

PROTEÍNAS QUIMÉRICAS TIPO FOSFATASA ALCALINA

La invención se refiere a fosfatasas alcalinas con propiedades mejoradas, composiciones farmacéuticas que comprenden fosfatasas alcalinas con propiedades mejoradas y el
5 uso de fosfatasas alcalinas con propiedades mejoradas para la prevención, tratamiento o curación de enfermedades.

Una fosfatasa es una enzima que defosforila sus sustratos; es decir hidroliza el ácido fosfórico monoésteres en un ion fosfato y una molécula con grupo hidroxilo libre. Esta acción es directamente opuesta a aquella de fosforilasas y quinasas, que unen los grupos fosfato a sus
10 sustratos mediante moléculas energéticas tipo ATP. Las fosfatasas se pueden clasificar en dos categorías principales: Las fosfatasas dependientes de cisteína (CDP) y metalo-fosfatasas.

Las metalo-fosfatasas generalmente coordinar 2 iones de metal catalíticamente esenciales dentro de su sitio activo. Actualmente existe una cierta confusión acerca de la identidad de estos iones metálicos, como los intentos sucesivos para identificarlos producen diferentes
15 respuestas. En la actualidad existe evidencia de que estos metales podrían ser magnesio, manganeso, hierro, zinc, o cualquier combinación de los mismos. Se cree que un ion hidroxilo que conecta los dos iones metálicos toma parte en el ataque nucleófilo sobre el grupo fosfato.

Las fosfatasas actúan en oposición a las quinasas/fosforilasas, que añaden los grupos fosfato a proteínas. La adición o eliminación de un grupo fosfato puede activar o desactivar
20 una enzima (por ejemplo, vías de señalización de quinasas) o habilitar que una interacción proteína-proteína se produzca (por ejemplo, dominios SH3); por lo tanto, las fosfatasas son parte integral de muchas de las vías de transducción de señales. Cabe señalar que la adición de fosfato y la eliminación no corresponden necesariamente a la activación o inhibición de enzima, y que varias enzimas tienen sitios de fosforilación separados para activar o inhibir la regulación funcional. CDK,
25 por ejemplo, puede ser activado o desactivado dependiendo del residuo de aminoácido específico que es fosforilado. Los fosfatos son importantes en la transducción de la señal ya que regulan las proteínas a las que se unen. Para invertir el efecto regulador, el fosfato se remueve. Esto ocurre en sí mismo por hidrólisis, o es mediado por fosfatasas de proteína.

Un tipo de fosfatasa, fosfatasa alcalina (ALP o AP) (EC 3.1.3.1), es una enzima
30 hidrolasa responsable de remover los grupos fosfato de muchos tipos de moléculas, incluyendo, por ejemplo, nucleótidos, proteínas, y alcaloides. Hasta hace poco, se pensaba que las fosfatasas alcalinas eran más eficaces en un entorno alcalino, como el nombre sugiere.

Se piensa en la técnica que un posible papel fisiológico de AP puede ser que interactúa con moléculas inflamatorias. En primer lugar se ha postulado que AP defosforila
35 endotoxinas y como tal reduce la respuesta inflamatoria a estas moléculas altamente inflamatorias.

Desde entonces, otros mecanismos de acción se han postulado y perseguido. Sin embargo, hasta ahora, a pesar de su papel beneficioso en una multitud de enfermedades inflamatorias y otras, el mecanismo de acción aún no se ha aclarado completamente. En el pasado, la fosfatasa alcalina de origen bovino se ha utilizado en modelos animales y en ensayos clínicos para el tratamiento de, por ejemplo, sepsis, lesión renal aguda, enfermedad inflamatoria intestinal, enterocolitis, daño de 5 reperusión de isquemia, u otras enfermedades inflamatorias (Riggle et al, J Surg Res. 2013 Mar; 180(1):21-6; Peters et al, J Pharmacol Exp Ther. 2013 Jan; 344(1):2-7; Martinez-Moya et al, Pharmacol Res. 2012 Aug; 66(2):144-53; Pickkers et al, Crit Care. 2012 Jan 23; 16(1); Ramasamy et al, Inflamm Bowel Dis. 2011 Feb; 17(2):532-42; Lukas et al, Inflamm Bowel Dis. 2010 Jul; 10 16(7):1180-6; Bol-Schoenmakers et al, Eur J Pharmacol. 2010 May 10; 633(1-3):71-7; Heemskerk et al, Crit Care Med. 2009 Feb; 37(2):417-23; Tuin et al, Gut. 2009 Mar; 58(3):379-87; Su et al, Crit Care Med. 2006 Aug; 34(8):2182-7; van Veen et al, Br J Surg. 2006 Apr; 93(4):448-56; van Veen, Infect Immun. 2005 Jul; 73(7):4309-14; Verweij et al, Shock. 2004 Aug; 22(2):174-9).

Aunque en la actualidad, las fosfatasas alcalinas, aisladas de fuentes naturales así como diseñadas de manera recombinante, son disponibles que son útiles tanto en el diagnóstico 15 como el tratamiento de la enfermedad, existe una necesidad de fosfatasas alternativas con por ejemplo una actividad específica alterada (por ejemplo mejorada), estabilidad (por ejemplo $T_{1/2}$ in vivo, o estabilidad en relación con el almacenamiento (vida útil)) o especificidad del sustrato.

La presente invención proporciona dichas fosfatasas modificadas, que tienen 20 propiedades mejoradas en comparación con una fosfatasa alcalina recombinante quimérica que se describe ampliamente en WO2008/133511.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En una primera modalidad, la invención proporciona una proteína aislada que tiene 25 actividad de fosfatasa, en donde dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 200 aminoácidos consecutivos que tienen al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, una secuencia de aminoácidos de al menos 50 aminoácidos consecutivos que tienen al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6, y una secuencia de aminoácidos de al 30 menos 40 aminoácidos consecutivos que tienen al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7, en donde la proteína de longitud completa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de longitud completa de SEQ ID NO: 1, con la condición de que el aminoácido en la posición 279 es leucina (L), el aminoácido en la posición 328 es valina (V) y el aminoácido en la posición 478 es leucina (L).

En una modalidad preferida, la proteína de longitud completa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de longitud completa de SEQ ID NO: 1, con la condición de que el aminoácido correspondiente a la posición 279 es leucina (L), el aminoácido correspondiente a la posición 328 es valina (V) y el aminoácido correspondiente a la posición 478 es leucina (L).

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

Los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren a compuestos que comprenden aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, y pueden utilizarse de manera intercambiable.

Como se usa aquí, donde "secuencia de aminoácidos" se recita se refiere a una secuencia de aminoácidos de una molécula de proteína o péptido. Una "secuencia de aminoácidos" se puede deducir de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína. Sin embargo, los términos tales como "polipéptido" o "proteína" no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos deducida, pero pueden incluir modificaciones postraduccionales de las secuencias de aminoácidos deducidas, tales como eliminaciones, adiciones, y modificaciones de aminoácidos tales como glicosilaciones y adición de radicales de lípido. También el uso de aminoácidos no naturales, tales como D-aminoácidos para mejorar la estabilidad o comportamiento farmacocinético cae dentro del alcance del término "secuencia de aminoácidos", a menos que se indique lo contrario.

Preferiblemente, parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de 50-65, preferiblemente 60-65, más preferiblemente 62-65, más preferiblemente 64-65, más preferiblemente 65 aminoácidos consecutivos, que tiene al menos 90%, preferiblemente al menos 95 %, más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia con el dominio de corona de longitud completa de PLAP humana. Para el propósito de la presente invención, la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio de corona de longitud completo de la secuencia de referencia PLAP humana está subrayada en la SEQ ID NO: 3, representada en la figura 1 y corresponde a las posiciones 366-430 en el mismo.

Preferiblemente, parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de 200-365, más preferiblemente 250-365, más preferiblemente 300-365, más preferiblemente 350-365, más preferiblemente al menos 360-365, más preferiblemente 365 aminoácidos consecutivos que tienen 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia con la región N-terminal que flanquea el dominio de corona de ALPI humana. Esta

región N-terminal que flanquea el dominio de corona se considera una de dos partes del dominio catalítico.

Preferiblemente, parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de 40-54, preferiblemente 45-54, más preferiblemente 50-54, más preferiblemente 52-54, más
5 preferiblemente 54 aminoácidos consecutivos que tienen 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia con la región C-terminal que flanquea el dominio de corona de ALPI humana. Esta región C-terminal que flanquea el dominio de corona se considera la segunda de dos partes del dominio catalítico.

Para el propósito de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de la
10 secuencia de referencia de proteína madura de ALPI humana se representa en la figura 1 (SEQ ID NO: 2). Para el propósito de determinar las regiones de flaqueo N-terminal y C-terminal, en conjunto denominadas como el dominio catalítico, el dominio de corona de ALPI humana es subrayado aquí.

En una modalidad preferida particular, la invención proporciona una proteína de
15 acuerdo con la invención, en donde dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de 50-65, preferiblemente 60-65, más preferiblemente 62-65, más preferiblemente 64-65, más preferiblemente 65 aminoácidos consecutivos, que tienen al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia con el dominio de corona de longitud completo de PLAP humana, parte de dicha proteína comprende una secuencia de
20 aminoácidos de 200-365, más preferiblemente 250-365, más preferiblemente 300-365, más preferiblemente 350-365, más preferiblemente 360-365, más preferiblemente 365 aminoácidos consecutivos que tienen al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia con la región N-terminal que flanquea el dominio de corona de ALPI humana, y parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de 40-54,
25 preferiblemente 45-54, más preferiblemente 50-54, más preferiblemente 52-54, más preferiblemente 54 aminoácidos consecutivos que tienen al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia con la región C-terminal que flanquea el dominio de corona de ALPI humana.

Con la región de flaqueo N-terminal del dominio de corona se entiende un tramo de
30 aminoácidos adyacentes (es decir, preferiblemente menos de 20 aminoácidos, más preferiblemente menos de 15, más preferiblemente menos de 10, más preferiblemente menos de 5, más preferiblemente menos de 3, más preferiblemente menos de 2, más preferiblemente sin aminoácido aparte) a la secuencia del dominio de corona (los aminoácidos correspondientes de los mismos subrayados en la figura 1), en el lado izquierdo del dominio de corona, en donde el lado izquierdo se
35 define como la parte de la cadena peptídica que lleva el grupo amino (NH₂) del primer aminoácido.

