 1 a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos de longitud. Preferentemente, el ligador polipeptídico debe presentar una longitud de entre 8 y aproximadamente 12 aminoácidos de largo. En un caso preferido, el ligador peptídico usando en la descripción es GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:15), aunque puede emplearse cualquier combinación de Gly, Ser, His o Asn.

[0021] Las proteínas de fusión también pueden comprender una TAGNPP1 de la presente descripción junto con un polipéptido no relacionado. Preferentemente, el polipéptido no relacionado debe ser capaz de mejorar la focalización de la proteína de fusión en el sitio de importancia clínica o biológica (*p. ej.*, el área de calcificación). Por ejemplo, los péptidos que presentan una alta afinidad al hueso se describen en la Patente de EE.UU. N.º 7.323.542.

[0022] La TAGNPP1 puede prepararse con el uso de procedimientos estándares, incluyendo técnicas recombinantes o conjugaciones químicas conocidas en la materia. Las técnicas útiles para el aislamiento y la caracterización de los ácidos nucleicos y proteínas de la presente descripción son conocidos para los expertos en la materia, y se pueden consultar los manuales estándares de biología molecular y bioquímica a fin de seleccionar protocolos adecuados para su uso sin demasiada experimentación. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2da edición, Cold Spring Harbor. En pocas palabras, las secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifican los componentes polipeptídicos pueden ensamblarse por separado y ligarse en un vector de expresión adecuado. Por ejemplo, el extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica el componente NPP1 se liga, con o sin un ligador peptídico, al extremo 5' de la secuencia de ADN que codifica el segundo componente polipeptídico, como TAG PEG o Fc, de manera que los marcos de lectura de las secuencias estén en fase. Esto permite la traducción en una proteína de fusión simple que retiene la actividad biológica de los polipéptidos de ambos componentes. Las secuencias de ADN ligadas se enlazan de manera operable a los elementos regulatorios de transcripción o traducción incluyendo un promotor. Los elementos regulatorios responsables de la expresión del ADN están ubicados en posición 5' de la secuencia de ADN que codifica el primer polipéptido, tal como la secuencia líder que codifica un péptido señal. De manera similar, los codones finalizadores requeridos para terminar las señales de terminación de traducción y transcripción solo están presentes en posición 3' de la secuencia de ADN que codifica el segundo polipéptido.

[0023] La descripción también abarca variantes de TAGNPP1. Una variante preferida de la TAGNPP1 es una que presente 80 %, 85 %, 90 % y 95 % y más preferentemente 96 % de una identidad de secuencia de aminoácidos respecto de las secuencias de aminoácidos A205 a L591 de la SEQ ID NO:1. Una variante más preferida de TAGNPP1 es una que presenta al menos un 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto de las secuencias de aminoácidos A205 a L591 de la SEQ ID NO:1.

[0024] La descripción también se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende el complemento de la SEQ ID NO:2 o variantes de la misma. Además, la presente descripción también presenta secuencias de polinucleótidos que se hibridan bajo condiciones estrictas para la SEQ ID NO:2 y cuya secuencia antisentido es idéntica en un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % a la SEQ ID NO:2. Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (T_m) del complejo o sonda de unión de ácidos nucleicos, como se enseña en Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987; Methods Enzymol. 152:399-407) y Kimmel, A. R. (1987; Methods Enzymol. 152:507-511) y puede usarse con una rigurosidad definida.

[0025] La descripción contempla de manera adicional secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), fragmentos, porciones o moléculas antisentido de las mismas.

[0026] Si bien las secuencias de nucleótidos que codifican las TAGNPP1 y sus variantes son preferentemente capaces de hibridarse con la secuencia de nucleótidos de las TAGNPP1 bajo condiciones de rigurosidad seleccionadas adecuadamente, puede resultar ventajoso producir secuencias de nucleótidos que codifiquen las TAGNPP1 o sus derivados que presenten un uso de codón sustancialmente diferente. Los codones pueden seleccionarse para aumentar la tasa a la que ocurre la expresión del péptido en un huésped procariótico o eucariótico, según la frecuencia con la que el huésped use los codones particulares. Otras razones para alterar de manera sustancial la secuencia de nucleótidos que codifica las TAGNPP1 y sus derivados, sin alterar las secuencias de aminoácidos codificadas, incluyen la producción de transcripciones de ácido ribonucleico (ARN) que presenten más propiedades deseables, como una vida media mayor.

[0027] Las secuencias de ácidos nucleicos alterados que codifican TAGNPP1 abarcadas por la descripción incluyen eliminaciones, inserciones o sustituciones de diferentes nucleótidos, dando como resultado un polinucleótido que codifica la misma TAGNPP1 o una funcionalmente equivalente. La proteína codificada también puede contener eliminaciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y resultan

en una TAGNPP1 funcionalmente equivalente. Las sustituciones intencionales de aminoácidos pueden hacerse sobre la base de similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos, siempre que la actividad biológica de las TAGNPP1 sea retenida. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos con carga positiva incluyen Lys y Arg; los residuos de aminoácidos con carga negativa incluyen Asp y Glu; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que presentan una hidrofiliidad similar pueden incluir Leu, Ile y Val; Gly y Ala; Asp y Gln; Ser y Thr; Phe y Tyr.

El vector de expresión

10 **[0028]** Los procedimientos que son conocidos para los expertos en la materia pueden usarse para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifiquen TAGNPP1 y elementos de control de transcripción y traducción adecuados. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinantes *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook, J. y col. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., y Ausubel, F. M. y col. (1989) Current
15 Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.

[0029] Es posible usar una variedad de vectores de expresión/sistemas huéspedes para contener y expresar secuencias que codifiquen TAGNPP1. Estos incluyen, entre otros, microorganismos como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN cósmido, plásmido o bacteriófago recombinante; levaduras transformadas con
20 vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus) o con vectores de expresión bacteriana (por ejemplo, plásmidos pBR322 o Ti); o sistemas de células animales (por ejemplo, el vector pTT22).

[0030] Los elementos de control o secuencias regulatorias pueden incluir aquellas regiones no traducidas de
25 potenciadores de vectores, promotores, regiones 5' y 3' no traducidas, que interactúan con proteínas celulares huéspedes para llevar a cabo la transcripción y traducción. Dichos elementos pueden variar en términos de fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y huésped usado, es posible usar cualquier número de elementos adecuados de transcripción y traducción, incluyendo, promotores específicos del tejido, constitutivos e inducibles. Por ejemplo, a realizar clonaciones en sistemas bacterianos, es posible usar promotores inducibles como el promotor lacZ
30 híbrido del fagémido Bluescript™ (Stratagene, LaJolla, California) o el plásmido pSport1™ (Gibco BRL) y similares. En sistemas celulares de mamíferos, se prefiere el uso de promotores de genes o virus de mamíferos. Si es necesario generar una línea celular que contenga copias múltiples de la secuencia que codifica TAGNPP1, es posible usar vectores basados en SV40 o EBV con un marcador seleccionable adecuado. Para los casos en que se usa un sistema de expresión aviar, los vectores adecuados para la expresión de varios constructos de TAGNPP1 se describen en la
35 Patente de EE.UU. N.º 6.730.822; la Patente de EE.UU. N.º 6.825.396; la Patente de EE.UU. N.º 6.875.588; la Patente de EE.UU. N.º 7.294.507; la Patente de EE.UU. N.º 7.521.591; la Patente de EE.UU. N.º 7.534.929; y la Solicitud de patente de EE.UU. con el número de serie 11/376.023. En pocas palabras, cuando se emplea un sistema de expresión aviar para expresar la TAGNPP1, se contemplan los promotores específicos del oviducto adecuados, por ejemplo, los promotores ovomucoides, promotores de ovoalbúmina, promotores de lisozima, promotores de conalbúmina,
40 promotores de ovomucina, promotores de ovotransferrina, entre otros, así como también las porciones funcionales de cada uno de estos promotores. Los promotores no específicos pueden incluir, por ejemplo, entre otros, los promotores del citomegalovirus (CMV), los promotores MDOT y los promotores del virus del sarcoma de Rous (RSV), los promotores del virus de la leucemia murina (MLV), los promotores de tumores de mama en ratones (MMTV) y los promotores SV40, así como también las porciones funcionales de cada uno de estos promotores. Los ejemplo no
45 limitantes de otros promotores que podrían resultar útiles incluyen, entre otros, los promotores Pol III (por ejemplo, los promotores Pol III de tipo 1, tipo 2 y tipo 3), los promotores HI, los promotores U6, los promotores tARN, promotores RNase MPR, así como también las porciones funcionales de cada uno de estos promotores. Habitualmente, las secuencias de terminador funcional se seleccionan para su uso según el promotor que se emplee.

Las células huéspedes

[0031] La presente descripción incluye la producción de TAGNPP1 solubles en un sistema aviar transgénico (por ejemplo, un pollo transgénico) como se conoce en la técnica, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N.º 7.534.929. La producción en el sistema aviar (*p. ej.*, en el oviducto del ave) de un componente NPP1 con o sin un grupo diana (*p. ej.*, ssNPP1, sNPP1, TAGsNPP1 y TAGssNPP1) está contenida dentro del alcance de la descripción. Además, en esta invención, se contempla la TAGNPP1 producida en cualquier sistema útil para la expresión de proteína, incluyendo, entre otros, aves transgénicas, mamíferos transgénicos, cultivos celulares (*p. ej.*, células CHO, HEK293, COS), bacterias como la *E. coli*, animales transgénicos como mamíferos y aves (*p. ej.*, pollos, codornices, patos y pavos) y en sistemas de plantas, incluyendo la hierba de pato.

60 **[0032]** Se puede escoger una cepa de célula huésped por su capacidad de modular la expresión de las secuencias insertadas o de procesar las TAGNPP1 expresadas en la manera deseada. Dichas modificaciones del polipéptido de TAGNPP1 incluyen, entre otros, acetilación, carboxilación, sialilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Diferentes células huéspedes como las CHO, COS, HeLa, MDCK, HEK293 y W138, que
65 presentan mecanismos característicos y una maquinaria celular específica para dichas actividades posteriores a la

traducción, pueden ser escogidas a fin de asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína de fusión en la presente descripción. La línea celular de tumores en aves también se contempla como una célula huésped para expresar el polipéptido de la presente descripción. Los ejemplos de líneas celulares útiles de aves (*p. ej.*, una línea celular de tumor de oviducto en aves) que pueden emplearse se describen en la Publicación de patente de EE.UU. N.º 2009/0253176.

La producción de TAGNPP1

[0033] Las TAGNPP1 pueden producirse con el uso de cualquier técnica de una variedad de técnicas conocidas. Las TAGNPP1 codificadas por secuencias de ADN, como se ha descrito anteriormente, pueden prepararse de inmediato a partir de las secuencias de ADN usando cualquier vector de una variedad de vectores de expresión descritos en esta invención o que sean conocidos para aquellas personas con una habilidad ordinaria en la técnica. La expresión puede lograrse en cualquier célula huésped adecuada que haya sido transformada o transfectada con un vector de expresión que contiene una molécula de ADN que codifica un polipéptido recombinante de la presente descripción. Los sobrenadantes de sistemas de vectores/huéspedes adecuados que secretan una proteína de fusión o polipéptido recombinante en el medio de cultivo primero puede concentrarse usando un filtro comercialmente disponible. Después de la concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación adecuada tal como una matriz de afinidad o una resina de intercambio iónico. Uno o más pasos de la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) de fase inversa pueden emplearse para purificar adicionalmente un polipéptido recombinante.

[0034] Para una producción de proteínas recombinantes de alto rendimiento, se prefiere la expresión estable. Las líneas celulares que expresan de manera estable las TAGNPP1 pueden ser transformadas con el uso de vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación y/o elementos de expresión endógena y/o un gen marcador seleccionable en el mismo vector o en uno separado. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células crezcan por 1 o 2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas al medio selectivo. La finalidad del marcador seleccionable es aportar resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan de manera exitosa las secuencias introducidas. Los clones resistentes de células transformadas de manera estable pueden ser proliferados usando técnicas de cultivo de tejidos adecuadas para el tipo de célula. Los procedimientos para producir proteínas exógenas en líneas celulares de mamíferos son conocidos en la técnica. Los ejemplos ilustrativos de esto, así como también otros aspectos e casos de la presente descripción para la producción de polipéptidos heterólogos, tal como las proteínas de fusión TAGNPP1, en células de aves se describe por completo en la Solicitud de patente de EE.UU. con el número de serie 09/877.374, depositada el 8 de enero de 2001, publicada como U.S. 2002/0108132-A1 el 8 de agosto de 2002 y la Solicitud de patente de EE.UU. con el número de serie 10/251.364, depositada el 18 de septiembre de 2002. Los ejemplos de la producción de proteínas exógenas en líneas celulares de tumores en aves también se describen en la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2009/0253176.

[0035] En ella, se contempla específicamente la producción de las proteínas TAGNPP1 descritas en esta invención en un sistema aviar transgénico. En un caso particularmente útil, la descripción se dibuja para la producción de TAGNPP1, la cual puede producirse en el oviducto de un ave transgénica, por ejemplo, un pollo. Los ejemplos de la producción de proteínas exógenas en el sistema de expresión aviar transgénico también se describen en la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 6.730.822. En pocas palabras, un vector aviar adecuado descrito anteriormente que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión TAGNPP1, ligada operablemente a un promotor constitutivo o específico del tejido que impulsa la expresión de la secuencia de codificación en el oviducto del pollo se introduce en las células embrionarias X de la etapa del pollo. Las células embrionarias transformadas son incubadas en condiciones favorables para el empollado de los pollitos vivos. Los pollitos vivos se convierten en pollos híbridos maduros que se aparean con pollos no transgénicos de manera natural o a través de una inseminación artificial. Un pollo transgénico es identificado mediante la evaluación de progenie en búsqueda de la incorporación de la línea germinal de la secuencia de codificación de la proteína. La progenie transgénica puede aparearse con otro pollo, transgénico o no, a fin de producir huevos que contengan la proteína de fusión TAGNPP1. Después, la TAGNPP1 es aislada y purificada con el uso de procedimientos conocidos en la técnica. Por consiguiente, la descripción proporciona las proteínas de fusión TAGNPP1 recombinantes que han sido producidas por aves transgénicas.