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

En los humanos, cuatro isoformas de fosfatasa alcalina se han identificado hasta el momento. Estas son intestinal (ALPI), placentar (MF), tipo placentar (GCAP), e hígado/óseo/riñón (o tejido no específico) fosfatasa alcalina (TNAP). Los tres primeros se encuentran juntos en el cromosoma 2, mientras que la forma no específica de tejido se encuentra en el cromosoma 1. Las funciones fisiológicas exactas de AP no se conocen, pero AP parece estar involucrada en un gran número de procedimientos fisiológicos.

La secuencia de las fosfatasas alcalinas humanas se conoce en la técnica y se puede encontrar fácilmente en las bases de datos relevantes. Para la determinación del % de identidad de secuencia al dominio de corona de PLAP y dominio catalítico de ALPI, las secuencias de referencia respectivas se usan preferiblemente. La secuencia de referencia de ALPI humana se representa como SEQ ID NO: 2. La secuencia de referencia de ALPP humana se representa como SEQ ID NO: 3. Dentro de esas secuencias de referencia en la figura 1, la secuencia comúnmente conocida como el dominio de corona está subrayada.

La fosfatasa alcalina placentaria es abreviada aquí como ALPP o PLAP. Las abreviaturas ALPI o IAP se refieren a la fosfatasa alcalina intestinal. La fosfatasa alcalina 2 tipo placentaria es abreviada aquí como ALPP2, ALPG o GCAP y las abreviaturas ALPL, TNSALP, TNAP o BLK se utilizan aquí para referirse a la fosfatasa alcalina no específica de hígado/tejido. Las diferentes abreviaturas de una y la misma fosfatasa alcalina se pueden usar de manera intercambiable aquí.

Desde un punto de vista conformacional, una fosfatasa alcalina a groso modo consiste en dos dominios: un dominio de corona y un dominio de sitio activo (Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology. José Luis Millan; Wiley, 2006). El dominio del sitio activo se puede dividir en partes separadas como el residuo catalítico y tres sitios de iones metálicos (Zn1, Zn2 y Mg3). Desde un punto de vista de la estructura primaria, es evidente que el dominio de corona está flanqueado por los aminoácidos que forman el dominio del sitio activo. Por lo tanto, en una modalidad preferida, el dominio catalítico no se compone de una secuencia contigua de aminoácidos, pero que flanquean el dominio de corona. Con referencia a SEQ

ID NO: 1 que indica la secuencia de aminoácidos de una fosfatasa alcalina de acuerdo con la invención, que no limita la presente invención en modo alguno, el dominio de corona comprende preferiblemente los aminoácidos en la posición 366-430, mientras que el dominio catalítico se refiere preferiblemente a las secuencias restantes antes de la posición 366 y después de la posición 430 en las secuencias de proteína madura tal como se representa en la figura 1. La secuencia de aminoácidos de las fosfatasas alcalinas y las posiciones relativas del dominio catalítico y de corona son conocidas por la persona con experiencia (Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology. José Luis Millan; Wiley, 2006).

En algunas modalidades, una proteína de acuerdo con la invención así comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con el dominio de corona de una ALPP humana y una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con el dominio catalítico de una fosfatasa alcalina intestinal humana. Preferiblemente dicha secuencia que tiene dicha identidad de secuencia con el dominio de corona de ALPP se sitúa en una proteína de acuerdo con la invención en aproximadamente la misma posición que el dominio de corona de ALPP en la proteína ALPP nativa, es decir, en aproximadamente la posición 366-430, en relación con la posición 1 como se indica en la figura 1 (la secuencia que representa el dominio de corona está subrayada).

La secuencia que tiene identidad de secuencia con el dominio de corona de ALPP tiene preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, más preferiblemente 100% de identidad de secuencia con la secuencia nativa del dominio de corona de ALPP, que está representada por los aminoácidos subrayados en las posiciones 366-430 en la SEQ ID NO: 3.

El porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico, o el término "% de identidad de secuencia", se define aquí como el porcentaje de residuos en una secuencia de aminoácido candidato o de ácido nucleico que es idéntica a los residuos en una secuencia de referencia después de alinear las dos secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad. En una modalidad preferida, el cálculo de dicho al menos porcentaje de identidad de secuencia se lleva a cabo sin introducir huecos. Los métodos y programas de computadora para la alineación son bien conocidos en la técnica, por ejemplo "Alinear 2" o el servicio BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

Preferiblemente dicha secuencia que tiene una secuencia que es al menos 90% idéntica a la parte N-terminal que flanquea el dominio de corona de ALPI está situada en una proteína de acuerdo con la aplicación a aproximadamente la misma posición que la parte de ALPI en la proteína ALPI nativa, es decir, como se representa por las posiciones 1-365 en SEQ ID NO: 1 en la figura 1.

Además, la secuencia que tiene identidad de secuencia con el dominio catalítico de ALPI preferiblemente tiene al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% de identidad de

secuencia con la parte N-terminal que flanquea el dominio de corona de ALPI, representada por las posiciones 1-365 en la figura 1, SEQ ID NO: 2, con la condición de que el aminoácido en la posición 279 es L y el aminoácido correspondiente a la posición 328 es V. Más preferiblemente, la secuencia que tiene una identidad de secuencia con la parte N-terminal del dominio catalítico de ALPI es idéntica a la secuencia nativa del dominio catalítico de ALPI, con la excepción de que el aminoácido en la posición 279 es L y el aminoácido en la posición 328 es V.

Preferiblemente, dicha secuencia que tiene una secuencia que es al menos 90% idéntica a la parte C-terminal que flanquea el dominio de corona de ALPI está situada en una proteína de acuerdo con la invención en aproximadamente la misma posición que la parte de ALPI en la proteína ALPI nativa, es decir, como se representa por las posiciones 431-484 en SEQ ID NO: 1.

La secuencia que tiene identidad de secuencia con la parte C-terminal que flanquea el dominio de corona de ALPI preferiblemente tiene al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia C-terminal, que flanquea el dominio de corona de ALPI y representada por las posiciones 431-484 en SEQ ID NO: 2, con la condición de que el aminoácido en la posición 478 es L. Más preferiblemente, la secuencia que tiene una identidad de secuencia con la parte C-terminal del dominio catalítico de ALPI es idéntica a la secuencia nativa del dominio catalítico de ALPI, con la excepción de que el aminoácido en la posición 478 es L.

Anteriormente, se demostró que una fosfatasa alcalina que tiene una secuencia de dominio de corona que tiene una identidad de secuencia con el dominio de corona de ALPP y que tiene un dominio catalítico que tiene una identidad de secuencia con el dominio catalítico de ALPI (en adelante denominado como catALPI/coronaALPP) retuvo su actividad específica inicial en medio Zn^{2+} bajo. Estos resultados mostraron que la actividad in vivo es Zn^{2+} independiente. En comparación, ALPI perdió rápidamente su actividad en las mismas condiciones de Zn^{2+} bajo. Los inventores llegaron a la conclusión de que una enzima cuya actividad es independiente de Zn^{2+} podría ser útil en enfermedades donde la disminución de Zn^{2+} es parte de la patología (por ejemplo, defectos nutricionales, abuso de alcohol y daño de la integridad intestinal, infecciones crónicas, incluyendo sepsis, o enfermedades inflamatorias en general) o donde la adición de Zn^{2+} (como un agente estabilizador en la fabricación) puede estar contraindicada (por ejemplo, fase aguda de la sepsis, enfermedades autoinmunes). Aparte de las ventajas de producción y aplicación, catALPI/coronaALPP también tiene ventajas con respecto a la estabilidad durante el almacenamiento. Las propiedades de catALPI/coronaALPP se describen en detalle en WO2008/133511.

La solicitud actual sorprendentemente demuestra que una proteína de acuerdo con la presente invención es aún más estable en concentración de Zn^{2+} baja. Se muestra aquí, que una modificación específica que implica tres posiciones con respecto a la secuencia de

catALPI/coronaALPP descrita anteriormente aumenta la independencia de Zn^{2+} aún más. En resumen, por tanto se ha demostrado que AP nativa, tal como ALPI, pierde su actividad enzimática en ambientes con concentraciones de Zn^{2+} bajas, catALPI/coronaALPP (como se describe en WO2008/133511) conserva su actividad en ambientes con Zn^{2+} bajo, pero pierde su actividad cuando, por ejemplo, se añaden agentes quelantes de Zn^{2+} , mientras que una proteína de acuerdo con la presente invención conserva gran parte de su actividad incluso en la presencia de un quelante de zinc, tal como EDTA. Por lo tanto, en enfermedades en donde la disminución de Zn^{2+} severa es parte de la patología, dicha AP nativa es incapaz de desplegar su actividad enzimática en el sitio donde se piensa que es el más beneficioso, por ejemplo, en el sitio de la inflamación. En contraste, una AP recombinante no susceptible a concentraciones de Zn^{2+} muy bajas, en particular una proteína de acuerdo con la invención retiene su actividad en un ambiente con concentración de Zn^{2+} muy baja, por ejemplo, en un sitio de inflamación. Dicha enzima es por lo tanto muy útil para el tratamiento de las enfermedades que son debido a o acompañadas por niveles de Zn^{2+} bajos. Dichos niveles de Zn^{2+} disminuidos harían otras fosfatasas alcalinas menos activo, en comparación con una proteína de acuerdo con la invención.

Varias enzimas en el cuerpo humano dependen de Zn^{2+} por su actividad y por ejemplo las respuestas inmunológicas son más eficaces si los niveles suficientes de Zn^{2+} están presentes. Las partes innatas así como las partes específicas del sistema inmune son conocidas por ser influenciadas por el zinc y se han establecido que las proteínas que contienen zinc se acumulan en sitios de inflamación. En un individuo sano, los valores de referencia de suero de Zn^{2+} son entre 10 y 20 μM . Por ejemplo en el abuso de alcohol o durante la desnutrición, estos niveles pueden disminuir a menos de 10 μM o incluso menos de 1 μM . Además, la inflamación (sub)crónica, tal como artritis reumatoide, sepsis, y enfermedad de Crohn presente con la deficiencia de zinc en suero. En dichos ambientes deficientes de Zn^{2+} , una proteína de acuerdo con la invención es todavía muy activa, mientras que otras fosfatasas alcalinas conocidas más o menos rápidamente pierden su actividad de fosfatasa. La invención proporciona así la idea de que una proteína de acuerdo con la invención es especialmente útil en el tratamiento de una enfermedad que se acompaña con deficiencia de Zn^{2+} local o sistémica. En comparación con otras fosfatasas alcalinas conocidas, una proteína de acuerdo con la invención es más activa bajo condiciones de Zn^{2+} bajas. En una modalidad preferida por lo tanto, la invención proporciona una proteína de acuerdo con la invención para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad que va acompañada por la deficiencia de Zn^{2+} . Preferiblemente, dicha enfermedad comprende una enfermedad inflamatoria, más preferiblemente seleccionada del grupo que consiste de enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, enfermedad

inflamatoria del tracto gastrointestinal, infección, sepsis, neurodermatitis, enfermedad hepática inflamatoria, enfermedad pulmonar inflamatoria y enfermedad renal inflamatoria.

Con el término "deficiencia de zinc" o "deficiencia de Zn^{2+} " se entiende que la cantidad de zinc (localmente) disponible es insuficiente para permitir la actividad celular y/o enzimática sin obstáculos. La deficiencia de zinc puede ser absoluta o relativa, en donde la deficiencia de zinc absoluta se puede determinar fácilmente por referencia a los valores de referencia en los individuos sanos, conocidos en la técnica. La deficiencia de zinc relativa, por ejemplo, puede ocurrir cuando las concentraciones de zinc están todavía dentro de los límites establecidos por los valores de referencia en los individuos sanos, pero las concentraciones de zinc necesarias son más altas de lo normal, por ejemplo durante la inflamación. En algunas modalidades, la deficiencia de zinc significa que la concentración de zinc (local) del sujeto es por debajo de 10 μM , más preferiblemente por debajo de 5 μM , más preferiblemente por debajo de 2 μM , más preferiblemente por debajo de 1 μM , más preferiblemente por debajo de 0.1 μM , más preferiblemente por debajo de 0.05 μM , más preferiblemente por debajo de 0.02 μM , más preferiblemente por debajo de 0.01 μM , más preferiblemente por debajo de 0.005 μM , más preferiblemente por debajo de 0.002 μM . En algunas modalidades, la deficiencia de zinc significa que la concentración de zinc (local) es menor que la necesaria para la actividad celular y/o enzimática sin obstáculos.

Con el término "enfermedad inflamatoria" se entiende, cualquier enfermedad que se debe o es acompañada de una respuesta del tejido de protección a la lesión o destrucción de tejidos, que sirve para destruir, diluir o delimitar el agente perjudicial y los tejidos lesionados. Los signos clásicos de la inflamación aguda son dolor (dolor), calor (calor), enrojecimiento (rubor), hinchazón (tumor), y pérdida de función (afectación de función). Típicamente, la inflamación se caracteriza por el aumento de los parámetros inflamatorios, tales como proteína C-reactiva, leucocitos y citoquinas (IL-6, TNF-alfa, etc.). Aunque la inflamación es inicialmente protectora por naturaleza, la enfermedad inflamatoria trastornada, tal como la artritis reumatoide y (otras) enfermedades autoinmunes, también caen dentro de la definición de "enfermedad inflamatoria". En una modalidad preferida, la proteína de la presente invención es para uso en el tratamiento de dicha enfermedad inflamatoria trastornada o perjudicial.

Además, durante el análisis farmacocinético estándar, los presentes inventores han observado de forma inesperada que una proteína de acuerdo con la invención está dirigida a varios órganos, en particular la piel, riñón, bazo, hígado, pulmones, cerebro, grasa, hueso, y colon. El uso de una proteína acoplada con yodo radiactivo de la invención, se ha observado que el % de relación de órgano/sangre para una proteína de acuerdo con la invención con relación a la de catALPI/coronaALPP es especialmente favorable para la piel, riñón, bazo, hígado, pulmones, cerebro, grasa, hueso, y colon, es decir, una proteína de acuerdo con la invención está dirigida relativamente

más a estos órganos que la proteína catALPI/coronaALPP conocida. En particular, una proteína de acuerdo con la invención reside en concentraciones más bajas en la sangre que catALPI/coronaALPP y reside en concentraciones más altas en los órganos mencionados. Cuando una condición que relaciona estos órganos, tal como neurodermatitis de hígado, lesión renal, fibrosis hepática, hipofosfatasa o lo similar debe ser tratada menos proteína es necesaria para el tratamiento, reduciendo costos y/o aumentando la eficacia. Los experimentos que implican las enfermedades relacionadas con estos órganos ya se han realizado (hipofosfatasa), están en curso (enfermedad del riñón), o son planeadas. La invención proporciona así una proteína que muestra independencia zinc mejorada y el comportamiento farmacocinético en comparación con las fosfatasas alcalinas conocidas en la técnica.

Los inventores han demostrado, en varias modalidades de trabajo, que una proteína de acuerdo con la invención es útil como un medicamento. Las enfermedades o condiciones que pueden ser tratadas con una proteína de acuerdo con la invención incluyen: función renal reducida, lesión renal, insuficiencia renal e hipofosfatasa. Además, debido a las características específicas de una proteína de fosfatasa alcalina de acuerdo con la invención, que constituyen mejoras con respecto a las proteínas de fosfatasa alcalina conocidas que se han utilizado, la proteína de acuerdo con la invención es útil no sólo para la función renal reducida, lesión renal, insuficiencia renal e hipofosfatasa, sino también para la prevención o tratamiento de enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal, infección, sepsis, neurodermatitis, enfermedad inflamatoria del hígado, enfermedad pulmonar inflamatoria y enfermedad renal inflamatoria. Estas son todas las enfermedades que afectan órganos que son dirigidas por una proteína de acuerdo con la invención y/o están acompañadas de deficiencia de zinc (relativa).

El término "prevención" o "que previene" se define aquí como la (el acto de) administración de una proteína de acuerdo con la invención a un sujeto con la intención de evitar a dicho sujeto de atraer una enfermedad particular. Aunque la intención del tratamiento es prevenir a dicho sujeto de atraer dicha enfermedad, no es necesario que el estado de enfermedad sea evitado por completo después de una o múltiples administraciones de una proteína de acuerdo con la invención, conforme los sujetos son, por ejemplo, no necesariamente susceptibles para un protocolo de tratamiento específico. Se prefiere que, en general, la eficacia de dicha prevención se logra porque un grupo de sujetos que ha recibido una proteína de acuerdo con la invención para la prevención de una enfermedad en particular muestra al menos un aumento reducido en la severidad de enfermedad o, por ejemplo, menos complicaciones de dicha enfermedad, cuando se compara con un grupo de sujetos que no ha recibido dicha proteína. Por ejemplo en caso de enfermedad renal, se prefiere que los sujetos en riesgo de atraer la enfermedad renal, después de ser tratados con una

proteína de acuerdo con la invención muestren menos disminución de la función renal, con respecto a sujetos que no han sido tratados con dicha proteína. Si un sujeto atrae una enfermedad para la cual se administró una proteína con el fin de prevenir dicha enfermedad, administraciones adicionales pueden ya sea darse (en adelante denominado como "tratamiento") para prevenir el empeoramiento de dicho estados de enfermedad o como tratamiento con la intención de curar.

El término "tratamiento" o "que trata" se define aquí como (el acto de) la administración de una proteína de acuerdo con la invención a un sujeto con la intención de curar al sujeto de una enfermedad (esperada) o mejorar, reducir o eliminar los síntomas de un padecimiento en el sujeto. Aunque la intención del tratamiento es curar a dicho sujeto, no es necesario que dicho sujeto sea curado después de que una o múltiples administraciones de una proteína de acuerdo con la invención, conforme los sujetos son, por ejemplo, no necesariamente susceptibles para un protocolo de tratamiento específico. Se prefiere que, en general, la eficacia de dicho tratamiento se logra porque los sujetos que han sido tratados con una proteína de acuerdo con la invención muestran al menos una mejora de su enfermedad-condición, o por ejemplo menos complicaciones de dicha enfermedad, cuando se compara con un grupo no tratado (o tratado con placebo). Por ejemplo en caso de enfermedad renal, se prefiere que los sujetos, después de ser tratados con una proteína de acuerdo con la invención muestren la función renal mejorada o menos disminución de la función renal, con respecto a sujetos que no han sido tratados con dicha proteína.

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

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

También se proporciona un vector que comprende dicho polinucleótido de acuerdo con la invención. Dicho vector comprende preferiblemente secuencias de ácidos nucleicos adicionales tal como elementos necesarios para la transcripción/traducción de la secuencia de ácido nucleico que codifica una fosfatasa (por ejemplo el promotor y/o secuencias de terminación). Dicho vector puede comprender también secuencias de ácidos nucleicos que codifican marcadores de selección (por ejemplo un antibiótico) para seleccionar o mantener células hospederas transformadas con dicho vector. Los ejemplos de vectores adecuados son vectores de clonación o de expresión. Cualquier vector adecuado para mediar la expresión en una célula hospedera de elección se puede usar de acuerdo con la invención, ya sea integrado o replicado de manera episomal en una célula hospedera.

El vector puede ser un plásmido, un virus (por ejemplo, un retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociado, baculovirus y/o derivados de los mismos), un cósmido, un fago o un fagémido, un vector episomal o un cromosoma artificial. Dicho polinucleótido o vector es muy útil para la producción de una proteína de acuerdo con la invención, pero también se pueden utilizar para la terapia génica.

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

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

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

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de una proteína de fosfatasa alcalina de acuerdo con la invención, de un polinucleótido de acuerdo con la invención, o de un vector de acuerdo con la invención, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que es acompañada por una deficiencia local o sistémica de Zn^{2+} , preferiblemente
30 dicha enfermedad es una enfermedad inflamatoria, una enfermedad renal o hipofosfatasa, preferiblemente dicha enfermedad comprende una enfermedad inflamatoria, más preferiblemente una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del tracto gastro-intestinal, infección, sepsis, neurodermatitis, enfermedad inflamatoria
35 del hígado, enfermedad pulmonar inflamatoria y enfermedad renal inflamatoria.

En aún otra modalidad, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto (preferiblemente un ser humano) para tratar una enfermedad que se acompaña preferiblemente por deficiencia de Zn^{2+} , que comprende la administración de una cantidad efectiva de una fosfatasa de acuerdo con la invención, en donde dicha enfermedad comprende preferiblemente una enfermedad

5 inflamatoria, más preferiblemente seleccionada del grupo que consiste de enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal, infección, sepsis, neurodermatitis, enfermedad inflamatoria del hígado, enfermedad pulmonar inflamatoria y enfermedad renal inflamatoria.