Composición farmacéutica

[0036] La presente descripción también presenta composiciones farmacéuticas que comprenden la TAGNPP1 aislada y sustancialmente purificada o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. La composición farmacéutica de la presente descripción también puede incluir un portador farmacéuticamente aceptable o un excipiente del mismo. Las composiciones que comprenden dichos portadores, incluyendo las moléculas compuestas, se formulan mediante procedimientos convencionales conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 14ava edición, Mack Publishing Co., Easton, Pa.). El portador puede comprender un diluyente. En un caso, el portador farmacéutico puede ser un líquido y la proteína de fusión puede encontrarse en la forma de una solución. El portador farmacéutico puede ser cera, grasa o alcohol. En otro caso, el portador farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido en la forma de polvo, un polvo liofilizado o una pastilla. En un caso, el portador puede comprender un liposoma o una microcápsula.

[0037] Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse en la forma de un polvo estéril liofilizado a ser inyectado después de la reconstitución con un diluyente. El diluyente puede ser agua para inyecciones, agua bacteriostática para inyecciones o una solución salina estéril. El polvo liofilizado puede producirse mediante secado por congelación de una solución de la proteína de fusión, a fin de producir la proteína en forma seca. Como se conoce en la técnica, la proteína liofilizada en general presenta una estabilidad aumentada y una vida útil más larga que la de una solución líquida de la proteína.

Definiciones:

[0038] Como se usa en esta invención, el término "aceptable", con respecto a una formulación, composición o ingrediente, como se usa en esta invención, significa que no hay ningún efecto perjudicial persistente en la salud general del sujeto en tratamiento.

[0039] Como se usan en esta invención, los términos "administración" o "administrar" se refieren a la proporción de una proteína de fusión de la descripción a un sujeto que necesita el tratamiento.

[0040] "Alteraciones", como se usa en esta invención, comprende cualquier alteración en la secuencia de polinucleótidos que codifican las TAGNPP1, incluyendo eliminaciones, inserciones y mutaciones de punto que puedan detectarse a través del uso de ensayos de hibridación.

[0041] El término "animal" se usa en esta invención para incluir a todos los animales vertebrados, incluyendo aves y mamíferos como ratas, ratones y humanos. También incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo la etapa embrionaria y la fetal.

[0042] Cuando se menciona la "secuencia de aminoácidos" en esta invención para hacer referencia a una secuencia de aminoácidos de una molécula de una proteína de fusión, la frase "secuencia de aminoácidos" y los términos similares, como "polipéptidos" o "proteína", no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos a toda la secuencia de aminoácidos asociada con la molécula de la proteína o polipéptido mencionada.

[0043] El término "aviar" como se usa en esta invención hace referencia a especies, subespecies o cepas de un organismo de la clase taxonómica avia, por ejemplo, organismos como pollos, pavos, patos, gansos, codornices, faisanes, loros, fringílidos, halcones, cuervos y ratites, incluyendo avestruces, emús y casuarios, entre otros. El término incluye las distintas cepas conocidas de Gallus gallus, o pollos (por ejemplo, Leghorn blanco, Leghorn marrón, Barred-Rock, Sussex, New Hampshire, Rhode Island, Australorp, Minorca, Amrox, California gris, Gallo italiano color perdiz), así como también las cepas de pavos, faisanes, codornices, patos, avestruces y otras aves de corral criadas comúnmente en cantidades comerciales.

[0044] La frase "basado(a) en" o "derivado de", como en el caso de un vector retroviral basado en o derivado de un retrovirus particular o basado en una secuencia de nucleótidos de un retrovirus particular, significa que el genoma del vector retroviral contiene una porción sustancial de la secuencia de nucleótidos del genoma del retrovirus particular. La porción sustancial puede ser un gen o secuencia de nucleótidos particular, como la secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas gag, pol y/o env, u otras secuencias de nucleótidos estructurales o funcionales del genoma del virus, como las secuencias que codifican los LTR o puede ser sustancialmente el genoma retroviral completo, por ejemplo, la mayoría (p. ej., más del 60, más del 70, más del 80 o más del 90 %) o todo el genoma retroviral, como resultará evidente en el contexto de la memoria descriptiva para el conocimiento de un experto en la materia. Los ejemplos de vectores retrovirales que están basados en o derivados de un retrovirus son los vectores retrovirales NL (por ejemplo, NLB), que están basados en el retrovirus ALV, como se describe en Cosset y col., Journal of Virology (1991) vol. 65, p 3388-3394.

[0045] El término "biológicamente activo", como se usa en esta invención, se refiere a la proteína de fusión que presenta funciones estructurales, regulatorias o bioquímicas de la pirofosfatasa/fosfodiesterasa de la proteína NPP1 de ocurrencia natural.

[0046] El término "constructo", como se usa en esta invención, hace referencia a una secuencia de nucleótidos lineal o circular, como el ADN, que ha sido ensamblada a partir de más de un segmento de la secuencia de nucleótidos que fueron aislados de una fuente natural o sintetizados químicamente, o que surgen de una combinación de dicho aislamiento y sintetizado.

[0047] El término "complementario", como se usa en esta invención, hace referencia a dos moléculas de ácido nucleico que pueden formar interacciones específicas entre sí. En las interacciones específicas, cuando una base de adenina dentro de una hebra de ácido nucleico puede formar dos uniones de hidrógeno con timina dentro de una segunda hebra de ácido nucleico cuando las dos hebras de ácido nucleico están en polaridades opuestas. También en las interacciones específicas, una base de guanina dentro de una hebra de ácido nucleico puede formar tres uniones de hidrógeno con citosina dentro de una segunda hebra de ácido nucleico cuando las dos hebras de ácido

nucleico están en polaridades opuestas. Los ácidos nucleicos complementarios, como se hace referencia en esta invención, pueden comprender además bases modificadas, donde una adenina modificada puede formar uniones de hidrógeno con una timina o timina modificada, y una citosina modificada puede formar uniones de hidrógeno con una guanina o una guanina modificada.

5

[0048] Una "eliminación", como se hace referencia en esta invención, se refiere a un cambio ya sea en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos en la que uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, están ausentes.

10 **[0049]** Los términos "expresado/a" o "expresión", como se usan en esta invención, hacen referencia a la transcripción de un gen para dar una molécula de ácido nucleico de ARN al menos de manera complementaria en parte a una región de una de las dos hebras de ácido nucleico del gen. Los términos "expresado/a" o "expresión", como se usan en esta invención, también pueden hacer referencia a la traducción de ARN para producir una proteína o péptido.

15

[0050] El término "vector de expresión", como se usa en esta invención, se refiere a un vector de ácido nucleico que comprende una región de control de expresión del gen, como un promotor o componente promotor, ligado operablemente a una secuencia de nucleótidos que codifica al menos uno polipéptido.

20 **[0051]** Las frases "porción funcional" o "fragmento funcional" se usan indistintamente y, como se usan en esta invención, significan una porción o fragmento de un todo capaz de realizar, de manera total o parcial, una función del todo. Por ejemplo, una porción biológicamente funcional de una molécula significa una porción de la molécula que realiza una función biológica de la molécula entera o intacta. Por ejemplo, una porción funcional de una región que controla la expresión del gen es un fragmento o porción de la región de control de la expresión del gen especificado
25 que regula o controla, de manera total o parcial, la expresión del gen (por ejemplo, la facilita total o parcialmente) en un sistema biológico (por ejemplo, un promotor). Las porciones funcionales puede ser de cualquier tamaño útil.

[0052] El término "región de control de la expresión del gen" como se usa en esta invención, hace referencia a las secuencias de nucleótidos que se asocian con una secuencia de codificación y que regulan total o parcialmente la
30 expresión de la secuencia de codificación, por ejemplo, regulan total o parcialmente la transcripción de la secuencia de codificación. Las regiones de control de la expresión del gen pueden aislarse de una fuente de ocurrencia natural o sintetizarse químicamente, y pueden incorporarse a un vector de ácido nucleico para habilitar una transcripción regulada en células adecuadas. Las "regiones de control de la expresión del gen" pueden anteceder a, entre otras, la región de una secuencia de ácido nucleico que está en la región 5' del extremo de una secuencia de codificación que
35 puede transcribirse en ARNm.

[0053] Los términos "heterólogo/a", "exógeno/a", y "extraño/a" se usan indistintamente en esta invención para hacer referencia a una biomolécula, tal como una de ácido nucleico o una proteína que no se encuentra normalmente en un determinado organismo o célula, tejido u otro componente contenido en, o producido por, un organismo. Por
40 ejemplo, una proteína que es heteróloga o exógena respecto de un huevo es una proteína que no se encuentra normalmente en el mismo. Como se usan en esta invención, los términos "heterólogo/a", "exógeno/a" y "extraño/a" en referencia a los ácidos nucleicos, como ADN y ARN se usan indistintamente y se refieren al ácido nucleico que no ocurre naturalmente como parte de un cromosoma, genoma o célula en el que está presente o que se encuentra en una o varias ubicaciones y/o en cantidades que difieren de la/s ubicación/es y/o cantidades en que ocurren en la
45 naturaleza. Puede ser un ácido nucleico que no es endógeno respecto del genoma, cromosoma o célula y que haya sido introducido de manera exógena al genoma, cromosoma o célula. Los ejemplos de ADN heterólogo incluyen, entre otros, un ADN que comprende una región de control de la expresión del gen y ADN que codifica uno o varios productos, por ejemplo, ARN o un producto de proteína. Los ejemplos de ADN heterólogo incluyen, entre otros, promotores o regiones de control de la expresión del gen que se han descrito en esta invención una vez que ha sido aislados del
50 ave y usados a partir de ahí, p. ej., después de la reintroducción en un genoma aviar.

[0054] El término "ácido nucleico aislado" como se usa en esta invención cubre, por ejemplo, (a) un ADN que presenta la secuencia de parte de una molécula genómica de ocurrencia natural pero no flanqueada por al menos una de las secuencias que flanquean esa parte de la molécula en el genoma de las especies en que ocurre naturalmente;
55 (b) un ácido nucleico que ha sido incorporado a un vector o al ADN genómico de una procarionota o eucarionota de manera que el vector o ADN genómico resultante no es idéntico al ADN de ocurrencia natural del que se obtuvo el ácido nucleico; (c) una molécula separada como una DNAC, un fragmento genómico, un fragmento producido por una reacción en cadena de polimerasa (PCR), una reacción en cadena de ligasa (LCR) o una síntesis química, o un fragmento de restricción; (d) una secuencia de nucleótidos recombinantes que forma parte de un gen híbrido, es decir,
60 un gen que codifica una proteína de fusión; y (e) una secuencia de nucleótidos recombinantes que forma parte de una secuencia híbrida cuya ocurrencia no es natural. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente descripción pueden incluir, por ejemplo, variantes alélicas naturales, así como también moléculas de ácido nucleico modificadas por eliminaciones, inserciones, inversiones o sustituciones de nucleótidos.

65 **[0055]** Una "inserción" o "adición", como se usa en esta invención, hace referencia a un cambio en la secuencia

de aminoácidos o nucleótidos que resulta en la adición de uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, en comparación con la molécula de la TAGNPP1.

[0056] El término "ácido nucleico" como se usa en esta invención se refiere a cualquier conjunto lineal o secuencial de nucleótidos y nucleósidos, por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ARNm, ARNt, oligonucleótidos, oligonucleósidos y derivados de los mismos. Por cuestiones de facilidad de análisis, en esta invención se hace referencia a los ácidos nucleicos que no ocurren naturalmente como constructos. Los ácidos nucleicos pueden incluir vectores de plásmidos bacterianos que incluyen vectores de expresión, clonación, cósmidos y transformación, tal como vectores víricos animales, por ejemplo, adenovirus modificados, virus de la influenza, virus del polio, virus de la viruela, retrovirus como el vector retrovítico del virus de la leucosis aviar (ALV), el vector retrovítico del virus de la leucemia murina (MLV) y un vector del lentivirus, entre otros similares y fragmentos de los mismos. Además, el ácido nucleico puede ser una secuencia terminal repetida larga (LTR) de un vector retrovítico de un virus de leucosis aviar (ALV), un vector retrovítico del virus de la leucemia murina (MLV) o un vector del lentivirus y fragmentos de los mismos. Los ácidos nucleicos también pueden incluir vectores NL como NLB, NLD y NLA y fragmentos de los mismos, así como también oligonucleótidos sintéticos como el ADN o ARN químicamente sintetizados. Los ácidos nucleicos pueden incluir nucleótidos y nucleósidos modificados o derivatizados, como ser, entre otros, nucleótidos halogenados, por ejemplo, 5-bromouracilo, entre otros, y nucleótidos derivatizados, como nucleótidos etiquetados con biotina.

[0057] La "secuencia de ácido nucleico", como se usa en esta invención, hace referencia a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido y fragmentos o porciones de los mismos, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser de hebra simple o doble, y representa la hebra de sentido o antisentido.

[0058] El término "ligado operablemente" se refiere a una disposición de elementos donde los componentes así descritos están configurados de manera que realicen su función habitual. Los promotores o regiones que controlan la expresión del gen (por ejemplo, los componentes del promotor) ligados operablemente a una secuencia de codificación son capaces de efectuar la expresión de la secuencia de codificación. Las secuencias de control no necesitan ser contiguas a la secuencia de codificación, siempre y cuando funcionen de manera que dirijan la expresión de la misma. Por lo tanto, por ejemplo, la intervención de secuencias no traducidas pero transcritas puede estar presente entre la secuencia de un promotor y la secuencia de codificación, y la secuencia del promotor aún puede ser considerada como "ligada operablemente" a la secuencia de codificación.

[0059] El término "promotor específico de oviducto", como se usa en esta invención, hace referencia a los promotores y componentes de promotores que son funcionales, es decir, permiten la transcripción de una secuencia de codificación, en gran medida, por ejemplo, principalmente (es decir, más del 50 % del producto de transcripción producido en el animal por un tipo de promotor particular que se produce en las células del oviducto) o exclusivamente en células del oviducto de un ave. Los ejemplos de promotores específicos del oviducto útiles incluyen, entre otros, el promotor de ovoalbúmina, el promotor ovomucoide, el promotor ovoinhibidor, el promotor de lisozima y el promotor de ovotransferrina, así como también las porciones funcionales de estos promotores, por ejemplo, los componentes del promotor.