La invención proporciona así una proteína, polinucleótido, y/o vector de acuerdo con

10 la invención para uso en una variedad de enfermedades. Una proteína de acuerdo con la invención es especialmente útil, debido a su distribución en los órganos, para su uso en el tratamiento de una enfermedad que implica el tracto gastrointestinal, piel de riñón, hígado, pulmón, cerebro, tejido graso, o hueso.

En una modalidad preferida, la invención proporciona una proteína, polinucleótido

15 y/o vector de acuerdo con la invención para el uso en el tratamiento de la enfermedad renal.

Aunque existe una visión continua en la fisiopatología de la lesión renal y hay terapias que mejoran la función renal [Lameire NH, Acute kidney injury: an increasing global concern. Lanceta. 2013 Jul 13; 382(9887):170-9], todavía existe una necesidad de tratamientos

20 alternativos para tratar la lesión renal y/o mejorar la función renal. La presente invención proporciona dicho tratamiento alternativo al proporcionar una proteína, polinucleótido y/o un vector para su uso de acuerdo con la invención.

En una modalidad preferida, la invención proporciona una proteína, polinucleótido y/o vector para el uso de acuerdo con la invención, en donde la enfermedad renal se selecciona del grupo de insuficiencia renal, lesión renal aguda, enfermedad renal crónica, enfermedad renal

25 isquémica.

El término lesión renal aguda (AKI), anteriormente llamada insuficiencia renal aguda, significa que la función renal se pierde rápidamente. AKI se diagnostica sobre la base de los hallazgos característicos de laboratorio, tal como nitrógeno de urea arterial elevada y creatinina, o incapacidad de los riñones para producir suficientes cantidades de orina. AKI se puede subdividir en

30 AKI prerrenal, AKI intrínseca y AKI post-renal.

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

El término AKI intrínseca se utiliza cuando las fuentes de daños en el riñón en sí son la causa. Los hallazgos típicos de laboratorio para AKI intrínseca son: $U_{osm} < 350$, $U_{Na} > 20$, $Fe_{Na} > 2\%$ y relación BUN/Cr: < 15 .

El término AKI post-renal está reservado para esas condiciones donde la obstrucción del tracto urinario es la causa de AKI. Los hallazgos típicos de laboratorio para AKI post-renal son: $U_{osm} < 350$, $U_{Na} > 40$, $Fe_{Na} > 4\%$ y relación BUN/Cr: > 15 .

A nivel mundial, existen varias directrices para la clasificación de la enfermedad renal crónica. Como un ejemplo, los criterios de clasificación de la Fundación Nacional del Riñón (2002) "Guías de práctica clínica K/DOQI para la enfermedad renal crónica" se describen posteriormente. La persona con experiencia puede seleccionar diferentes poblaciones de pacientes, basadas en otras directrices.

Típicamente, todos los individuos con una tasa de filtración glomerular (GFR) < 60 ml/min/1.73 m² durante 3 meses se clasifican como que tienen enfermedad renal crónica, independientemente de la presencia o ausencia de daño renal. La razón de la inclusión de estos individuos es que la reducción en la función renal a este nivel o inferior representa la pérdida de la mitad o más del nivel de adulto de la función renal normal, que puede estar asociado con una serie de complicaciones. En general las personas con daño renal crónico se clasificarán como que tienen enfermedad renal crónica, independientemente del nivel de GFR. La razón de la inclusión de individuos con GFR > 60 ml/min/1.73 m² es que GFR puede ser sostenida en niveles normales o incrementados a pesar del daño renal sustancial y que los pacientes con daño renal tienen un riesgo incrementado de los dos resultados principales de la enfermedad renal crónica: pérdida de la función renal y el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, que puede conducir a morbilidad y mortalidad.

La pérdida de proteína en la orina se considera como un marcador independiente de empeoramiento de la función renal y la enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, las directrices británicas anexan la letra "P" a la etapa de la enfermedad renal crónica si existe una pérdida de proteína significativa.

Las 5 etapas de la enfermedad renal crónica se clasifican normalmente como sigue:

Etapa 1: Función disminuida ligeramente; daño renal con GFR normal o relativamente alta ($= 90$ ml/min/1.73 m²). El daño renal se define como anormalidades patológicas o marcadores de daño, incluyendo anormalidades en prueba de sangre u orina o estudios de imagen.

Etapa 2: Reducción leve en GFR ($60-89$ ml/min/1.73 m²) con daño renal. El daño renal se define como anormalidades patológicas o marcadores de daño, incluyendo anormalidades en prueba de sangre u orina o estudios de imagen.

Etapa 3: Reducción moderada en GFR (30-59 ml/min/1.73 m²). Las directrices británicas se distinguen entre la etapa 3A (GFR 45-59) y etapa 3B (GFR 30-44) para los propósitos de la detección y derivación.

5 Etapa 4: Reducción severa en GFR (15-29 ml/min/1.73 m²). Preparación para la terapia de reemplazo renal.

Etapa 5: Insuficiencia renal establecida (GFR <15 ml/min/1.73 m²), la terapia de reemplazo renal permanente (RRT), o enfermedad renal en etapa terminal (ESRD).

10 El término insuficiencia renal ahora denota una condición médica en la cual los riñones dejan de filtrar adecuadamente los productos de residuos de la sangre. Las dos formas principales son la insuficiencia renal aguda, que a menudo es reversible con el tratamiento adecuado, y la enfermedad renal crónica, que a menudo no es reversible.

15 La enfermedad renal isquémica se reserva para aquellas condiciones en las que una reducción clínicamente importante en la tasa de filtración glomerular o la pérdida de parénquima renal es causada por la estenosis de la arteria renal significativa hemodinámicamente u otras causas que resultan en baja presión arterial en los riñones, tal como por ejemplo choque hemodinámico o el uso de una pinza arterial para la interrupción temporal del flujo de sangre.

20 Los inventores también han demostrado que una proteína de acuerdo con la invención es útil en el tratamiento de hipofosfatasia (HPP). Esto fue bastante inesperado, ya que los experimentos anteriores utilizando TNAP para el tratamiento de hipofosfatasia fallaron en mostrar la eficacia de la terapia de reemplazo de enzima. Por consiguiente una proteína de fusión artificial entre una enzima TNAP y un péptido autoguiado óseo se desarrolla (Whyte et al, N Engl J Med. 2012 Mar 8; 366(10):904-13). Sorprendentemente, la proteína de acuerdo con la presente invención no necesita dicho péptido auto-guiado óseo y es capaz de reducir efectivamente los signos de los síntomas de la hipofosfatasia en un modelo de ratón. En otra modalidad preferida, la invención 25 proporciona así una proteína, polinucleótido y/o vector de acuerdo con la invención para el uso en el tratamiento de la hipofosfatasia.

30 La base metabólica de la hipofosfatasia se deriva de un defecto molecular en la fosfatasa alcalina no específica de tejido de codificación de genes (TNAP). TNAP es una ectoenzima atada a la superficie exterior de las membranas celulares de osteoblastos y condrocitos. TNAP normalmente hidroliza varias sustancias, incluyendo pirofosfato inorgánico (PPi) y piridoxal 5'-fosfato (PLP) una forma importante de vitamina B6.

35 Cuando TNAP es baja, pirofosfato inorgánico (PPi) se acumula extracelularmente e inhibe potencialmente la formación de hidroxiapatita (mineralización), causando raquitismo en infantes y niños y osteomalacia (huesos blandos) en adultos. PLP es la forma principal de vitamina B6 y debe ser desfosforilada por TNAP a piridoxal (PL) para cruzar sobre la membrana celular. La

deficiencia de vitamina B6 en el cerebro afecta la síntesis de neurotransmisores, que pueden causar convulsiones. En algunos casos, la deposición de cristales deshidratados de pirofosfato de calcio (CPPD) en la articulación puede causar pseudogota.

5 No existen terapias aprobadas para HPP hoy. La gestión actual consiste en paliar los síntomas, manteniendo el equilibrio del calcio y la aplicación de las intervenciones físicas, ocupacionales, dentales y ortopédicas como sea necesario. La administración de bisfosfonato (análogo sintético de pirofosfato) en un infante no tiene efecto discernible sobre el esqueleto, y la enfermedad del infante progresó hasta la muerte a los 14 meses de edad.

10 El trasplante de células de médula ósea en dos infantes gravemente afectados produce una mejora radiográfica y clínica, aunque el mecanismo de la eficacia no se entiende completamente y la morbilidad significativa se mantiene. La terapia de reemplazo de enzima con suero normal o con suero rico en ALP de pacientes con la enfermedad ósea de Paget no es beneficiosa [Whyte MP, Valdes R, Ryan LM, McAlister WH (septiembre de 1982). "Infantile hypophosphatasia: enzyme replacement therapy by intravenous infusion of alkaline phosphatase-rich plasma from patients with Paget bone disease". J. Pediatr. 101 (3): 379–86][Whyte MP, McAlister WH, Patton LS, et al. (Diciembre 1984). "Enzyme replacement therapy for infantile hypophosphatasia attempted by intravenous infusions of alkaline phosphatase-rich Paget plasma: results in three additional patients". J. Pediatr. 105 (6): 926–33]. Estas terapias de reemplazo de enzima se piensa que son ineficaces porque la función de fosfatasa alcalina se supone que es en la superficie del
15 hueso y no en la sangre. Intentos adicionales para mejorar la eficacia de la terapia de reemplazo de enzima por lo tanto se construyen alrededor de una enzima TNAP dirigida al hueso con resultados prometedores [Whyte et al. N Engl J Med. 2012 Mar 8; 366(10):904-13]. Sorprendentemente, la presente invención muestra que, sin la introducción de un radical dirigido al hueso artificial, una proteína de acuerdo con la invención es beneficiosa en un modelo de murino de hipofosfatasa. Una
20 ventaja de la presente proteína sobre la descrita en Whyte et al y Millán et al [J. Bone Miner. Res. 2008; 23 (6): 777-787] es que, debido a la ausencia del radical dirigido al hueso artificial, se espera que la presente proteína sea mucho menos inmunogénica. La presente proteína consiste de una proteína que tiene una alta identidad de secuencia con proteínas de fosfatasa alcalina humanas de origen natural. Además, la proteína de la presente invención tiene una ventaja sobre la fosfatasa
25 alcalina dirigida al hueso con respecto a la facilidad y costo de producción.

30 En una modalidad preferida, una proteína, polinucleótido, y/o vector de acuerdo con la invención para el uso en el tratamiento de hipofosfatasa se proporciona, en donde dicha hipofosfatasa se selecciona de hipofosfatasa perinatal, hipofosfatasa infantil, hipofosfatasa de niñez, e hipofosfatasa adulta.

La hipofosfatasia perinatal es la forma más perniciosa de la hipofosfatasia. En el útero, la hipomineralización profunda resulta en membraneum caput, miembros deformados o cortos durante la gestación y el nacimiento y la muerte rápida debido a la insuficiencia respiratoria.

La hipofosfatasia infantil se presenta en los primeros 6 meses de vida. El desarrollo post-natal a menudo parece normal hasta que el comienzo de mala alimentación y aumento de peso inadecuado, y manifestaciones clínicas de raquitismo se reconocen. La hipercalcemia e hipercalcinuria también son comunes y pueden explicar la nefrocalcinosis, compromiso renal y episodios de vómitos recurrentes. La mortalidad se estima que es 50% en el primer año de vida.

La hipofosfatasia en la niñez tiene una expresión clínica variable. Como un resultado de la aplasia, hipoplasia o displasia de cemento dental, la pérdida prematura de dientes temporales (es decir, antes de los 5 años) se produce. Con frecuencia, los incisivos se desprenden primero; ocasionalmente casi toda la dentición temporal se exfolia de forma prematura. Las radiografías dentales algunas veces muestran las cámaras pulpares y conductos radiculares agrandados característicos de los "dientes de concha" de raquitismo. Los pacientes también pueden experimentar caminar retrasado, una marcha de ánade característica, se quejan de rigidez y dolor, y tienen una debilidad muscular apendicular (especialmente en los muslos), consistente con miopatía no progresiva. Por lo general, las radiografías muestran deformidades raquíticas y defectos óseos característicos cerca de los extremos de los huesos largos principales (es decir, "lenguas" de radiotransparencia que sobresalen de la placa de crecimiento raquítico en la metáfisis). El retraso del crecimiento, fracturas frecuentes y la osteopenia son comunes. En los infantes gravemente afectados y los niños pequeños no es raro que, a pesar de la aparición de las fontanelas ampliamente "abiertas" en los estudios radiográficos, por sinostosis funcional de las suturas craneales ocurran. La ilusión de fontanelas "abiertas" resulta de grandes áreas de la bóveda craneal hipomineralizada. Posteriormente verdadera fusión ósea prematura de las suturas craneales puede elevar la presión intracraneal.

La hipofosfatasia adulta puede estar asociada con el raquitismo, la pérdida prematura de dientes temporales, o la pérdida temprana de la dentición adulta seguida de una salud relativamente buena. La osteomalacia se manifiesta en los pies dolorosos que resultan de recurrentes fracturas por estrés metatarsiano de difícil cicatrización, y molestias en muslos o caderas debido a pseudofracturas femorales que, cuando aparecen en el estudio radiográfico, se distinguen de la mayoría de los otros tipos de osteomalacia (que ocurren en sentido medial) por su ubicación en las cortezas laterales del fémur proximal. Algunos pacientes sufren de deposiciones de cristales dihidratado de pirofosfato de calcio con ataques ocasionales de artritis (pseudogota), lo que parece ser el resultado de niveles elevados de pirofosfato inorgánico endógeno (PPI). Estos pacientes también pueden sufrir degeneración del cartílago articular y la artropatía de pirofosfato. Las

radiografías pueden revelar pseudofracturas en las cortezas laterales del fémur proximal, fracturas por estrés, y los pacientes pueden experimentar osteopenia, condrocalcinosis, características de artropatía de pirofosfato, y periartrosis calcificada.

En una modalidad preferida, una proteína, polinucleótido, y/o vector para su uso en el tratamiento de hipofosfatasa de acuerdo con la invención se proporciona, en donde el tratamiento resulta en la supervivencia prolongada; peso corporal incrementado; fenotipo esquelético mejorado (tales como la inducción de centros secundarios de osificación, mejora de la mineralización ósea, por ejemplo en hueso trabecular y/o cortical, o inducción de osteoide); atenuación de defectos craneofaciales (tales como anomalías de forma y la fusión de la sutura coronal); mejora del fenotipo dento-alveolar (tal como la mejora de la altura y forma molar, grosor de dentina, y mineralización ósea); y/o reducción de los niveles de PPI de plasma del paciente.

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

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

En una modalidad más preferida, una proteína, polinucleótido, y/o vector para el uso en el tratamiento de hipofosfatasa de acuerdo con la invención se proporciona, en donde dicha hipofosfatasa se selecciona de hipofosfatasa infantil, de niñez o adulta. Más preferiblemente, la hipofosfatasa es hipofosfatasa infantil.

En toda la especificación, ejemplos y literatura en la técnica, otra nomenclatura se utiliza para designar las isoformas respectivas de fosfatasa alcalina. En beneficio de la claridad, en el

cuadro 1 posterior los nombres y abreviaturas comúnmente usados, o usados en esta solicitud se enumeran.

CUADRO 1

5 sinónimos y abreviaturas utilizados en la presente solicitud de patente o generalmente
conocidos para los diferentes tipos de fosfatasas alcalinas

	FOSFATSAS ALCALINAS	ABREVIATURAS
	Fosfatasa alcalina placentaria	ALPP, PLAP,
	Fosfatasa alcalina placentaria secretable	shPLAP, sALPP
10	Fosfatasa alcalina intestinal	ALPI, IAP hIAP
	Fosfatasa alcalina intestinal secretable	shIAP, sALPI
	Fosfatasa alcalina tipo placentaria	GCAP
	Fosfatasa alcalina no específica de tejido	TNAP, BLK, ALPL, TNSALP
	Fosfatasa alcalina recombinante que comprende el dominio catalítico de ALPI y el dominio de corona de ALPP	catALPI/coronaALPP, recAP, Xinlap, sALPI-ALPP-CD
15	Proteína de acuerdo con la invención	LVL-RecAP, RecAP mejorada

Con el término "secretable" se entiende que el anclaje de glicosilfosfatidilinositol no postraducciona (GPI) se ha unido para madurar la proteína, lo que permite que la proteína sea secretada y no unida a la membrana. Un anclaje de GPI es un glicolípido que se puede unir a la C-terminal de una proteína durante la modificación postraducciona. Se compone de un grupo fosfatidilinositol enlazado a través de un enlazador que contiene carbohidratos (glucosamina y manosa al residuo de inositol través de un enlace glicósido) y a través de un puente de fosfato de etanolamina (EtNP) al aminoácido C-terminal de una proteína madura. Los dos ácidos grasos dentro del grupo fosfatidil-inositol hidrófobo anclan la proteína a la membrana celular. Es ventajoso para la producción y el procesamiento corriente abajo, y por lo tanto preferido que una proteína de acuerdo con la invención no comprenda un anclaje de GPI.

Es claro que cualquiera de las fosfatasas modificadas secretables descritas (y por tanto también una proteína secretable de acuerdo con la invención) puede por ejemplo ser producida mediante la introducción en una célula hospedera de un ácido nucleico capaz de codificar dicha fosfatasa secretable en enlace operable con secuencias reguladoras y permitir que dicha célula hospedera exprese dicha fosfatasa secretable y opcionalmente aislar la fosfatasa producida a partir del medio en el que la célula hospedera se cultiva y/o mantiene. Sin embargo, aparte de las mutaciones en la secuencia de unión de GPI mencionada anteriormente, existen otros métodos que hacen proteínas secretadas, sin anclaje de GPI, por ejemplo:

1) Después de la expresión como proteínas ancladas a la membrana, las fosfolipasas se pueden usar para escindir el anclaje de GPI. Por lo tanto la invención también proporciona un método para producir una fosfatasa secretada que comprende cultivar un hospedero capaz de expresar una fosfatasa anclada de membrana, permitiendo a dicha célula hospedera producir dicha fosfatasa y la incubación de las células obtenidas con una fosfolipasa y, opcionalmente aislar la fosfatasa liberada.

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

3) La interferencia con o el uso de una célula deficiente en transamidasa se pueden usar para inhibir la unión de un anclaje de GPI a la proteína, que representa la proteína sin anclaje y secretable. Dicha célula deficiente se ha obtenido a través de la mutagénesis en CHO.

Un vector de acuerdo con la invención comprende preferiblemente secuencias de ácidos nucleicos adicionales tal como elementos necesarios para la transcripción/traducción de la secuencia de ácido nucleico que codifica una fosfatasa (por ejemplo la secuencia promotora y/o de terminación). Dicho vector puede comprender también secuencias de ácidos nucleicos que codifican marcadores de selección (por ejemplo un antibiótico) para seleccionar o mantener células hospederas transformadas con dicho vector. Preferiblemente, una secuencia de nucleótido que codifica para una secuencia de anclaje de GPI está ausente en un polinucleótido y/o vector de acuerdo con la invención. Los ejemplos de vectores adecuados son vectores de clonación o de expresión. Cualquier vector adecuado para mediar la expresión en una célula hospedera adecuada se puede utilizar de acuerdo con la invención, ya sea integrada o la replicación episomalmente en una célula hospedera. El vector puede ser un plásmido, un virus (por ejemplo, un retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociado, baculovirus o derivados de los mismos), un cósmido, un fago o un fagémido, un vector episomal o un cromosoma artificial.

Además, la invención también proporciona una célula hospedera que comprende una proteína, una secuencia de ácido nucleico o vector de acuerdo con la invención como se describe. La célula puede ser una célula eucariota, preferiblemente una célula de mamífero, una célula vegetal o una célula de levadura, que es adecuada para la producción de proteínas recombinantes. Las células
 5 hospederas de levadura adecuadas comprenden, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Las células hospederas preferidas son células derivadas de mamífero (o humanas más preferidas) tales como BHK, HEK293, CHO o PerC6™. En una modalidad particular preferida, la célula hospedera es una célula CHO.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de acuerdo con la
 10 invención, un vector que comprende dicha secuencia de ácido nucleico, y/o una célula hospedera que comprende dicha secuencia de ácido nucleico son muy útiles en la producción de una proteína de acuerdo con la invención. Una proteína de acuerdo con la invención comprende sitios de glicosilación y por lo tanto la proteína se produce preferiblemente en las células que proporcionan el patrón de glicosilación deseado. En una modalidad preferida, el sistema de producción utilizado es
 15 una plataforma de producción in vitro de mamífero (por ejemplo humano) y aún más preferiblemente la producción implica la producción a gran escala. En otra modalidad preferida, el sistema de producción utilizado es una plataforma de planta o levadura o de mamífero (preferiblemente no humano) en el que un patrón de glicosilación tipo humano artificial se introduce.