[0060] Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia de nucleótido" y "secuencia de ácido nucleótido" pueden usarse indistintamente en esta invención e incluyen, entre otros, secuencias de codificación, es decir, secuencia(s) de ácido nucleico o polinucleótido(s) que se transcriben y traducen en un polipéptido in vitro o in vivo al colocarse bajo el control de secuencias regulatorias o de control adecuadas; secuencias de control, por ejemplo, inicio de la traducción y codones finalizadores, secuencias de promotores, sitios de unión de ribosomas, señales de poliadenilación, sitios de unión de factores de transcripción, secuencias de terminación de transcripción, dominios regulatorios hacia arriba y hacia abajo, silenciadores, secuencias de ADN a las que se unen uno o varios factores de transcripción, alterando la actividad de un promotor del gen, ya sea de manera positiva (inducción) o negativa (represión) y similares. Los términos descritos en esta invención no sugieren ninguna limitación al respecto de la longitud o el origen sintético.

[0061] Como se usa en esta invención, los términos "polipéptido" y "proteína" pueden usarse indistintamente y hacen referencia a un polímero de aminoácidos de tres o más aminoácidos en un conjunto en serie, enlazados a través de uniones peptídicas. El término "polipéptido" incluye proteínas, como las proteínas de fusión, fragmentos de proteínas, análogos de proteínas, oligopéptidos y similares. El término "polipéptidos" incluye polipéptidos como se describió anteriormente que son codificados por ácidos nucleicos, producidos a través de tecnología recombinante (*p.ej.*, aislados de un ave transgénica) o químicamente sintetizados.

[0062] Como se usa en esta invención, el término "promotor" hace referencia a una secuencia de ADN útil para comenzar una iniciación de transcripción por parte de una polimerasa de ARN en una célula aviar. Un "componente de promotor" es una secuencia de ADN que puede, por sí misma o en combinación con otra secuencia de ADN, efectuar o facilitar la transcripción. Los componentes específicos del promotor, como los componentes del promotor de ovoalbúmina, los componentes del promotor ovomucoide y los componentes del promotor de lisozima, así como también otros promotores y componentes de promotores descritos y reivindicados en esta invención, no describen la secuencia específica de un promotor. Por el contrario, abarcan cualquier secuencia o fragmento de secuencia del

promotor respectivo que es útil para efectuar o facilitar la transcripción de una secuencia de codificación. Por ejemplo, un componente del promotor ovomucoide incluye, entre otros, los promotores ovomucoides de aproximadamente 1,8 kb, 3,9 kb y 10 kb descritos en la Publicación de EE.UU. N.º 11/649,543, publicada el 17 de mayo de 2007. Los "componentes del promotor" también pueden abarcar regiones de control de la expresión del gen redispuestas cuya función es iniciar la transcripción de ARN y moléculas de ADN híbridas compuestas por secuencias de ADN de ocurrencia natural y/o secuencias de ADN sintéticas cuya función es iniciar la transcripción de ARN.

[0063] Los términos "ácido nucleico recombinante" y "ADN recombinante", como se usa en esta invención, se refieren a combinaciones de al menos dos secuencias de ácido nucleico que no se encuentran naturalmente en una célula eucariótica o procariótica. Las secuencias de ácido nucleico pueden incluir, entre otros, vectores de ácido nucleico, elementos regulatorios de la expresión del gen, orígenes de replicación, secuencias de gen adecuadas que, al ser expresadas, otorgan resistencia a antibióticos, secuencias de codificación de proteínas y similares. Los términos "polipéptido recombinante" o "proteína recombinante" significan la inclusión de un polipéptido producido mediante técnicas de ADN recombinantes de manera que resulta distinta de un polipéptido de ocurrencia natural, ya sea en su ubicación, pureza o estructura. En general, dicho polipéptido recombinante estará presente en una célula en una cantidad diferente de aquella que se observa normalmente en la naturaleza.

[0064] El término "condiciones rigurosas", como se usa en esta invención, es la "rigurosidad" que ocurren dentro de un intervalo de entre $T_m - 5^\circ\text{C}$ (5°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de la sonda) y aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de la T_m . Como entenderán los expertos en la materia, la rigurosidad de la hibridación puede alterarse a fin de identificar o detectar secuencias de polinucleótidos idénticas o relacionadas.

[0065] Como se usan en esta invención, los términos "sujeto" o "paciente" abarcan tanto a mamíferos como no mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, entre otros, humanos, chimpancés, simios, ganado vacuno, caballos, ovejas, cabras, puercos; conejos, perros, gatos, ratas, ratones, conejillos de indias y similares. Los ejemplos de no mamíferos incluyen, entre otros, aves, peces y similares.

[0066] Una "sustitución", como se usa en esta invención, se refiere al reemplazo de uno o más aminoácidos o nucleótidos con diferentes aminoácidos o nucleótidos, respectivamente.

[0067] Como se usa en esta invención, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" hace referencia a cualquier cantidad de un compuesto que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, resulta en un tratamiento mejorado, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o una disminución en el índice de avance de una enfermedad o trastorno. El término también incluye, dentro de su alcance, las cantidades efectivas para mejorar la función fisiológica normal.

[0068] Como se usan en esta invención, los términos "TAGNPP1", "proteína de fusión", "polipéptido TAGNPP1" y "componente NPP1 fusionado a un grupo diana" se usan de manera indistinta.

[0069] Como se usan en esta invención, los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento", hacen referencia a los procedimientos para paliar, reducir o mejorar los síntomas de una enfermedad o condición, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas subyacentes de los síntomas, inhibir la enfermedad o condición, detener el desarrollo de la enfermedad o condición, mitigar la enfermedad o condición, provocar la regresión de la enfermedad o condición, mitigar una condición provocada por una enfermedad o condición, o detener los síntomas de una enfermedad o condición, ya sea de manera profiláctica y/o terapéutica.

[0070] Una "variante" de TAGNPP1, como se usa en esta invención, hace referencia a una secuencia de aminoácidos que es alterada por uno o más aminoácidos. Preferentemente, una variante contiene sustituciones conservadoras. Una "sustitución conservadora" es una en la que el aminoácido es sustituido por otro aminoácido con propiedades similares, como aquella en la que un experto en la materia de química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido sean esencialmente las mismas. Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse generalmente sobre la base de similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen Asp y Glu; los aminoácidos con carga positiva incluyen la lisina y la arginina; y los aminoácidos con grupos con cabeza polar sin carga que presentan valores de hidrofilicidad similares incluyen Leu, Ile y Val; Gly y Ala; Asp y Gln; y Ser, Thr, Phe y Tyr. Otros grupos de aminoácidos que pueden presentar cambios conservadores incluyen: Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr; (2) Cys, Ser, Tyr, Thr; (3) Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; (4) Lys, Arg, His; y (5) Phe, Tyr, Trp, His. Una variante también, o de manera alternativa, podría contener cambios no conservadores. En un caso preferido, los polipéptidos variables difieren de una secuencia nativa por sustitución, eliminación o adición de cinco aminoácidos o menos, o a raíz de, por ejemplo, el reemplazo de un Gly con un Trp. Las variantes también (o alternativamente) pueden ser modificadas, por ejemplo, mediante la eliminación o adición de aminoácidos que presentan una influencia mínima sobre la inmunogenicidad, estructura secundaria y naturaleza hidropática del componente NPP1. La guía para determinar qué residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos, insertados o eliminados sin abolir la actividad biológica o inmunológica pueden encontrarse con el uso de programas informáticos que son conocidos en la técnica.

[0071] Los términos "vector" y "vector de ácido nucleico", como se usan en esta invención, hacen referencia a un plásmido de hebra simple o doble, natural o sintético, o a una molécula de ácido nucleico viral que puede transfectarse o transformarse en células y replicarse de manera independiente, o en el interior, del genoma de la célula huésped. Es posible linealizar un vector de doble hebra circular puede mediante el tratamiento con una enzima de restricción adecuada en base a la secuencia de nucleótidos del vector. Un ácido nucleico puede insertarse en un vector cortando este último y ligando juntas las piezas deseadas.

[0072] El término "porción", como se usa en esta invención, con respecto a la proteína de fusión, se refiere a los fragmentos de esa proteína. Los fragmentos pueden variar en tamaño desde cuatro residuos de aminoácidos a la totalidad de la secuencia de aminoácidos menos un aminoácido. Por consiguiente, una proteína que comprende al menos una porción de la secuencia de aminoácido de la "SEQ ID NO:1" abarca la TAGNPP1 completa y los fragmentos de la misma.

[0073] Los términos "transformación" o "transfección", como se usan en esta invención, describen un procedimiento mediante el cual el ADN exógeno ingresa a, y cambia, una célula receptora mediante el uso de varios procedimientos conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier procedimiento conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico extrañas en una célula huésped procariótica o eucariótica. El procedimiento se selecciona en base a la célula huésped que se transforma y puede incluir, entre otros, una electroporación, bombardeo de partículas, infección viral y lipofección. Dichas células "transformadas" incluyen células transformadas de manera estable en las que el ADN insertado es capaz de replicarse, ya sea como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma huésped. También incluyen células que expresan de manera transitoria el ADN o ARN insertado por períodos de tiempo limitados.

25 EJEMPLOS

[0074] Esta descripción se ejemplifica de manera adicional con los ejemplos siguientes. Los ejemplos solo tienen finalidad ilustrativa y no pretenden, ni deben interpretarse de modo alguno como limitantes de la invención.

30 Ejemplo I (referencia)

[0075] El constructo de TAGsNPP1 que contiene el grupo diana que presenta ocho ácidos aspárticos consecutivos fusionados a sNPP1 se ligó al vector pTT22 usando los sitios de EcoRI y HindIII (pTT22-sNPP1.D8; Fig. 19). pTT22-sNPP1. El D8 fue transfectado a células HEK203E y los transformantes se cultivaron para expresar la TAGsNPP1. La TAGsNPP1 fue aislada de los medios de cultivo y purificada parcialmente como se conoce en la técnica. Después de la purificación, se midió la actividad de pirofosfatasa/fosfodiesterasa de la TAGsNPP1 por su capacidad para hidrolizar p-nitrofenil éster de timidina 5'-monofosfato. En pocas palabras, la TAGsNPP1 se diluyó a 1 ng/μL en 50 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 9,5. El sustrato se añadió en una placa que contenía 50 μL de 1 ng/μL TAGsNPP1, 50 μL de 10 mM p-nitrofenil éster de timidina 5'-monofosfato (Sigma™, Catálogo #T4510). Se midió la actividad enzimática de TAGsNPP1 en 405 nm (absorbancia) en modo cinético por 5 minutos. Como se muestra en la Fig. 21, se detectó que la actividad de TAGsNPP1 estaba por encima del nivel observado en el control que no contenía TAGsNPP1. En particular, la TAGsNPP1 producida desde HE203D6 mostró el nivel más alto de actividad enzimática. Estos resultados sugirieron firmemente que la NPP1 truncada fusionada al grupo diana (es decir, D8) mantuvo suficientemente su función normal como nucleasa.

45 Ejemplo II (referencia)

[0076] Este ejemplo profético no limitante describe cómo tratar la calcificación arterial idiopática de la infancia mediante la administración de una formulación que comprende una proteína de fusión TAGNPP1.

[0077] Un médico clínico usa una prueba de diagnóstico para verificar que un paciente presente altos niveles de calcificación en la arteria. También puede llevarse a cabo una prueba genética en búsqueda de defectos de NPP1, como se describió en Rutsch y col. (2003), Nature Genetics 34:379-81.

[0078] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención son preferentemente administradas por vía intravenosa, aunque en ciertas circunstancias se emplea la administración por vía intradérmica, intramuscular u oral.

[0079] El médico clínico determina una dosis que puede variar dependiendo del género, edad, salud y peso del paciente. La determinación de la dosis adecuada o vía de administración es ampliamente comprendida por la habilidad de un médico ordinario.

[0080] Semanalmente se puede infundir una formulación que contenga TAGNPP1, entre aproximadamente 10 y 1000 mg/kg por semana. Pueden administrarse de 10 a 30 mg/kg una sola vez. Durante el período de infusión, los pacientes son monitoreados de cerca y, en caso de haber un evento adverso, se procede a la intervención clínica adecuada. El tratamiento dura al menos 1 mes o toda la vida del paciente. Debe permitirse una ventana de 48 horas

para cada infusión. Un esquema de infusión en el que la tasa de infusión aumente con el tiempo reduce o elimina los eventos adversos. Las infusiones para niños pueden administrarse según el siguiente esquema: 5-10 cc/h por 60 minutos en cada intervalo.

- 5 **[0081]** Por el otro lado, cuando se desee una administración intravenosa continua, el ejemplo habitual de los sistemas de liberación lenta comprende que de 1 a 100 mg/kg de proteínas TAGNPP1 efectivas puedan ser liberadas continuamente por más de 1 día.

Ejemplo III (referencia)

10

Purificación de la TAGsNPP1-D8 soluble

- [0082]** La forma soluble de la TAGsNPP1 (etiquetada como D8 en el extremo C) (véase SEQ ID NO:20 y la Fig. 26) se purificó desde el medio condicionado HEK293. El medio condicionado (500ml) fue equilibrado con un
15 Tampón A de hidroxipatita (HA) (10mM Na₃PO₄, pH 6,8) y filtrado con un filtro MidiCap tamaño 8 Sartobran de 0,2 µm (Sartorius Stedim). Una columna de Ultrogel de HA de 20 ml (Pall Life Sciences) se equilibró con 5 volúmenes de columna (CV) de Tampón A antes de cargar el medio condicionado filtrado a 3 ml/min. La columna se lavó al punto de referencia UV con Tampón A. La proteína fue eluida de manera escalonada usando 2,5 CV en cada caso de Tampón B de HA (150mM Na₃PO₄, pH 6,8), Tampón C de HA (250mM Na₃PO₄, pH 6,8) y Tampón D de HA (500mM Na₃PO₄,
20 pH 6,8) mientras se recolectaban fracciones de 5 ml. Las fracciones activas de la columna de HA fueron reservadas (50 ml) y equilibradas con un Tampón A de WGA (20mM, pH 8,0, 150mM NaCl, 0,7 % CHAPS). Después del filtrado, se cargaron 6-7 mg de proteínas totales (de 15 a 18 ml) en una columna de gravedad de Aglutinina de Germen de Trigo (WGA) de 1 ml (EMD Chemicals) que había sido equilibrada con 5 CV de Tampón A de WGA. La columna se lavó con 7 CV de Tampón A de WGA, y después la proteína fue eluida con 5 xlmil de Tampón B de WGA (20mM Tris,
25 pH 8,0, 150mM NaCl, 500mM N-Acetilglucosamina, 0,7 % tampón CHAPS). Antes de recolectar las fracciones de 1 ml, se dio lugar a que el Tampón B de WGA incubase con la columna a temperatura ambiente por 10 minutos. El procedimiento se repitió hasta que todo el material de arranque haya sido purificado por la columna de WGA (un total de 4 sucesiones). Las fracciones activas (29 ml) fueron reservadas y concentradas en 1,2 ml usando un Vivaspin-15 (Sartorius Stedim) de corte de peso molecular (MWCO) de 100.000, con el tampón cambiando a PBS al mismo tiempo.