En una modalidad, la invención proporciona así un método para producir una
 20 proteína de acuerdo con la invención, el método comprende cultivar una célula hospedera que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención y permitiendo que la célula hospedera produzca dicha proteína. Las células hospederas preferidas son células derivadas de mamífero (o humanas más preferidas) tales como BHK, HEK293, CHO o PerC6™. En una modalidad particular preferida, la célula hospedera es una célula CHO.
 25 Preferiblemente, un método para producir una proteína de acuerdo con la invención comprende además, la recolección y opcionalmente purificación de dicha proteína de dicho cultivo.

Como ya se mencionó, una proteína descrita aquí de acuerdo con la invención es útil en la terapia. En una modalidad, la invención proporciona una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que comprende una proteína de acuerdo con la invención. Dicha
 30 composición farmacéutica comprende opcionalmente un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición puede presentarse en cualquier forma, por ejemplo como una tableta, como un fluido inyectable o como un fluido de infusión etc. Además, la composición, proteína, nucleótido y/o vector de acuerdo con la invención se pueden administrar vía rutas

diferentes, por ejemplo intravenosamente, rectalmente, bronquialmente, u oralmente. Aún otra ruta de administración adecuada es el uso de un goteo duodenal.

En una modalidad preferida, la ruta de administración utilizada es la ruta intravenosa. Es evidente para la persona con experiencia, que preferiblemente una cantidad efectiva de una proteína de acuerdo con la invención se suministra. Como punto de partida, 1-50,000 U/kg/día se puede utilizar. Otra ruta adecuada, por ejemplo, para HPP, es la ruta subcutánea. Si se utiliza la ruta de administración intravenosa, una proteína de acuerdo con la invención puede ser (por lo menos para una cierta cantidad de tiempo) aplicada a través de infusión continua.

Dicha composición de acuerdo con la invención puede comprender opcionalmente excipientes, estabilizadores, activadores, portadores, permeadores, propelentes, desinfectantes, diluyentes y conservantes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes adecuados son comúnmente conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden encontrar fácilmente y aplicar por la persona con experiencia, las referencias por ejemplo Remington Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia PA, 17^a ed. 1985.

Para la administración oral, la proteína puede, por ejemplo, administrarse en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, tabletas (por ejemplo, con un recubrimiento entérico), y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes, y suspensiones. AP se puede encapsular en cápsulas de gelatina junto con ingredientes inactivos y portadores en polvo, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina de sodio, talco, carbonato de magnesio y lo similar. Ejemplos de ingredientes inactivos adicionales que se pueden añadir para proporcionar el color deseable, sabor, estabilidad, capacidad reguladora de pH, dispersión u otras características deseables conocidas son óxido de hierro rojo, gel de sílice, lauril sulfato de sodio, dióxido de titanio, tinta blanca comestible y lo similar. Los diluyentes similares se pueden utilizar para hacer comprimidos. Tanto las tabletas como las cápsulas pueden fabricarse como productos de liberación sostenida para proporcionar una liberación continua de medicación durante un período de horas. Las tabletas comprimidas pueden estar recubiertas de azúcar o recubiertas de película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger la tableta de la atmósfera, o recubierta entérica para la desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener colorantes y saborizantes para incrementar la aceptación del paciente.

En una modalidad preferida, una composición que comprende una proteína de acuerdo con la invención es adecuada para la administración oral y comprende un recubrimiento entérico para proteger la AP de los efectos adversos de los jugos gástricos y pH bajo. El recubrimiento entérico y las formulaciones de liberación controlada son bien conocidos en la técnica.

Las composiciones de recubrimiento entérico en la técnica pueden comprender de una solución de un polímero de recubrimiento entérico soluble en agua mezclado con el(los) ingrediente(s) activo(s) y otros excipientes, que se dispersan en una solución acuosa y que posteriormente se puede secar y/o granular. El recubrimiento entérico formado ofrece resistencia al ataque de una proteína de acuerdo con la invención por la humedad atmosférica y el oxígeno durante el almacenamiento y por los fluidos gástricos y pH bajo después de la ingestión, mientras que se rompe fácilmente hacia abajo en las condiciones alcalinas que existen en el tracto intestinal inferior.

La invención proporciona una composición de acuerdo con la invención para el uso como un medicamento, preferiblemente para el tratamiento de una enfermedad acompañada por una deficiencia de zinc local o sistémica, unas enfermedades inflamatorias, una enfermedad renal, o hipofosfatasa. La enfermedad inflamatoria que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal, infección, sepsis, neurodermatitis, enfermedad inflamatoria del hígado, enfermedad pulmonar inflamatoria y enfermedad inflamatoria del riñón. La enfermedad renal que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de insuficiencia renal, insuficiencia renal aguda, enfermedad renal crónica, y enfermedad renal isquémica. La hipofosfatasa que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de hipofosfatasa perinatal, hipofosfatasa infantil, hipofosfatasa de niñez, e hipofosfatasa adulta.

Además del hecho de que una proteína de acuerdo con la invención se puede incorporar en una composición farmacéutica tal como una fosfatasa también puede ser parte de una composición nutricional o una nutracéutica.

Una proteína de acuerdo con la invención se puede añadir a un nutriente (tal como leche), pero también puede ser producida dentro de dicho nutriente (por ejemplo por diseño molecular). Por otra parte, las tabletas y/o cápsulas se pueden preparar las cuales se añaden posteriormente a un nutriente o que pueden ser tomadas directamente por un ser humano.

Además se proporciona un método para tratar un sujeto que padece de una enfermedad inflamatoria, una enfermedad renal o hipofosfatasa, que comprende administrar una cantidad efectiva de una proteína de acuerdo con la solicitud, por ejemplo, una proteína aislada o recombinante que tiene actividad de fosfatasa, en donde parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 50 aminoácidos consecutivos, que tienen al menos 90% de identidad de secuencia con el dominio de corona de longitud completa de PLAP humano, parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 200 aminoácidos consecutivos que tienen 90% de identidad de secuencia con la región N-terminal que flanquea el dominio de corona de ALPI humano, y parte de dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 40 aminoácidos consecutivos que tienen 90% de identidad de secuencia con la región C-

terminal que flanquea el dominio de corona de ALPI humana, en donde la proteína de longitud completa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de longitud completa de SEQ ID NO: 1, con la condición de que el aminoácido en la posición 279 es leucina (L), el aminoácido en la posición 328 es valina (V) y el aminoácido en la posición 478 es leucina (L), o una cantidad efectiva de un polinucleótido de acuerdo con la solicitud o una cantidad efectiva de un vector de acuerdo con la solicitud. La invención se explicará con más detalle en los siguientes, ejemplos no limitantes.

La invención será explicada con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

Figura 2: Distribución de los órganos de LVL-RecAP en comparación con catALPI/coronaALPP. Representado es el órgano de distribución de la sangre de LVL-RecAP dividido por el órgano a la distribución de la sangre de catALPI/coronaALPP (= relación del eje y). Un valor más alto es indicativo de direccionamiento LVL-RecAP del órgano respectivo en comparación con catALPI/coronaALPP.

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

Figura 4: Las concentraciones de creatinina sérica en los lechones que sufren de daño renal isquémico/reperfusión. Los animales simulados se sometieron al procedimiento quirúrgico en el que se retiró el riñón izquierdo. Sin embargo, la oclusión y reperfusión renal no se llevaron a cabo. En el grupo que recibió 0.32 mg/kg/día, en el día 0, la mitad de la dosis fue administrada antes de la reperfusión y la mitad restante de la dosis se administró a los 8 ± 2 horas después de la reperfusión. Una dosis completa se administró diariamente durante el resto del periodo en la vida.

Figura 5: Concentraciones AP en lechones que sufren de daño renal isquémico/reperfusión. Los animales simulados se sometieron al procedimiento quirúrgico en el que se retiró el riñón izquierdo. Sin embargo, la oclusión y reperfusión renal no se llevaron a cabo. En el grupo que recibió 0.32 mg/kg/día (200 U/kg/día), en el día 0, la mitad de la dosis fue administrada antes de la reperfusión y la mitad restante de la dosis se administró a las 8 ± 2 horas después de la reperfusión. Una dosis completa se administró diariamente durante el resto del periodo en la vida.

Figura 6: Mejora de la supervivencia y el peso corporal de ratones $Alpl^{-/-}$ mediante el tratamiento de LVL-RecAP. A) LVL-RecAP16 sobrevivieron hasta el final del experimento. El promedio de supervivencia fue de p19, p22 y p42.5 para el vehículo, LVL-RecAP1, y LVL-RecAP8,

respectivamente. B) ratones $Alpl^{-/-}$ tratados con vehículo son más ligeros que sus compañeros de camada WT; el tratamiento LVL-RecAP1 mejora el peso corporal cerca de WT en p18. Los ratones tratados con vehículo no sobreviven más tiempo y ratones tratados con LVL-RecAP8 siguen siendo más ligeros que sus compañeros de camada WT en p53. Mientras que los ratones tratados con LVL-RecAP16 presentan un peso corporal no significativamente diferente de sus compañeros de camada WT en p53.

Figura 7: El tratamiento de LVL-RecAP mejora el fenotipo esquelético de ratones $Alpl^{-/-}$. Las radiografías de la columna vertebral, la extremidad anterior, caja torácica, las extremidades traseras y patas de ratones $Akp2^{-/-}$ tratados con vehículo, LVL-RecAP1, LVL-RecAP8, LVL-RecAP16, y controles WT no tratados (aumento 5X). A) Los ratones $Akp2^{-/-}$ muestran una osteomalacia severa (flechas) en vértebras, huesos largos y la caja torácica. Los centros de osificación secundarios no están presentes en ratones $Akp2^{-/-}$ (asterisco). El tratamiento con LVL-RecAP1 ligeramente corrige este fenotipo (puntas de flecha) en comparación con WT sin tratar en p18. B) El tratamiento con LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 corrige claramente el fenotipo óseo en las vértebras, huesos largos y la caja torácica. Específicamente las extremidades más distales se mejoran como el desarrollo de los centros de osificación secundarios en la región del metatarso demuestra (puntas de flecha).