30

[0083] La sNPP1-D8 (TAGsNPP1) se purificó a un 91,5 % en base a la HPLC. Después de analizar la reserva final mediante SDS-PAGE, una banda de dímeros correspondía a ~210kD en condiciones sin reducción y, en condiciones con reducción, una banda de monómeros correspondía a ~105kD.

Ejemplo IV (referencia)

- [0084]** Las células del músculo liso aórtico humano fueron introducidas en una placa a 1x10⁴ células por pocillo en 48 placas de pocillos y se las mantuvo en un Medio Águila Modificado de Dulbecco (DMEM) en condiciones estándares. Después de 2 días, se complementó el DMEM con NaPO₄ y ATP a 3,8 mM y 50 uM, respectivamente. La
40 sNPP1 (WT: Fig. 9), la TAGsNPP1 que presenta ocho residuos de ácido aspártico (D8) fusionados al extremo C (Fig. 26) y la sNPP1-Fc (Fig. 29) fueron complementadas a 1 ug/ml. El medio fue reemplazado con lo mismo cada dos días. Después de 5 días, el medio fue eliminado del cultivo y reemplazado con 100 ul de 0,6 N HCl e incubado por 16 a 20 horas a temperatura ambiente, disolviendo fosfatos de calcio en la solución. Después se cuantificaron los niveles de calcio mediante una reacción colorimétrica de calcio-cresolfaleína, con el uso del Kit de ensayo de calcio (#700550)
45 de Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI.

- [0085]** Como se muestra en la Fig. 23, la TAGsNPP1 demostró un aumento de la inhibición en la calcificación, en comparación con la sNPP1 (WT), lo que sugiere que el dominio 8 contenido en la TAGsNPP1 proporciona una mayor capacidad de retorno al hogar para los sitios de calcificación y/o un efecto de inhibición mejorado.

50

Ejemplo V

Ensayo de la actividad enzimática de sNPP1-Fc.

- [0086]** La adición de 1ug de sNPP1-Fc (Fig. 29) se basó en una pureza del 70 % (es decir que se usó ~1,1µg de sNPP1-Fc en el ensayo). La columna de exclusión de tamaño (SEC) de la HPLC indica que la sNPP1-Fc es ~78 % pura. El gel no reducido mostró un dímero con el tamaño esperado (~250kD). La banda del dímero se redujo al tamaño de monómero esperado (~125kD) al ser tratada con DTT. El análisis de Western blot confirmó las bandas de dímeros y monómeros. El tratamiento de la muestra de sNPP1-Fc con PNGase F redujo la banda de monómeros de
60 ~125kD a ~100kD, el cual es el peso molecular esperado si se considera que la sNPP1-Fc contenía 12 sitios N-glicanos. A una pureza del 78 %, la cuantificación final dio un resultado de ~0,808 mg de sNPP1-Fc (medio condicionado de 2,2µg/ml). La actividad enzimática de sNPP1-Fc se determinó como se conoce en la técnica.

Tabla 1. Actividad enzimática de la sNPP1-Fc

Muestra	OD₄₀₅	OD₄₀₅ final
Control negativo (sin la proteína NPP1)	0,053	0,000
1 ug Wt de sNPP1 (sNPP1 soluble)	0,296	0,243
1 ug de NPP1-Fc (extremo C)	0,397	0,344

- [0087]** Cada ejemplo de la memoria descriptiva anterior se proporciona a título de explicación de la descripción, sin limitación alguna. De hecho, para los expertos en la materia, resultará evidente que es posible hacer varias modificaciones, combinaciones, adiciones, eliminaciones y variaciones a la presente invención sin apartarse del
- 5 alcance de la misma, abarcado por las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, las características ilustradas o descritas como parte de una realización pueden usarse en otra realización para producir incluso otra realización adicional.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que consiste esencialmente en un componente NPP1 y una región Fc de una inmunoglobulina, en el que el componente NPP1 es un NPP1 truncado que comprende la región rica en cisteína y un
5 dominio catalítico que presenta actividad de pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa, pero que presenta los dominios transmembrana y citosólico del extremo N eliminados, y en el que dicha región Fc está ligada al extremo C del componente NPP1.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho componente NPP1 presenta la secuencia de
10 aminoácidos especificada de P99 a D925 de la SEQ ID NO: 1.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, que presenta la secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID NO: 22, opcionalmente sin el péptido señal en su extremo N.
- 15 4. El polipéptido de la reivindicación 3, en el que dicho polipéptido forma un homodímero.
5. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de ADN que codifica el componente NPP1 y una secuencia de ADN que codifica la región Fc, en el que el extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica el componente NPP1 está ligado, con o sin un ligador,
20 al extremo 5' de la secuencia de ADN que codifica la región Fc, de manera que los marcos de lectura de la secuencia están en fase.
6. El ácido nucleico de la reivindicación 5 que presenta una secuencia de nucleótidos, tal como se especifica en la SEQ ID NO:21.
- 25 7. Un vector de expresión que transporta el ácido nucleico aislado de la reivindicación 5.
8. Un procedimiento para producir un polipéptido aislado, según se reivindica en la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento la expresión de las secuencias de ADN de la reivindicación 5 en una única proteína
30 de fusión que presenta la actividad biológica de dicho componente NPP1 y dicha región Fc.
9. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en combinación con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 10. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido aislado de la reivindicación 1, para su uso en terapia.
11. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido aislado de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento del bloqueo arterial, la calcificación arterial generalizada de la infancia, la resistencia a la insulina, el
40 raquitismo hipofosfatémico o la osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna vertebral.

NPP1 (tipo salvaje)

MERDGCAGGGSRGGEGRAPREGPAGNGRDRGRSHAAEAPGDPQAAASLLAPMDVGEEPLEKAARA
RTAKDPNTYKVLVLSVLCVLTTLGCI FGLK**PSCAKE**VKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQET
 CIEPEHIWTCNKFRCEKRLTRSLCACSDDCCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCP**AGFETP**
 PTLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDP
 KMN**AS**FSLSKEKFNPEWYKGEPWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMY**NG**SVPFEEERILAV
 LQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILISD
 HGMEQGSCKKIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHF
 LPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLAL**NP**SERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGIEADTF
 ENIEVYNLMCDLL**NLTPAPN**NGTHGSLNHLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSC**NP**SILPI
 EDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDR**ND**SFSTE
 DFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYK**NNT**KVSYGFLSPPQLKN**SS**GIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHD
 TLLRKYAERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLENLRQRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPHLCENL
 DTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQ
 ED (SEQ ID NO:1)

Fig. 1

sssNPP1 (dominio catalítico de NPP1 sin TAG)

AGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDN
 KMYDPKMN**AS**FSLSKEKFNPEWYKGEPWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMY**NG**SVPF
 EERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCL
 NLILISDHGMEQGSCKKIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFK
 PYLKHF LPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLAL**NP**SERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKHG
 IEADTFENIEVYNLMCDLL**NLTPAPN**NGTHGSL (SEQ ID NO:2)

Fig. 2

TAGsssNPP1 (D8 de extremo N)

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASM**DDDDDDDD**DAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCG
 TYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKY
 QGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYG
 PVSSEVIKALQRVDGMVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPA
 ARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSE
 RKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFGKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSL (SEQ
 ID NO:3)

Fig. 3

TAGsssNPP1 (D10 de extremo C)

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMMAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPV
 YPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKYQGLKSGTFF
 WPGSDVEINGIFPDYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKAL
 QRVDGMVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVP
 DKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFH
 GSDNVFSNMQALFVGYPGFGKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSL**DDDDDDDDDD**
 (SEQ ID NO:4)

Fig. 4

TAGssNPP1 (D8 de extremo N)

ATGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCA
 TGGATGACGATGATGACGACGATGACGCAGGGTTTGAAACGCCTCCTACACTCTTGTTTTCTTTGGATGGATT
 CAGGGCAGAATATTTGCACACTTGGGGTGGACTTCTTCTGTTATTAGCAAACCTCAAAAAATGTGGAACATAT
 ACTAAAAACATGAGACCGGTGTATCCAACAAAACTTTCCCAATCACTACAGCATTGTCCACCGGATTGTATCC
 AGAATCTCATGGCATAATCGACAATAAGATGTATGATCCCAAAATGAATGCTTCCTTTTCACTTAAAAAGTAAAG
 AGAAATTTAATCCGGAGTGGTACAAAGGAGAACCAATTTGGGTACAGCTAAGTATCAAGGCCTCAAGTCTG
 GCACATTTTTCTGGCCAGGATCAGATGTGGAAATTAACGGAATTTCCAGACATCTATAAAATGTATAATGGT
 TCAGTGCCATTTGAAGAAAGGATTTTGGCTGTTCTTCAGTGGCTGCAGCTTCCAAAAGATGAAAGACCACT
 TTTACACTTTGTATTTGGAAGAACCAGATTCTTCAGGTCATTATGATGGACAGTCAGCAGTGAAGTCATCAAA
 GCCTTGACAGAGGGTTGATGGTATGGTTGGTATGCTGATGGATGGTCTGAAAGAGCTGAAGTGCACAGATGC
 CTGAACCTCATCCTTATTTAGATCATGGCATGGAACAAGGCAGTTGTAAGAAATACATATATCTGAATAAGTA
 TTTGGGGGATGTAAAAATATTAAGTTATCTATGGACCTGCAGCTCGATTGAGACCCTCTGATGTCCCAGATA
 AATACTATTCATTTAACTATGAAGGCATTGCCCCGAAATCTTCTTGCCGGGAACCAACCAGCACTTCAAACCT
 TATCTGAAACATTTCTTGCTAAGCGTTTGCACTTTGCTAAGAGTGATAGAATTGAGCCCTTGACATTCTATTTG
 GACCTCAGTGGCAACTTGCATTGAATCCCTCAGAAAGGAAATATTGTGGAAGTGGATTTTCATGGCTCTGACA
 ATGTGTTTTCAAATATGCAAGCCCTCTTGTTGGCTATGGACCTGGATTCAAGCATGGCATTGAGGCTGACACC
 TTTGAAAACATTGAAGTCTATAACTTGATGTGTGATTGCTGAATTTGACACCGGCTCCTAATAACGGAACCTCA
 TGGAAGTCTTAACCACCTTCTGAAGAATCCTGTTTATACGCCAAAGCATCCCAAAGAAGTGCACCCCTGGTGC
 AGTGCCCTTCACAAGAAACCCAGAGATAACCTTGGCTGCTCATGTAACCTTCCATTTTGCCGATTGAGGAT
 TTTCAAACACAGTTCAATCTGACCGTGGCAGAAGAGAAGATTATTAAGCATGAAACTTTGCCCTATGGAAGAC
 CTAGAGTTCTCCAGAAGGAAAACACCATCTGTCTTCTTCCAGCACCAGTTTATGAGTGGATACAGCCAAGAC
 ATCTTGATGCCCCCTTGGACATCCTATACCGTGGACAGAAATGACAGTTTCTCTACGGAAGACTTCTCCAACCTG
 TCTGTACCAGGACTTTAGAATTCCTCTTAGTCCTGTCCATAAATGTTCAATTTATAAAAAATAACACCAAAGTGAG
 TTACGGGTTCTCTCCCCACCACAACCTGAATAAGAATTCAAGTGGAAATATATTCTGAAGCCTTGCTTACTACAA
 ATATAGTGCCAATGTACCAGAGTTTTCAAGTTATATGGCGCTACTTTCATGACACCCTCTGCGAAAGTATGCA
 GAAGAAAGAAATGGTGTCAATGTCGTCAGTGGTCCTGTGTTTACTTTGATTATGATGGACGTTGTGATTCTT
 TGGAGAATTTGAGGCAAAAAAGAGAGTCATCCGTAACCAAGAAATTTTGATTCCAACCTCATTTCTTCATTGTG
 CTGACAAGCTGTAAAGATACATCTCAGACGCCTTTGCACTGTGAAAACCTGGACACCTTGGCTTTCAATTTGCC
 TCACAGGACTGATAACAGCGAGAGCTGTGTGCATGGGAAGCATGACTCCTCATGGGTGAAGAATTGTTGAT
 GTTGACAGAGCACGGATCACAGACGTCGAGCACATCACTGGACTCAGCTTTTATCAACAAAGAAAAGAGCC
 AGTTTCAGACATTTTGAAGTTGAAAACACATTTGCCAACCTTAGCCAAGAAGATTGA (SEQ ID NO:5)

Fig. 5

TAGssNPP1 (D8 de extremo N; la secuencia del péptido señal está subrayada y el grupo diana está en negrita)

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASM**DDDDDDDD**AGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCG
 TYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKY
 QGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDYKMYNGSVPFEEIRLAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYG
 PVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGP
 AARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNP
 SERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLN
 HLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRV
 LQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTK
 VSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQS FQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDQD
 GRCDLENLRQRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSS
 WVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQED (SEQ ID NO:6)

Fig. 6

ssNPP1 (2238pb)

ATGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCA
 TGGCAGGGTTTGAAACGCCTCCTACACTCTTGTTTTCTTGGATGGATTGAGGGCAGAATATTTGCACACTTGG
 GGTGGACTTCTTCCTGTTATTAGCAAACCTCAAAAAATGTGGAACATATACTAAAAACATGAGACCGGTGTATC
 CAACAAAAACTTTCCCAATCACTACAGCATTGTCACCGGATTGTATCCAGAATCTCATGGCATAATCGACAAT
 AAGATGTATGATCCCAAATGAATGCTTCCTTTTCACTTAAAAAGTAAAGAGAAATTTAATCCGGAGTGGTACA
 AAGGAGAACCAATTTGGGTACAGCTAAGTATCAAGGCCTCAAGTCTGGCACATTTTTCTGGCCAGGATCAGA
 TGTGGAAATTAACGGAATTTTCCAGACATCTATAAAATGTATAATGGTTCAGTGCCATTTGAAGAAAGGATTT
 TGGCTGTTCTTCAGTGGCTGCAGCTTCCAAAAGATGAAAGACCACACTTTTACACTTTGTATTTGGAAGAACCA
 GATTCTTCAGGTCAATTCATATGGACCAGTCAGCAGTGAAGTCATCAAGCCTTGCAAGGGTTGATGGTATGG
 TTGGTATGCTGATGGATGGTCTGAAAGAGCTGAACTTGACAGATGCCTGAACCTCATCCTTATTTAGATCAT
 GGCATGGAACAAGGCAGTTGTAAGAAATACATATATCTGAATAAGTATTTGGGGGATGTTAAAAATATTA
 GTTATCTATGGACCTGCAGCTCGATTGAGACCCTCTGATGTCCAGATAAATACTATTCAATTAAGTATGAAGG
 CATTGCCCCGAAATCTTTCTTGCCGGGAACCAACCAGCACTTCAACCTTATCTGAAACATTTCTTGCTAAGC
 GTTTGCACTTTGCTAAGAGTGATAGAATTGAGCCCTTGACATTCTATTTGGACCCTCAGTGGCAACTTGCATTG
 AATCCCTCAGAAAGGAAATATTGTGGAAGTGGATTTTCATGGCTCTGACAATGTGTTTTCAAATATGCAAGCCC
 TCTTTGTTGGCTATGGACCTGGATTCAAGCATGGCATTGAGGCTGACACCTTTGAAACATTGAAGTCTATAAC
 TTGATGTGTGATTTGCTGAATTTGACACCGGCTCCTAATAACGGAACCTCATGGAAGTCTTAACACCTTCTGAA
 GAATCCTGTTTATACGCCAAAGCATCCCAAAGAAGTGACCCCCCTGGTGCAAGTCCCCCTTCAAGAAACCCC
 AGAGATAACCTTGGCTGCTCATGTAACCTTCCATTTTCCGATTGAGGATTTTCAAACACAGTTCAATCTGAC
 CGTGGCAGAAGAGAAGATTATTAAGCATGAACTTTGCCCTATGGAAGACCTAGAGTTCTCCAGAAGGAAAA
 CACCATCTGTCTTCTTTCCAGCACCAGTTTATGAGTGGATACAGCCAAGACATCTTGATGCCCCCTTGGACATC
 CTATACCGTGGACAGAAATGACAGTTTCTCTACGGAAGACTTCTCCAAGTGTCTGTACCAGGACTTTAGAATTC
 CTCTTAGTCCTGTCCATAAATGTTCAATTTATAAAAAATAACACCAAAGTGAGTTACGGGTTCTCTCCCCACCAC
 AACTGAATAAGAATTCAAGTGAATATATTCTGAAGCCTTGCTTACTACAAATATAGTGCCAATGTACCAGAG
 TTTTCAAGTTATATGGCGCTACTTTCATGACACCCTCTTGCGAAAGTATGCAGAAGAAAGAAATGGTGTCAAT
 GTCGTCAGTGGTCCTGTGTTTGACTTTGATTATGATGGACGTTGTGATTCTTGAGAAATTTGAGGCAAAAAA
 GAAGAGTCATCCGTAACCAAGAAATTTTGATTCCAACCTCATTTCTTCATTGTGCTGACAAGCTGTAAAGATACA
 TCTCAGACGCCTTTGCACTGTGAAAACCTGGACACCTTGGCTTTCAATTTGCCTCACAGGACTGATAACAGCGA
 GAGCTGTGTGCATGGGAAGCATGACTCCTCATGGGTTGAAGAATTGTTGATGTTGCACAGAGCACGGATCAC
 AGACGTCGAGCACATCACTGGACTCAGCTTTTATCAACAAAGAAAAGAGCCAGTTTCAGACATTTTGAAGTTG
 AAAACACATTTGCCAACCTTTAGCCAAGAAGAT (SEQ ID NO:7)

Fig. 7

ssNPP1 (la secuencia del péptido señal está subrayada)

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPV
 YPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKYQGLKSGTFF
 WPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKAL
 QRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDV
 PDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYCGSG
 FHGSDNVFSNMQALFVGYPGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTP
 KHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLS
 QHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQL
 NKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDSENLRLQ
 KRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRA
 RITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLTPLTFSQED (SEQ ID NO:8)

Fig. 8

sNPP1

ATGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCA
 TGCCAAGTTGTGCCAAAGAAGTTAAAAGTTGCAAAGGTCGCTGTTTCGAGAGAACATTTGGGAACTGTCGCT
 GTGATGCTGCCTGTGTTGAGCTTGAAACTGCTGTTTGGATTACCAGGAGACGTGCATAGAACAGAACATAT
 ATGGACTTGCAACAAATTCAGGTGTGGTGAGAAAAGATTGACCAGAAGCCTCTGTGCCTGTTTCAGATGATTGC
 AAGGACAAGGGCGACTGCTGCATCAACTACAGTTCAGTGTGTCAAGGTGAGAAAAGTTGGGTGGAAGAACC
 ATGTGAGAGCATTAAATGAGCCACAGTGCCCAGCAGGGTTTGAAACGCCTCCTACACTCTTGTTTTCTTTGGATG
 GATTACAGGGCAGAATATTTGCACACTTGGGGTGGACTTCTTCCTGTTATTAGCAAACCTCAAAAAATGTGGAAC
 ATATACTAAAAACATGAGACCGGTGTATCCAACAAAAACCTTCCCCAATCACTACAGCATTGTCACCGGATTGT
 ATCCAGAATCTCATGGCATAATCGACAATAAGATGTATGATCCCAAAATGAATGCTTCCTTTTCACTTAAAAGT
 AAAGAGAAATTTAATCCGGAGTGGTACAAAGGAGAACCAATTTGGGTACAGCTAAGTATCAAGGCCTCAAG
 TCTGGCACATTTTCTGGCCAGGATCAGATGTGGAAATTAACGGAATTTTCCAGACATCTATAAAATGTATAA
 TGGTTCAGTGCCATTTGAAGAAAAGGATTTTGGCTGTTCTTCAGTGCTGCAGCTTCCAAAAGATGAAAGACCA
 CACTTTTACACTTTGTATTTGGAAGAACCAGATTCTTCAGGTCATTATATGGACCAGTCAGCAGTGAAGTCAT
 CAAAGCCTTGACAGAGGGTTGATGGTATGGTTGGTATGCTGATGGATGGTCTGAAAGAGCTGAACTGCACAG
 ATGCCTGAACCTCATCCTTATTTAGATCATGGCATGGAACAAGGCAGTTGTAAGAAATACATATATCTGAATA
 AGTATTTGGGGGATGTTAAAAATATTAAGTTATCTATGGACCTGCAGCTCGATTGAGACCCTCTGATGTCCCA
 GATAAATACTATTCAATTAAGTATGAAGGCATTGCCGAAATCTTTCTTGCCGGAACCAAAACCAGCACTTCAA
 ACCTTATCTGAAACATTTCTTGCTAAGCGTTTGCACTTTGCTAAGAGTGATAGAATTGAGCCCTTGACATTCTA
 TTTGGACCCTCAGTGGAACCTTGCAATTGAATCCCTCAGAAAGGAAATATTGTGGAAGTGGATTTTCATGGCTCT
 GACAATGTGTTTTCAAATATGCAAGCCCTCTTTGTTGGCTATGGACCTGGATTCAAGCATGGCATTGAGGCTG
 ACACCTTTGAAAACATTGAAGTCTATACTTGATGTGTGATTGCTGAATTTGACACCGGCTCCTAATAACGGA
 ACTCATGGAAGTCTTAACACCTTCTGAAGAATCCTGTTTATACGCCAAAGCATCCCAAAGAAGTGCACCCCT
 GGTGCAGTGCCCTTCACAAGAAACCCAGAGATAACCTTGGCTGCTCATGTAACCTTCCATTTTGCCGATTG
 AGGATTTTCAAACACAGTTCAATCTGACCGTGGCAGAAGAGAAGATTATTAAGCATGAAACTTTGCCCTATGG
 AAGACCTAGAGTTCTCCAGAAGGAAAACACCATCTGTCTTCTTCCAGCACCAGTTTATGAGTGGATACAGCC
 AAGACATCTTGATGCCCCTTTGGACATCCTATACCGTGGACAGAAATGACAGTTTCTCTACGGAAGACTTCTCC
 AACTGTCTGTACCAGGACTTTAGAATTCCTCTTAGTCTGTCCATAAATGTTCAATTTATAAAAAATAACACCAA
 GTGAGTTACGGGTTCTCTCCCCACCACAACCTGAATAAGAATTCAAGTGAATATATTCTGAAGCCTTGCTTAC
 TACAAATATAGTGCCAATGTACCAGAGTTTTCAAGTTATATGGCGCTACTTTCATGACACCCTCTTGCGAAAGT
 ATGCAGAAGAAAGAAATGGTGTCAATGTCGTCAGTGGTCCTGTGTTTGACTTTGATTATGATGGACGTTGTGA
 TTCCTTGGAGAATTTGAGGCAAAAAAGAAGAGTCATCCGTAACCAAGAAATTTTGATTCCAACCTCATTTCTTCA
 TTGTGCTGACAAGCTGTAAAGATACATCTCAGACGCCTTTGCACTGTGAAAACCTGGACACCTTGGCTTTCATT
 TTGCCTCACAGGACTGATAACAGCGAGAGCTGTGTGCATGGGAAGCATGACTCCTCATGGGTTGAAGAATTG
 TTGATGTTGCACAGAGCACGGATCACAGACGTCGAGCACATCACTGGACTCAGCTTTTATCAACAAAGAAAAG
 AGCCAGTTTCAGACATTTTGAAGTTGAAAACACATTTGCCAACCTTAGCCAAGAAGAT (SEQ ID NO:9)

Fig. 9

sNPP1

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMPSCAKEVKSCCKGRFCERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPE
 HIWTCNKFRFCGEKRLTRSLCACSDDCCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLF
 SLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMN
 ASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQ
 WLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHG
 MEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPK
 RLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGPGFKHGIEADTFENI
 EVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIED
 FQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDF
 SNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTL
 LRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDSENLNRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLD
 TLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQE
 D (SEQ ID NO:10)

Fig. 10

TAGsNPP1 (D8 de extremo N)

ATGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCA
 TGGATGACGATGATGACGACGATGACCCAAGTTGTGCCAAAGAAGTTAAAAGTTGCAAAGGTCGCTGTTTCG
 AGAGAACATTTGGGAACTGTCGCTGTGATGCTGCCTGTGTTGAGCTTGGAAGCTGCTGTTTGGATTACCAGGA
 GACGTGCATAGAACCAGAACATATATGGACTTGCAACAAATTCAGGTGTGGTGAGAAAAGATTGACCAGAAG
 CCTCTGTGCCTGTTTCTGATGATTGCAAGGACAAGGGCGACTGCTGCATCAACTACAGTTCAGTGTGTCAAGGT
 GAGAAAAGTTGGGTGGAAGAACCATGTGAGAGCATTAAATGAGCCACAGTGCCAGCAGGGTTTGAAACGCC
 TCCTACACTCTTGTTCCTTTGGATGGATTGAGGGCAGAATATTTGCACACTTGGGGTGGACTTCTTCCTGTTAT
 TAGCAAACTCAAAAAATGTGGAACATATACTAAAAACATGAGACCGGTGTATCCAACAAAACTTTCCCAAT
 CACTACAGCATTGTCACCGGATTGTATCCAGAATCTCATGGCATAATCGACAATAAGATGTATGATCCCAAAAT
 GAATGCTTCCTTTTCACTTAAAAAGTAAAGAGAAAATTTAATCCGGAGTGGTACAAAGGAGAACCAATTTGGGTC
 ACAGCTAAGTATCAAGGCCTCAAGTCTGGCACATTTTCTGGCCAGGATCAGATGTGGAAATTAACGGAATTT
 TCCAGACATCTATAAAATGTATAATGGTTTCAAGTGCCATTTGAAGAAAGGATTTTGGCTGTTCTTCAAGTGGCTG
 CAGCTTCCAAAAGATGAAAGACCACACTTTTACACTTTGTATTTGGAAGAACCAGATTCTTCAAGTCAATCATA
 TGGACCAGTCAGCAGTGAAGTCATCAAAGCCTTGACAGAGGGTTGATGGTATGGTTGGTATGCTGATGGATGG
 TCTGAAAGAGCTGAACTTGACACAGATGCCTGAACCTCATCCTATTTTCAAGTATGATGGCAGTGAACAAGGCAGT
 TGTAAGAAATACATATATCTGAATAAGTATTTGGGGGATGTTAAAAATATTAAAGTTATCTATGGACCTGCAG
 CTCGATTGAGACCCTCTGATGTCCAGATAAAATACTATTCAATTAAGTATGAAGGCATTGCCCCGAAATCTTCTT
 GCCGGGAACCAACCAGCACTTCAAACCTTATCTGAAACATTTCTTGCTAAGCGTTTGCACTTTGCTAAGAGT
 GATAGAATTGAGCCCTTGACATTCTATTTGGACCCTCAGTGGCAACTTGCAATTGAATCCCTCAGAAAGGAAAT
 ATTGTGGAAGTGGATTTTCAAGTCTGACAATGTGTTTCAAATATGCAAGCCCTCTTGTGGCTATGGACCT
 GGATTCAAGCATGGCATTGAGGCTGACACCTTTGAAAACATTGAAGTCTATAACTTGATGTGTGATTTGCTGA
 ATTTGACACCGGCTCCTAATAACGGAACCTCATGGAAGTCTTAACCACCTTCTGAAGAATCCTGTTTATACGCCA
 AAGCATCCCAAAGAAGTGCACCCCTGGTGCAGTGCCCTTCAACAAGAAACCCAGAGATAACCTTGGCTGCT
 CATGTAACCTTCCATTTTGCCGATTGAGGATTTTCAAACACAGTTCAATCTGACCGTGGCAGAAGAGAAGATT
 ATTAAGCATGAACTTTGCCCTATGGAAGACCTAGAGTTCTCCAGAAGGAAAACACCATCTGTCTTCTTCCCA
 GCACAGTTTATGAGTGGATACAGCCAAGACATCTTGATGCCCCCTTGGACATCCTATACCGTGGACAGAAAT
 GACAGTTTCTCTACGGAAGACTTCTCCAAGTGTGTGACAGGACTTTAGAATTCCTCTTAGTCTGTCCATAAA
 TGTTCAATTTATAAAAAATAACACCAAAGTGAGTTACGGGTTCTCTCCCCACCACAACCTGAATAAGAATTCAAG
 TGGAATATATTCTGAAGCCTTGCTTACTACAAATATAGTGCCAATGTACCAGAGTTTTCAAGTTATATGGCGCT
 ACTTTCATGACACCCTCTTGCGAAAGTATGCAGAAGAAAGAAATGGTGTCAATGTCGTCAGTGGTCTGTGTT
 TGACTTTGATTATGATGGACGTTGTGATTCTTGGAGAATTTGAGGCAAAAAGAGAGTCATCCGTAACCAA
 GAAATTTGATTCCAACCTCATTTCTTCAATTGTGCTGACAAGCTGTAAAGATACATCTCAGACGCCTTTGCACTGT
 GAAAACCTGGACACCTTGGCTTTTCAATTTGCCTCACAGGACTGATAACAGCGAGAGCTGTGTGCATGGGAAGC
 ATGACTCCTCATGGGTTGAAGAATTGTTGATGTTGCACAGAGCACGGATCACAGACGTCGAGCACATCACTGG
 ACTCAGCTTTTATCAACAAAGAAAGAGCCAGTTTCAGACATTTTGAAGTTGAAAACACATTTGCCAACCTTTA
 GCCAAGAAGAT (SEQ ID NO:11)

Fig. 11

TAGsNPP1 (D8 de extremo N)

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASM**DDDDDDDD**PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCCL
 DYQETCIEPEHIWTCNKFRGKRLTRSLCACSDDCCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCP
 AGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIID
 NKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDYKMYNGSV
 PFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLH
 RCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYESGIARNLSCREPNQ
 HFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGF
 KHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNL
 GCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYT
 VDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQS
 FQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCK
 DTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSD
 ILKCLKTHLPTFSQED (SEQ ID NO:12)

Fig. 12

TAGsNPP1 (D8 de extremo C)

GTGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCA
TGCCAAGTTGTGCCAAAGAAGTTAAAAGTTGCAAAGGTCGCTGTTTCGAGAGAACATTTGGGAACTGTCGCT
GTGATGCTGCCTGTGTTGAGCTTGGAAGCTGCTGTTTGGATTACCAGGAGACGTGCATAGAACCAGAACATAT
ATGGACTTGCAACAAATTCAGGTGTGGTGAGAAAAGATTGACCAGAAGCCTCTGTGCCTGTTGAGATGATTGC
AAGGACAAGGGCGACTGCTGCATCAACTACAGTTTCAGTGTGTCAAGGTGAGAAAAGTTGGGTGGAAGAACC
ATGTGAGAGCATTAAATGAGCCACAGTGCCAGCAGGGTTTGAAACGCCTCCTACACTCTGTTTTCTTTGGATG
GATTCAGGGCAGAATATTTGCACACTTGGGGTGGACTTCTTCTGTTATTAGCAAACCTCAAAAAATGTGGAAC
ATATACTAAAAACATGAGACCGGTGTATCCAACAAAACTTTCCCAATCACTACAGCATTGTCACCGGATTGT
ATCCAGAATCTCATGGCATAATCGACAATAAGATGTATGATCCCAAAATGAATGCTTCTTTTCACTTAAAAGT
AAAGAGAAATTTAATCCGGAGTGGTACAAAGGAGAACCAATTTGGGTCACAGCTAAGTATCAAGGCCTCAAG
TCTGGCACATTTTTCTGGCCAGGATCAGATGTGGAAATTAACGGAATTTCCAGACATCTATAAAATGTATAA
TGTTTCAGTGCCATTTGAAGAAAGGATTTTGGCTGTTCTTCAGTGGCTGCAGCTTCCAAAAGATGAAAGACCA
CACTTTTACACTTTGTATTTGGAAGAACCAGATTCTTCAGGTCATTCATATGGACCAGTCAGCAGTGAAGTCAT
CAAAGCCTTGCAAGGGTTGATGGTATGGTTGGTATGCTGATGGATGGTCTGAAAGAGCTGAACTGCACAG
ATGCCTGAACCTCATCCTTATTTGAGATCATGGCATGGAACAAGGCAGTTGTAAGAAATACATATATCTGAATA
AGTATTTGGGGGATGTTAAAAATATTAAGTTATCTATGGACCTGCAGCTCGATTGAGACCTCTGATGTCCCA
GATAAATACTATTCATTTAACTATGAAGGCATTGCCCCGAAATCTTTCTTGCCGGGAACCAACCAGCACTTCAA
ACCTTATCTGAAACATTTCTTGCTAAGCGTTTGCACTTTGCTAAGAGTGATAGAATTGAGCCCTTGACATTCTA
TTTGGACCTCAGTGGCAACTTGCAATTGAATCCCTCAGAAAGGAAATATTGTGGAAGTGGATTTCATGGCTCT
GACAATGTGTTTTCAAATATGCAAGCCCTCTTTGTTGGCTATGGACCTGGATTCAAGCATGGCATTGAGGCTG
ACACCTTTGAAAACATTGAAGTCTATAACTTGATGTGTGATTTGCTGAATTTGACACCGGCTCCTAATAACGGA
ACTCATGGAAGTCTTAACCACCTTCTGAAGAATCCTGTTTATACGCCAAAGCATCCCAAGAAGTGCACCCCT
GGTGCAGTGCCCCTTACAAGAAACCCAGAGATAACCTTGGCTGCTCATGTAACCTTCCATTTTGGCGATTG
AGGATTTTCAAACACAGTTCAATCTGACCGTGGCAGAAAGAGAAGATTATTAAGCATGAACTTTGCCCTATGG
AAGACCTAGAGTTCTCCAGAAGGAAAACACCATCTGTCTTCTTCCAGCACCAGTTTATGAGTGGATACAGCC
AAGACATCTTGATGCCCCTTTGGACATCCTATACCGTGGACAGAAATGACAGTTTCTCTACGGAAGACTTCTCC
AACTGTCTGTACCAGGACTTTAGAATTCCTCTTAGTCCTGTCCATAAATGTTCATTTTATAAAAAATAACACCAAA
GTGAGTTACGGGTTCTCTCCCCACCACAACCTGAATAAGAATTCAAGTGGAATATATTCTGAAGCCTTGCTTAC
TACAAATATAGTGCCAATGTACCAGAGTTTTCAAGTTATATGGCGCTACTTTCATGACACCTCTTGCGAAAGT
ATGCAGAAGAAAGAAATGGTGTCAATGTCGTGAGTGGTCCTGTGTTTGACTTTGATTATGATGGACGTTGTGA
TTCCTTGGAGAATTTGAGGCAAAAAAGAAGAGTCATCCGTAACCAAGAAATTTTGATTCCAACCTCATTTCTTCA
TTGTGCTGACAAGCTGTAAAGATACATCTCAGACGCCTTTGCACTGTGAAAACCTGGACACCTTGCTTTTCA
TTGCCTCACAGGACTGATAACAGCGAGAGCTGTGTGCATGGGAAGCATGACTCCTCATGGGTTGAAGAATTG
TTGATGTTGCACAGAGCACGGATCACAGACGTCGAGCACATCACTGGACTCAGCTTTTATCAACAAAGAAAAG
AGCCAGTTTCAGACATTTTGAAGTTGAAAACACATTTGCCAACCTTTAGCCAAGAAGATGATGACGATGATGA
CGACGATTGA (SEQ ID NO:13)

Fig. 13

TAGsNPP1 (D8 de extremo C; la secuencia del péptido señal está subrayada y el grupo diana está en negrita)

QGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCN
KFRCGEKRLTRSLCACSDDCCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHT
WGGLLPVISKLLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKG
EPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGH
SYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILSDHGMEQGSCKKYIYNKYLGDVKNIKVIYGPAARL
RPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFH
GSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHP
LVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDIL
MPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMY
QSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVFDFDYDGRCDSENLNRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQT
PLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFS
QEDDDDDDDDD (SEQ ID NO:14)

Fig. 14

Péptido ligador

GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:15)

Fig. 15

La secuencia de aminoácidos de la región Fc

EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:16)

Fig. 16

**La secuencia de aminoácidos de la TAGsssNPP1 (D8 de extremo C) + Fc +
Ligador**

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMEEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
DGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK **DDDDDDDD**
GGGGSGGGGSAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVT
GLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDI
YKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMD
GLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYESGIARNL
SCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYGSGFGHSDNVFSNMQALF
VGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSL (SEQ ID NO:17)

Fig. 17

**La secuencia de aminoácidos de la TAGsssNPP1 (D8 de extremo C) + Fc +
Ligador**

IGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTW
GGLLPVISLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPE
WYKGEPWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDYIKMYNGSVPFEEILAVLQWLQLPKDERPHFYT
LYLEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMLMDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKIYLNKY
LGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYL
DPQWQLALNPSEKCYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFGKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAP
NNGTHGSLGGGGSGGGGS **DDDDDDDD** (SEQ ID NO: 18)