Figura 8: Mineralización mejorada en ratones $Alpl^{-/-}$ tratados con LVL-RecAP. A) El análisis histológico de los fémures de $Alpl^{-/-}$ tratado con vehículo (p18), LVL-RecAP8 (p51), LVL-RecAP16 p53, y ratones p53 WT sin tratar. La tinción de von Kossa reveló una mejor mineralización ósea con dosis mayores de LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16. Los centros secundarios de osificación y la región de hueso cortical muestran una mejora notable en la mineralización (negro) en comparación con los no tratados. Hay menos hueso trabecular en LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 en comparación con WT, pero el aumento de la mineralización en la región trabecular, así como más osteoide, que se espera se convierta en hueso trabecular. B/C) Análisis de BV/TV y OV/BV para LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 demostraron menos volumen de hueso y un mayor volumen osteoide que los controles de la misma edad.

Figura 9: Mejora de los niveles de osteomalacia e PP_i de plasma en ratones $Alpl^{-/-}$ tratados con LVL-RecAP. A) El análisis histológico de los fémures de $Alpl^{-/-}$ tratado con vehículo (p18), LVL-RecAP8 (p51), LVL-RecAP16 p53, y ratones p53 WT sin tratar. La tinción con tricrómico de Goldner de las secciones de fémur muestran la osteomalacia grave en $Alpl^{-/-}$, y la mejora de la mineralización en la zona cortical y en la osificación secundaria con dosis mayores de LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16. La presencia de áreas ampliadas de osteoide, sugiere deposición de hueso, pero aún no mineralizado. B/C) Concentraciones de PP_i en el plasma de ratones $Akp2^{-/-}$ que recibieron LVL-RecAP1, LVL-RecAP16, y WT. El tratamiento de LVL-RecAP1 conduce a una reducción significativa de

los niveles de PP_i elevados en ratones Alpl^{-/-} en p18. En el tratamiento de LVL-RecAP16 p53 dio lugar a una corrección de los niveles de PP_i de plasma comparables a los controles WT.

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

Figura 11: Tratamiento de LVL-RecAP rescata parcialmente el fenotipo dentoalveolar en ratones Alpl^{-/-}. En comparación con (A) radiografía y (D) análisis μ CT de controles de tipo salvaje en p25-26, mandíbulas de ratón Alpl^{-/-} no tratado (B, F) destacan el hueso alveolar (AB) hipomineralizado y reducido, molares cortos (M1, M2 y M3) con la dentina fina (DE) y las cámaras de pulpa anchas, y la dentina defectuosa del incisivo (asterisco blanco) (INC). En comparación con (E) histología de los tejidos periodontales de control, (G) ratones Alpl^{-/-} no muestran cemento acelular (AC), y el osteoide de hueso alveolar invade el espacio PDL, creando anquilosis ósea-diente (asterisco). (C, H) Ratones Alpl^{-/-} tratados con LVL-RecAP8 muestran una mejor apariencia radiológica de altura molar, el espesor de la dentina, y la mineralización ósea, aunque los dientes incisivos siguen siendo defectuosos. (I) Histológicamente LVL-RecAP no restaura el cemento acelular a la superficie de la raíz. En comparación con los controles (J, L) en p53, (K, M) ratones Alpl^{-/-} tratados con LVL-RecAP16 muestran una reducción de la mineralización ósea alveolar alrededor de los dientes molares. La forma molar y la mineralización aparecen relativamente normales en ratones Alpl^{-/-} tratados, mientras que los dientes incisivos se encuentran seriamente afectados por el análogo de la raíz (asterisco blanco). En comparación con la histología de (N) los molares de control WT, (P) ratones Alpl^{-/-} tratados con LVL-RecAP16 disponen de una mezcla de hueso mineralizado alveolar y osteoide (asteriscos), y un espacio PDL reducido pero mantenido. La mala inserción periodontal se evidencia por la falta de cemento, la desorganización PDL y el desprendimiento, y el crecimiento hacia abajo del epitelio de unión. Se observaron pequeñas regiones de unión de PDL (chevron) al diente. En comparación con la organización fuerte y paralela de las fibras de colágeno PDL en (O) los tejidos de control, indicados por tinción picrosirius bajo luz polarizada, (Q) ratones Alpl^{-/-} tratados con LVL-RecAP16 disponen de una PDL menos organizada, aunque las regiones de organización y unión existe adyacente a la penetración de las áreas de unión de raíz de diente (chevron blanco).

Figura 12: El tratamiento de RecAP atenúa la producción de citoquinas inducida por LPS en las células epiteliales humanas del túbulo proximal (ciPTEC). ciPTEC se pre-trata con recAP (1-5-10 U/ml), seguido de incubación con LPS (10 g/ml) durante 24 horas y posteriormente TNF- α , la producción de IL-6 e IL-8 se midió (A) en el nivel de gen en las células por qPCR (10 U/ml recAP)

y (B) en el nivel de proteína en el sobrenadante por ELISA. (C) recAP (10 U/ml) se administró 2 horas precedentes a la exposición de LPS, simultáneamente con LPS o 2 horas después de la exposición LPS, seguido de la medición de TNF- α , contenido de proteína IL-6 e IL-8. (D) CIPTEC se pre-trata con AP inactivo durante 2 horas, a falta de propiedades hidrolizantes, seguido de incubación de LPS (10 g/ml) durante 24 horas, después de TNF- α , se midió el contenido de proteína IL-6 e IL-8. Las células de control se incubaron con medio de cultivo. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n = 5), # p < 0.05 en comparación con el control, * p < 0.05 en comparación con LPS.

Figura 13: Los efectos de recAP no se limitan a la inflamación inducida por LPS y son específicos renales. CIPTEC se pre-trata con recAP (10 U/ml) durante 2 horas seguido de una incubación de 24 horas con (A) TNF- α (10 ng/ml) o (B) sobrenadante de células mononucleares de sangre periférica estimuladas por LPS (PBMC, 1 ng/ml LPS), después de la producción de IL-6 e IL-8 se midió en el nivel de proteína por ELISA. (C) PBMC se preincubaron durante 2 horas con recAP (10 U/ml), seguido por la exposición de LPS (1 ng/ml) durante 24 horas. La producción de IL-6 y TNF- α se midió por ELISA. Las células de control se incubaron con medio de cultivo. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n = 5), # p < 0.05 en comparación con el control, * p < 0.05 en comparación con LPS.

Figura 14: El efecto de RecAP sobre la liberación de ATP inducida por LPS in vitro. CIPTEC se pre-trata con recAP (10 U/ml), seguido de incubación con LPS (10 mg/ml o 100 mg/ml). Después de 30 minutos, se recogió el sobrenadante para determinar la liberación de ATP celular mediante bioluminiscencia. Las células de control se incubaron con medio de cultivo. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n = 5), # p < 0.05 en comparación con el control.

Figura 15: RecAP previene el deterioro inducido por LPS de la función renal in vivo. La función renal se evaluó mediante la medición transcutánea de FITC-sinistrina $t_{1/2}$. AKI se indujo en ratas por LPS (0.3 mg/kg de peso corporal, t = 0), seguido de tratamiento con recAP (1000 U/kg de peso corporal) en t = 2. Las mediciones $T_{1/2}$ se realizaron en t = 2 horas y t = 21.5 horas (A, B: ejemplos de cinéticas de FITC-sinistrina obtenidas para una rata en los dos respectivos puntos de tiempo). Se recogió orina entre t = 5 y t = 16 y se tomaron muestras de plasma en t = 1.5 y T = 24 horas, lo que permite el cálculo de (C) la excreción de urea fraccionada y (D) aclaramiento de creatinina con el valor de plasma promedio de t = 1.5 y t = 24. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (Placebo, LPS n = 6; LPS + RecAP n = 5), # p < 0.05 en comparación con placebo.

Figura 16: RecAP previene el daño renal durante IKA inducida por LPS in vivo. (A) Excreción urinaria de KIM-1 y (B) excreción de NGAL, (C) los niveles de NGAL en plasma (T = 24), y (D) contenido de proteína renal KIM-1 se determinaron por ELISA. (E) Secciones de parafina de riñón se tiñeron con anti-KIM-1 para visualizar la expresión de la proteína KIM-1. Barras de escala: 400 μ m (panel izquierdo), 200 μ m (panel derecho). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM

(Placebo, LPS n = 6; LPS + RecAP n = 5; parámetros urinarios: Placebo n = 5), # p < 0.05 en comparación con placebo.

Figura 17. No hubo efecto de RecAP sobre las citoquinas inducidas por LPS en el sobrenadante. El sobrenadante de CIPTEC (Control) incubado con LPS (10 µg/ml) o incubado con medio durante 24 horas se recolectó, se incubó con o sin recAP (10 U/ml) durante otras 24 horas seguido por la medición de TNF-α, IL 6 e IL-8 por ELISA. Los datos se expresan como media ± SEM, # p < 0.05 comparado con el control, * p < 0.05 en comparación con LPS.

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

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

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

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Estabilidad de LVL-RecAP en regulador de pH

Materiales:

Fosfatasas alcalinas recombinantes humanas:

1. sALPI-ALPP-CD (SEQ ID NO: 4) (DOM: 04-Ag-2008)
2. LVL-recAP (SEQ ID NO: 1) (DOM: 14-Oct-2011)

Métodos:

Dependencia de zinc:

Se determinó el contenido de proteína y actividad enzimática de ambos lotes de fosfatasa alcalina recombinantes humana. Posteriormente las soluciones de proteínas 100 µg/ml fueron preparados para cada condición para determinar la dependencia de zinc para lotes de sALPI-ALPP-CD y LVL-recAP como se indica en el cuadro 2.

Las muestras preparadas fueron almacenadas a temperatura ambiente y se analizaron para la actividad de la enzima a T = 0, T = 2 horas y T = 24 horas.

CUADRO 2

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

Condición	Zn (μ M)	BSA (%)	Mg (mM)	Manitol (%)	EDTA (mM)
1	0	0	1	1	0
2	0.01	0	1	1	0
3	10	0	1	1	0
4	100	0	1	1	0
5	1000	0	1	1	0
6	0	0	1	1	2
7	0	0	1	1	5
8	0	0	1	1	10
9	0	0	1	1	100
10	50	0.025	1	1	0

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

Las concentraciones de proteína se determinaron mediante mediciones OD₂₈₀ e_(recAP 1.01 ml/mg/cm OD₂₈₀)

Resultados**CUADRO 3**

Actividad de las fosfatasas alcalinas diferentes, en las condiciones que se especifican en el cuadro 2

Diluyente	sALPI-ALPP-CD			LVL-RecAP		
	t=0	t=2	t=24	t=0	t=2	t=24
1	45.7	53.3	50	60.7	59.8	57.4
2	48.2	53.8	51.6	57.7	57.2	58.1
3	47.3	54.4	51.6	57.7	54.2	52.9
4	46.1	52	53.4	55.3	53.7	55.7
5	48.2	51.2	52.2	56.7	56.3	54.7
6	46.9	24.2	18.7	57.6	54.2*	37.7*
7	47	23.6	20.4	57.6	52.1*	38.9*
8	45	23.2	17.2	56.8	50.3*	35.8*
9	50.9	22.5	16.2	55.6	46.5*	31.2*
10	47.3	55.1	53.6	62.7	57.5	55.4

Como se muestra claramente en el cuadro 3, LVL-RecAP es considerablemente más estable (es decir, muestra la actividad enzimática más residual; denotada por valores con asteriscos) en presencia de un agente quelante de metal (EDTA) que sALPI-ALPP CD, lo que implica una menor dependencia de Zn^{2+} para su actividad.