Fig. 18

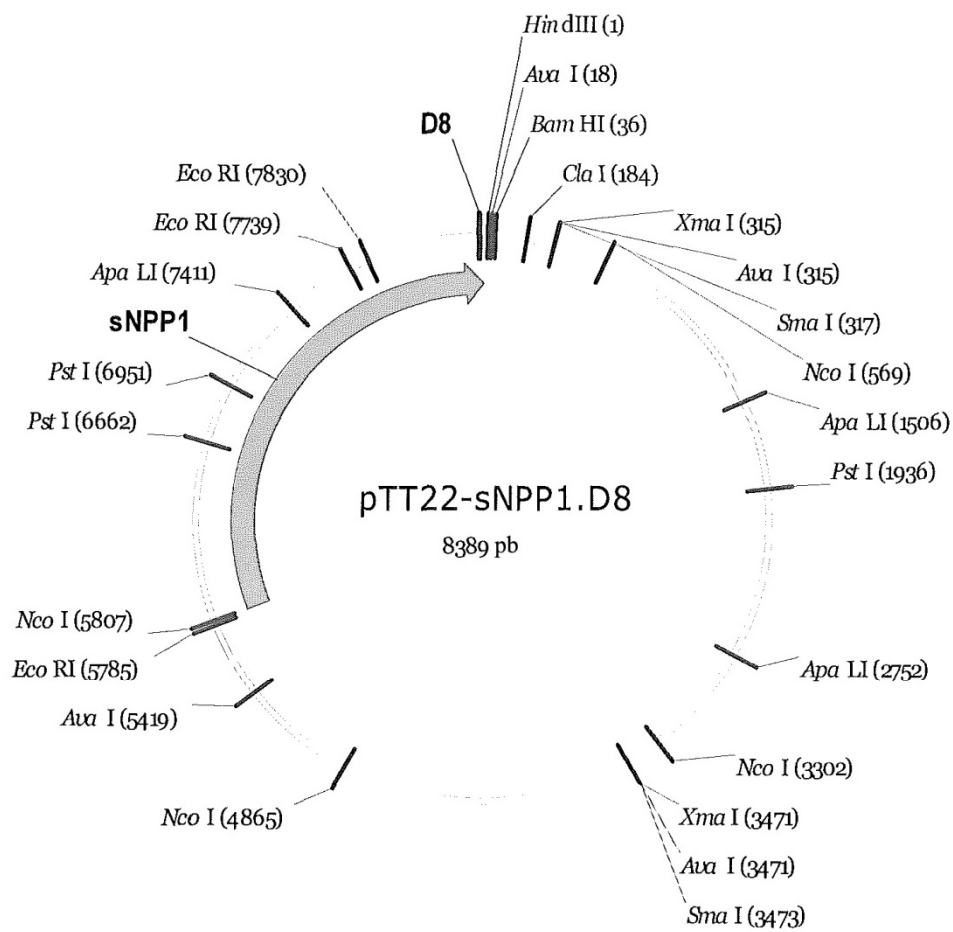


Fig. 19

Análisis Western

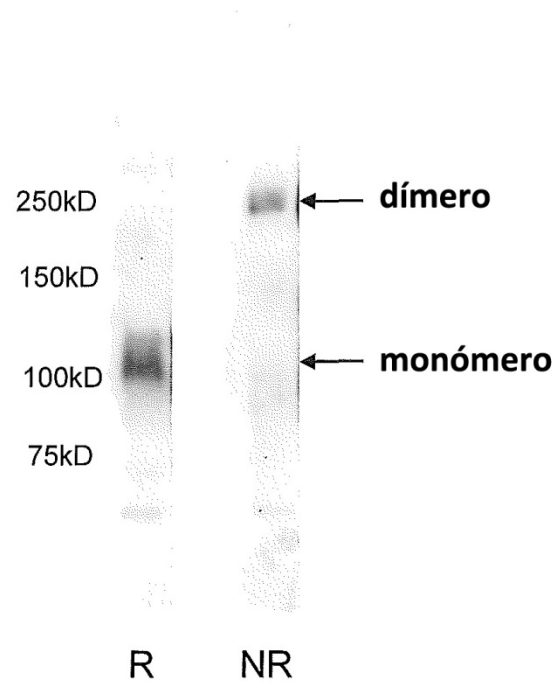


Fig. 20

Ensayo de actividad enzimática de la TAGsNPP1 soluble

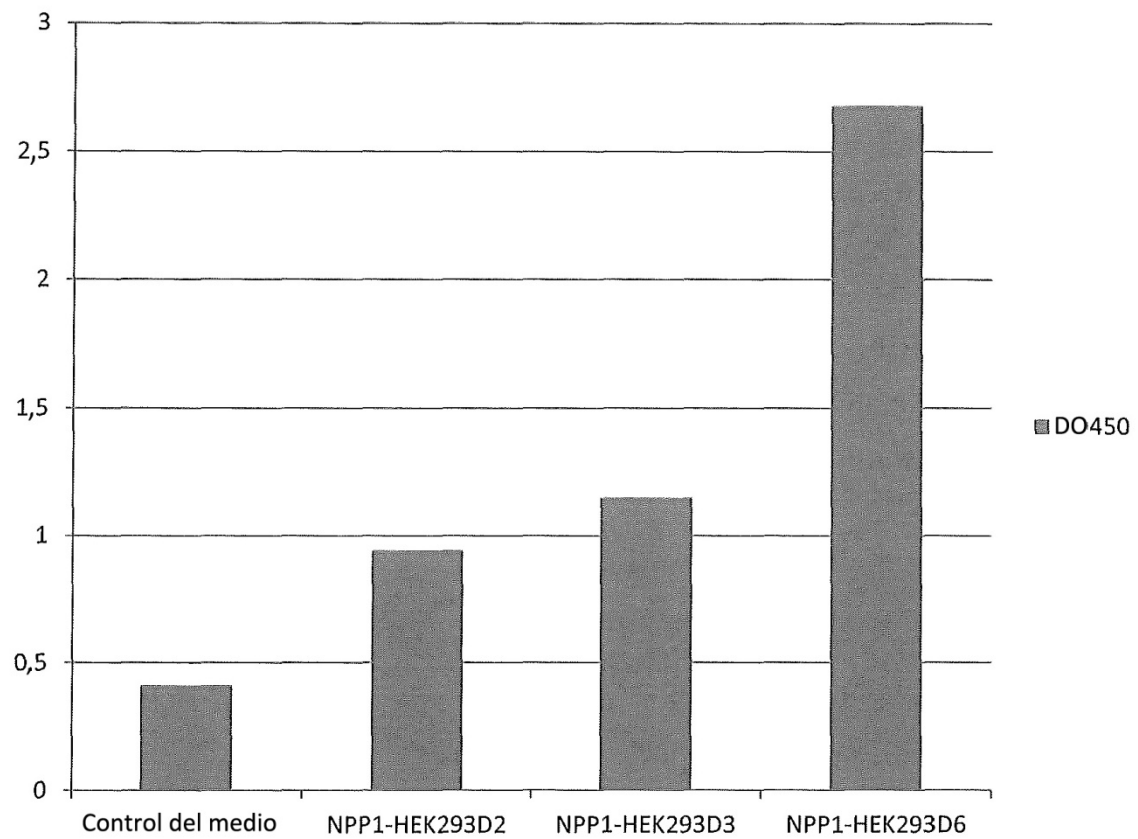


Fig. 21

Proteínas de fusión NPP1 recombinantes

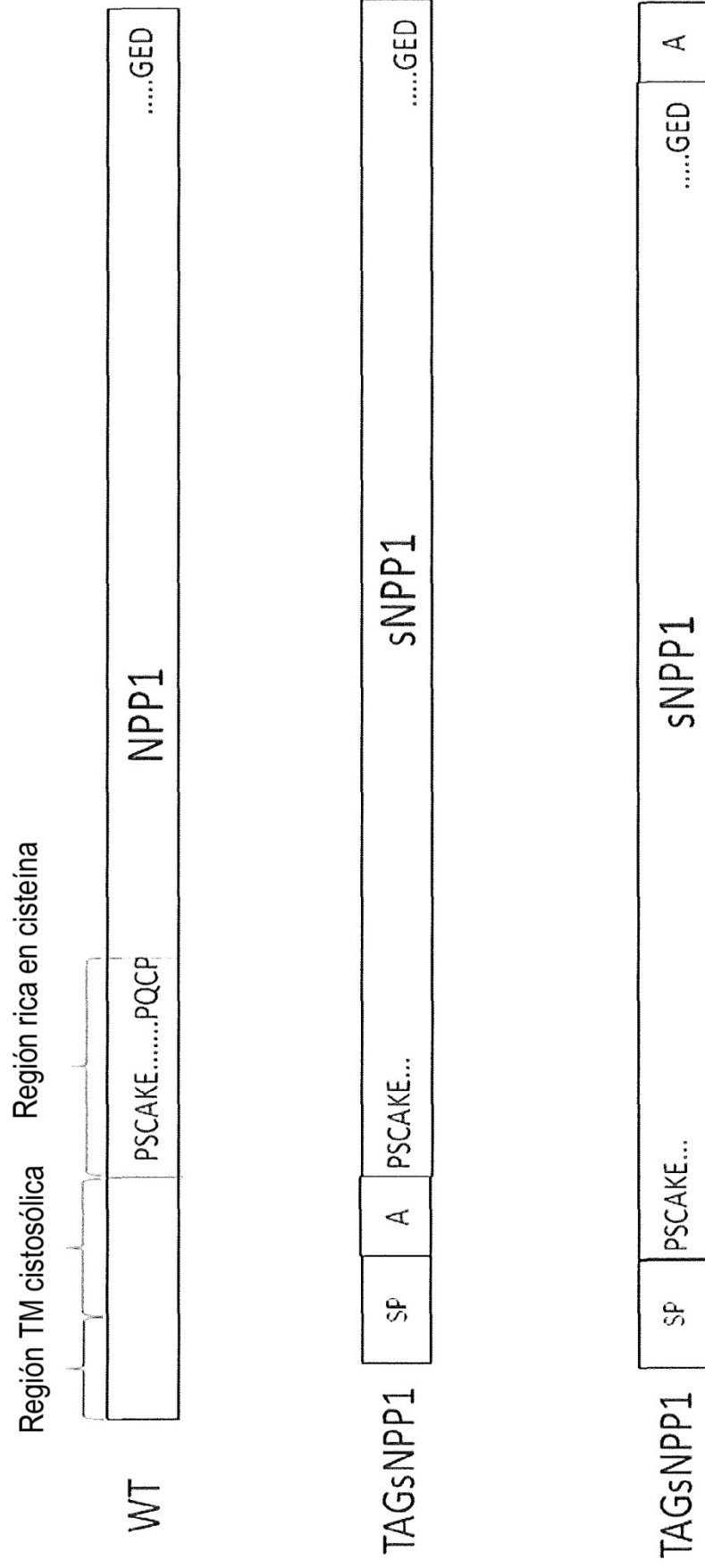


Fig. 22A

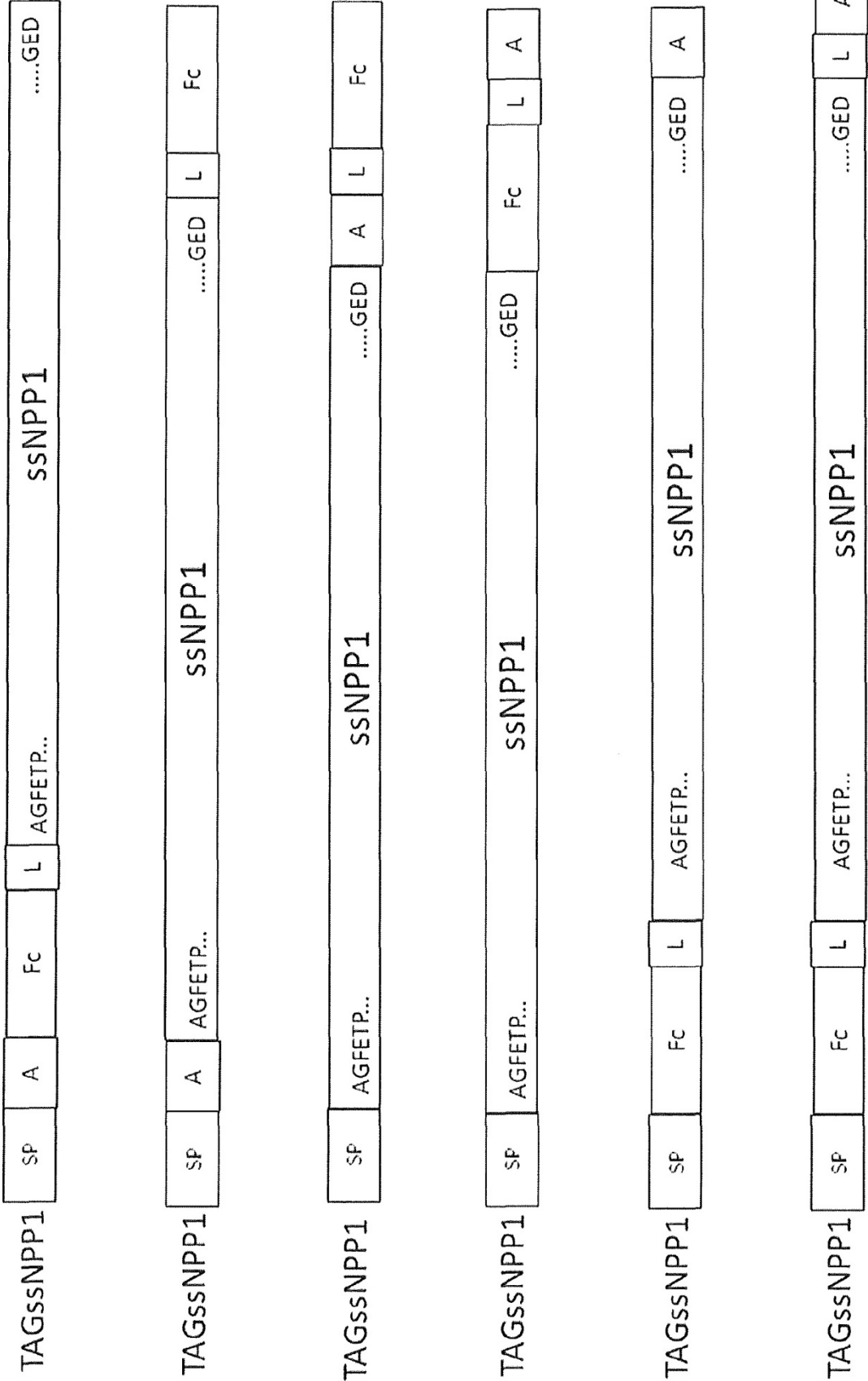


Fig. 22B

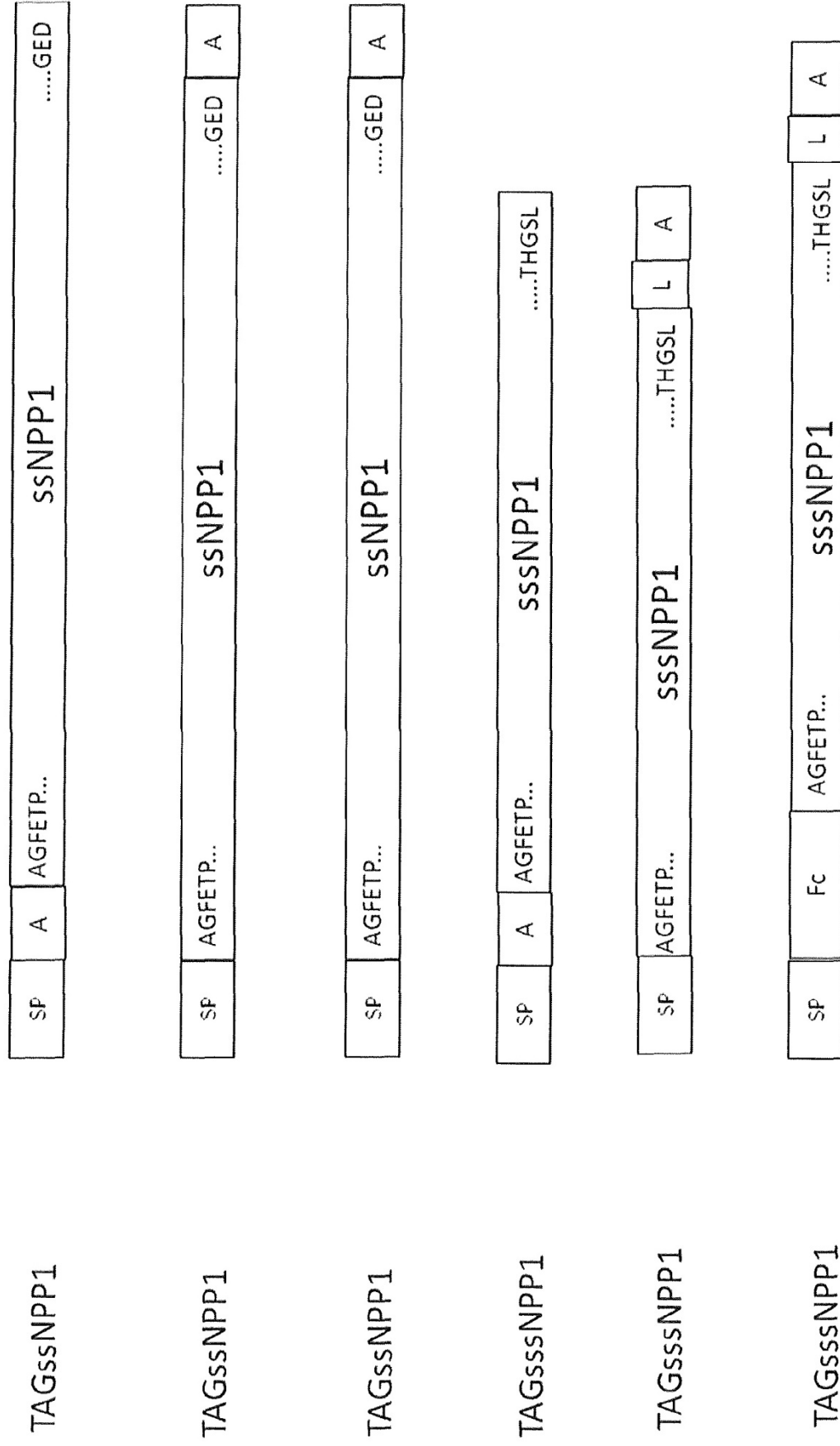


Fig. 22C

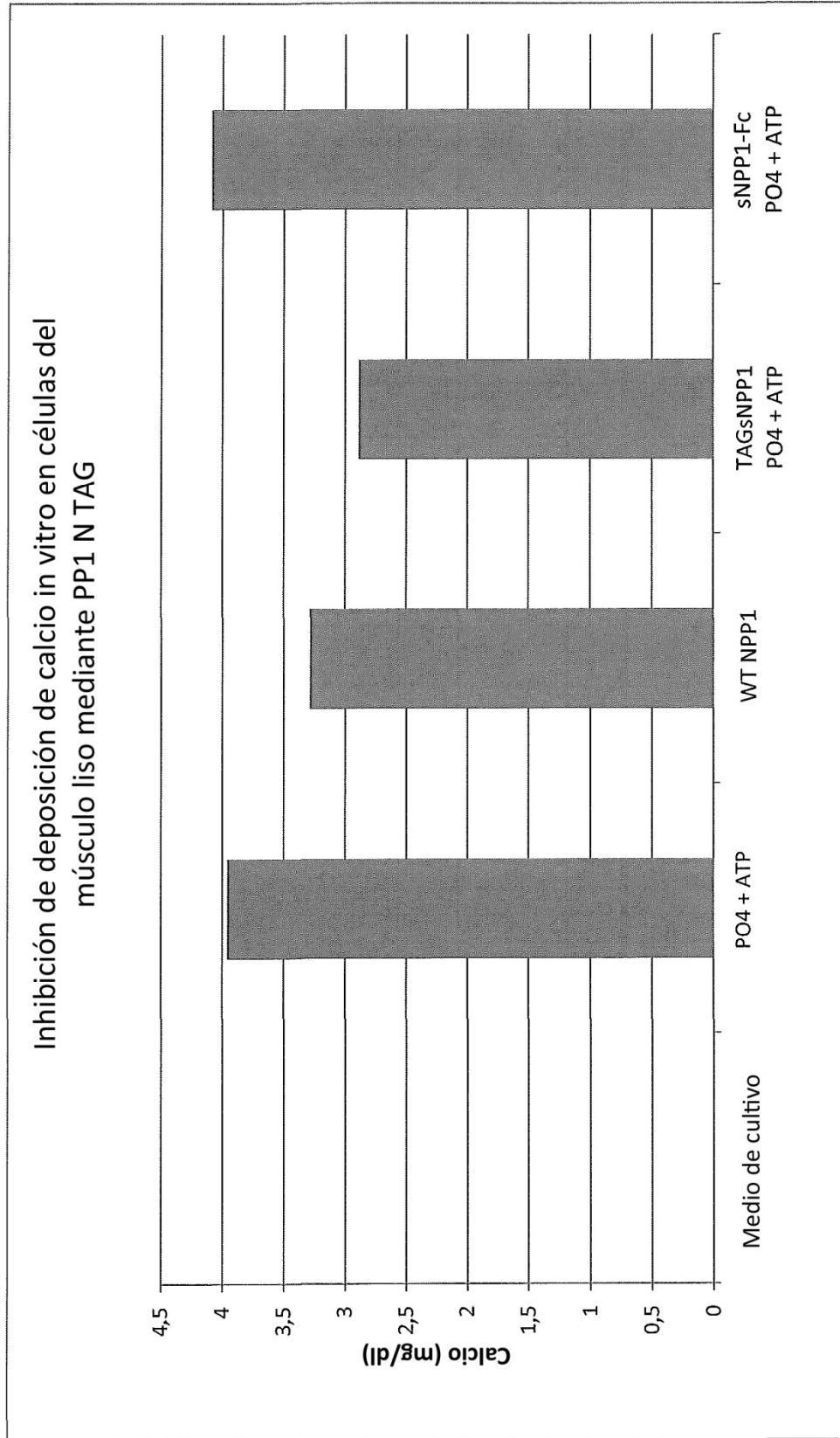


Fig. 23

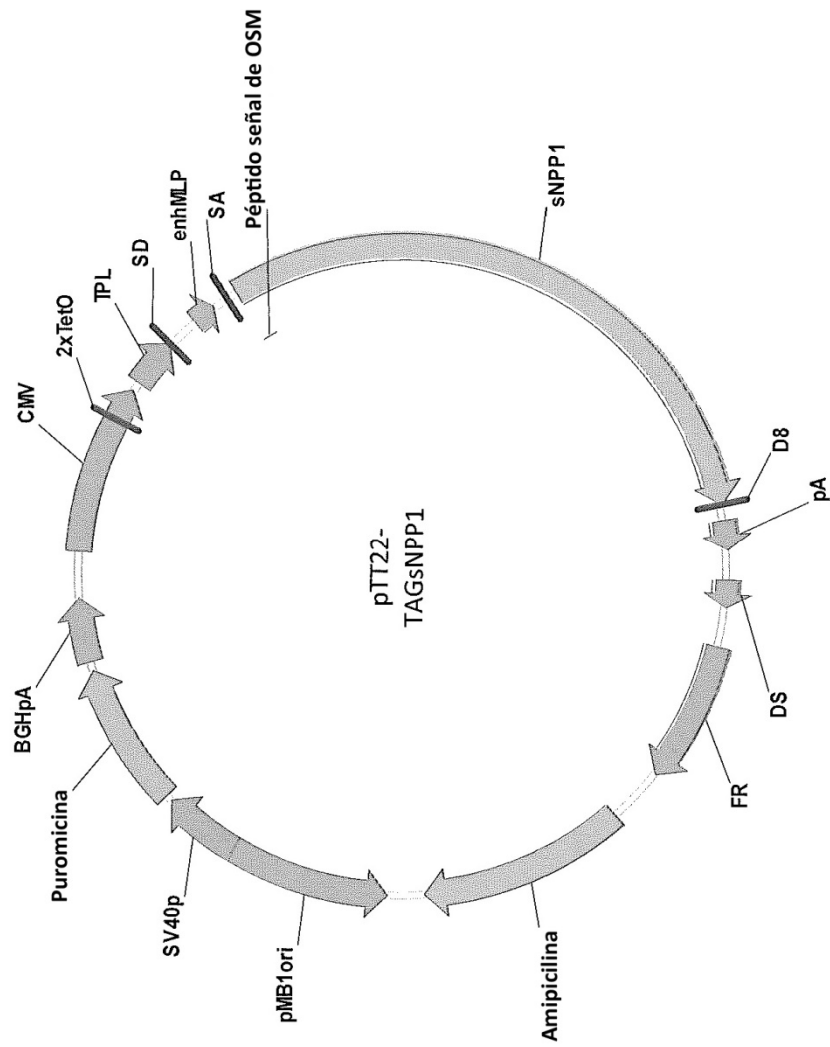


Fig. 24

Secuencia de ADN de TAGsNPP1 (D8)

atgggtgtactgctcacacagaggaacgctgctcagtcgtggtccttgcaactcctgtttccaagcatggcgagcatgccaaagtgtgtgccaaagaagt
aaaagtgcgaaggtcgctgtttcgagagaacatttgggaactgtcgctgtgatgctgcctgtgttgagcttggaactgctgtttggattaccag
gagcgtgcatagaaaccagaaacatatatggacttgcaacaaattcaggtgtggtgagaaaagattgaccagaagcctctgtgcctgttcagatgat
tgcaaggacaaggcgactgctgcatcaactacagttcagtggtcaaggtgagaaaagttgggtggaagaacctgtgagagcattaatgagcca
cagtgcccagcagggtttgaaacgcctcctacactctgttttcttggatggattcagggcagaatatgtcacacttgggtggacttcttct
gttattagcaaaactcaaaaaatgtggaacatatatactaaaaacatgagaccggtgtatccaacaaaaactttcccaatcactacagcattgtcacc
ggattgtatccagaatctcatggcataatcgacaataagatgtatgatccccaaaatgaatgcttcttttcaacttaaaagtaaaagagaaattta
ccggagtgttacaaaggagaaccaaatttgggtcacagctaaagtatcaaggcctcaagctcaagctgtggcacatttttctggccaggatcagatgtgga
aacggaattttccagacatctataaaaatgtataatgggtcagtgccatttgaagaaaggattttggctgttcttcagtggtgctgcagcttccaaa
gatgaaagaccacacttttacactttgtatttggagaacaccagattcttcaggtcattcatatggaccagtcagcagtgaaagtcatacaagccttg
cagagggttgatgggtatgggttggtatgctgatggatgggtctgaaagagctgaacttgacagatgcctgaacctcatccttatttcagatcatggc
atggaacaaggcagttgtaagaaatacatatatctgaataagtatttggggatgttaaaaaattataaagtatatctatggacctgcagctcgattg
agacctctgatgtcccagataaatactattcatttaactatgaaggcattgccgaaatcttcttgcgggaaccaaaccagcacttcaaacct
tatctgaaacatttcttgccctaaagcgttttgcaactttgctaagagtatagaattgagcccttgacattctatttgacccctcagtggaacttgca
ttgaatccctcagaaggaataattgtggaagtggatttcatggctctgacaattgtgttttcaaatatgcaagccctcttggctatggacct
ggattcaagcatggcattgaggctgacaccttgaagaatcctgtttatacgccaagcatcccaagaaagtgcaacccctggtgcagtgcccttcaca
gaaaccccgagagataaccttggctgctcatgtaaccttccatttgcgattgaggttttcaaacacagttcaatctgacctggcagaagag
aagattattaagcatgaaacttgcctatggaagacctagagttctccagaaggaacacacctctgtcttcttccagcaccagtttatgagt
ggatacagccaagacatcttgatgcccccttggacatcctataccgtggacagaaatgacagtttctctacggaagacttctccaaactgtctgtac
caggactttagaattcctcttagtcctgtccataaatgttcattttataaaaaataacaccaaagtgaattacgggttctctccccacacaaactg
aataagaattcaagtggaatatattctgaagccttgcttactacaaaataagtccaatgtaccagagttttcaagttatatggcgctactttcat
gacacctcttgcgaaagtatgcagaagaaagaaatgggtcgaatgtcgtcagtggtcctgtgtttgactttgattatgatggacgttgtgattcc
ttggagaatttggaggcaaaaaagaaagatcatccgtaaaccaagaaattttgattccaactcatttcttcatgtgtgacaaagtgtaaagataca
tctcagacgcctttgcaactgtgaaacacctggacaccttggcttcattttgctcacaggactgataacagcgagagctgtgtgcatgggaagcat
gactcctcatgggttgaagaattgttgatgttgacagagcagcgatcacagacgtcgagcacatcactggactcagcttttatcaacaaagaaaa
gagccagtttcagacattttgaagttgaaaacacacatttggccaaacctttagccaaagaagatgatgacgatgatgacgacgattga

Fig. 25

(SEQ ID NO: 19)

Secuencia de aminoácidos de TAGSNPP1(D8)

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMPSCAKEVKSCCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRLTRSLCACSD
CKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCEINEPQCPAGFETPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVT
GLYPESHGIIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPK
DERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGFPVSSEVIKALQQRVDGMVGLMDGLKELNLRCLNLIISDHGMEQGSCCKYIYLNKYLGVDVKNIKVIYGPAAARL
RPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYP
GFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLKKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEE
KIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPQQL
NKNSSGIYSEALITTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLIRKYAEERNGVNVSGPVDFDYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEIILIPTHFFIVLTSCKDT
SQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDDDDDDDDD

(SEQ ID NO: 20)

Fig. 26

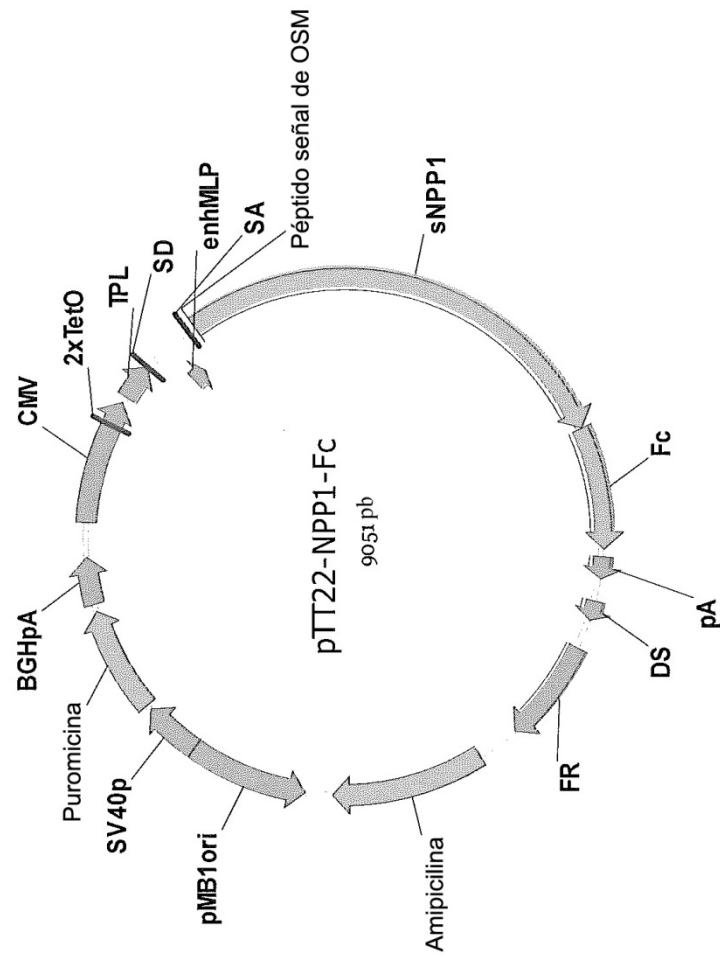


Fig. 27

Fig. 28

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMPSCAKEVKCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCKEKRLLTRSLCACSD
 CKDKGCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPTLLFSLDGFRAEYLLHTWGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVT
 GLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVFEEERILAVLQWLQLPK
 DERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARL
 RPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQALALNPSEKCYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYP
 GFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEE
 KIIKHETLPYGRPRVLKENTICLLSQHQFMMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQL
 NKNSSGIYSEALLTINIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNGVNVSGPVDFDYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEIILIPTHFFIVLTSCKDT
 SQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLIMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 22)

Fig. 29