5

EJEMPLO 2

Estabilidad de LVL-RecAP en regulador de pH

Materiales:

10

Fosfatasas alcalinas recombinantes humanas:

1. sALPI-ALPP-CD (DOM: 04-Ag-2008)
2. LVL-recAP (DOM: 14-Oct-2011)

Métodos

15

En un segundo experimento independiente, la estabilidad de sALPI-ALPP-CD y LVL-RecAP fueron probados por varias condiciones como se indica en el cuadro 4.

Para ambos lotes AP recombinantes en este experimento 100 µg/ml de soluciones de proteínas en regulador de pH de glicina 0.025 M pH 9.6, suero humano y plasma de citrato humano se prepararon para cada condición de amortiguamiento para determinar la estabilidad.

20

Todas las muestras preparadas AP recombinantes se incubaron a 37°C y se analizaron para la actividad enzimática a T = 0, T = 0.5 hora, T = 1 hora, T = 2 horas y T = 24 horas.

CUADRO 4

25

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

30

Condición	Zn (µM)	BSA %	Mg (mM)	Manitol (%)	EDTA (mM)
1	0	0	1	1	0
2	0	0	1	1	2
3	0	0	1	1	10
4	0	0	1	1	100
8	50	0.025	1	1	0

Resultados

CUADRO 5

Actividad de las fosfatasa alcalinas diferentes, en las condiciones que se especifican en el cuadro 4

Condición	LVL-recAP					sALPI-ALPP-CD				
	t=0	t=0.5	t=1	t=2	t=24	t=0	t=0.5	t=1	t=2	t=240
1	55.1	57.7	54.9	55.2	55.8	63	52.5	53.8	53.8	55.2
2	59.5	52.5	52	51.6*	37.7*	56.5	48	51.6	36.3	23.3
3	50.9	53.5	51.6	49.2*	35.2*	3.3	44.7	43.7	32.9	18.9
4	49.3	43.9	48.7	41.3*	24.2*	49.8	37.9	34.6	29.4	13.3
8	12.2	49.3	53.9	53.1	52.1	55.9	56	57.9	57.5	56

Las determinaciones de las actividades enzimáticas se realizaron según SOP PC001.

Las concentraciones de proteína se determinaron mediante mediciones de OD280 (erecAP 1.01 ml/mg/cm DO280).

Como se muestra claramente en el cuadro 5 y en línea con los resultados en el cuadro 3, LVL-recAP es considerablemente más estable en presencia de un agente quelante de metales (EDTA) que sALPI-ALPP-CD (como se indica por los valores marcados con asterisco), lo que implica una menor dependencia de Zn^{2+} por su actividad.

EJEMPLO 3

Estabilidad al calor y cinética de PLP de LVL-RecAP

MÉTODOS

Expresión de proteína

Los plásmidos de expresión que contienen sALPI-PLAP-CD y LVL-RecAP marcado con epítipo FLAG, secretado se construyeron como se describió anteriormente (Kozlenkov et al. J Biol Chem **277**, 22992-22999 (2002) y Kozlenkov et al. J. Bone Miner. Res. **19**, 1862-1872 (2004)). Las enzimas marcado con FLAG se transfectaron transitoriamente en células COS-1 por electroporación, entonces se cultivaron en medio DMEM durante 24 h, como se describió previamente (Narisawa et al. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. **293**, G1068-1077 (2007)) cuando el medio fue reemplazado con Opti-MEM libre de suero (Life Technologies). Las proteínas secretadas que contienen Opti-MEM se recogió 60 horas después de la transfección, después se filtraron a través de

un filtro de acetato de celulosa 2 μm y se dializó frente a TBS que contenía MgCl_2 1 mM y 20 μM ZnCl_2 .

Cinética de enzimas

5 Para medir las actividades catalíticas relativas de enzimas marcadas con FLAG, las placas de microtitulación se recubrieron con anticuerpo anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich) a 0.2-0.6 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Estas placas fueron incubadas con concentraciones de saturación de LVL-RecAP o sALPI-PLAP marcadas con FLAG durante 3 horas a temperatura ambiente, después de lo cual las placas se lavaron con PBS, que contenía 0.008% Tween-80 y actividades relativas de PLP se compararon para las
10 enzimas saturadas con M2.

La hidrólisis del sustrato fisiológico piridoxal-5'-fosfato (PLP) (Sigma-Aldrich) se midió a pH 7.4 en regulador de pH de ensayo estándar (regulador de pH 50 mM Tris-HCl, NaCl 100 mM, MgCl_2 1 mM y 20 μM ZnCl_2). La concentración de fosfato liberado se determinó usando P_i ColorLock Gold (Innova Biosciences) midiendo la absorbancia a 650 nm (A_{650}). Las curvas de calibración
15 construidas para aumentar las concentraciones de fosfato fueron lineales entre 0-50 μM y todos los experimentos fueron diseñados para caer dentro de este intervalo de concentraciones de fosfato hidrolizado. Las tasas de reacciones molares, expresadas como $[\text{P}_i] \text{ s}^{-1}$ se calcularon para el intervalo de concentraciones de sustrato indicado y se ajustaron a un modelo de sitio de unión a uno (GraphPad Prism) frente a [sustrato] para calcular K_m (gráficos Lineweaver-Burk no se aplicaron,
20 debido a la falta de precisión de las conversiones recíprocas a muy bajas concentraciones de sustrato).

Se utilizó una concentración de sustrato para PLP de 400 μM . La concentración de la enzima soluble fue de aproximadamente 1 nM y los tiempos de incubación varió desde 15 hasta 30 min, dependiendo de la eficiencia catalítica para cada enzima. Para garantizar las condiciones en
25 estado estacionario y corregir las señales no específicas de sustrato en el método P_i ColorLock Oro, una lectura anticipada (5 min) se restó de la lectura más tarde, y ΔA_{650} se midió en la correspondiente curva estándar P_i construida para cada experimento separado. Todos los experimentos se llevaron a cabo de tres a cinco veces y las constantes derivadas se presentan como media $\pm$ SD.

30 Para medir la estabilidad al calor, las enzimas marcadas con FLAG se incubaron a 65°C en 1 M DEA (pH 9.8) que contenía MgCl_2 1 mM y 20 μM ZnCl_2 . Las muestras se retiraron a diferentes puntos de tiempo y se colocaron en hielo, entonces se midió la actividad residual usando pNPP usando el siguiente método: La actividad de las enzimas unidas se midió como la absorbancia a 405 nm (A_{405}) como una función del tiempo a 25°C, usando pNPP (10 mM) como un sustrato, a pH
35 7.4 en regulador de pH Tris-HCl 50, NaCl 100 mM, que contiene MgCl_2 1 mM y 20 mM ZnCl_2 . Las

enzimas también se incubaron en este regulador de pH durante 10 min a temperaturas crecientes (25-100°C) y la actividad residual se midió de la misma manera.

RESULTADOS

5 Producción de enzimas marcadas con FLAG

Para comparar las propiedades cinéticas de LVL-RecAP con sALPI-PLAP, se añadió una secuencia marcada con FLAG a ambos ADNc, como se hizo anteriormente para estudiar comparativamente PLAP y TNAP (Kozlenkov et al. J Biol Chem **277**, 22992-22999 (2002) y Kozlenkov et al. J. Bone Miner. Res. **19**, 1862-1872 (2004)). Los ADNc se expresaron en células
10 COS-1 y sobrenadante de cultivo que contiene las enzimas secretadas se recuperaron. La expresión y recuperación exitosa fueron confirmados por el análisis Western blot de anticuerpo anti-FLAG.

Parámetros cinéticos con sustratos fisiológicos

Las propiedades fosfohidrolasa de LVL-RecAP y sALPI-PLAP se investigaron para
15 sustratos fisiológicos implicados en la inflamación y convulsiones, específicamente el PLP vitamero de vitamina B₆. LVL-RecAP mostró Km inferior a sALPI-PLAP (30.1 µM vs 60.7 µM) a pH fisiológico (7.4), lo que indica que LVL-RecAP mejorada tiene mayor afinidad por la PLP que sALPI-PLAP a pH fisiológico.

20 Estabilidad de la enzima

El impacto de las mutaciones de aminoácidos en LVL-RecAP sobre la estabilidad global de la enzima fue investigado por estudios de inactivación de calor. Aunque sALPI-PLAP ya tiene resistencia al calor altamente mejorada (50% de inactivación a 77.8°C), LVL-RecAP era incluso más resistente a la inactivación por calor (50% de inactivación a 80.6°C).

25

EJEMPLO 4

Distribución farmacocinética de LVL-RecAP en ratas

Parte A Radiomarcado con yodo-125

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

La proteína sALPI-PLAP fue radioyodado usando la técnica de la cloramina-T para
35 obtener ~0.5 mCi/mg de actividad final específica y ~1 mg/ml de concentración final (NaCl 0.9%).

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

A.1 Materiales

5 -sALPI-PLAP fosfatasa alcalina (496.7 U/mg) y LVL-recAP (624 U/mg) fue proporcionada por AM-Pharma a 6.34 mg/ml de concentración en 25% de glicerol p/v, Tris 5 mM, MgCl_2 2 mM, 50 μM ZnCl_2 , pH 8,0. La proteína sALPI-PLAP y la proteína LVL-RecAP se almacenaron a 4°C.

10 Radionucleido yodo-125 se adquirió de Perkin Elmer como yoduro de sodio en hidróxido de sodio 10^{-5}N (actividad específica: 643,8 GBq/mg - pureza de radionucleido: 99.95%).

-Cloramina-T (N-cloro-p-toluenosulfonamida, MW 227.6 g/mol), ácido tricloroacético, metabisulfito de sodio (MW 190.1 g/mol) y la tirosina se adquirieron de Sigma.

El regulador de pH Tris pH 5 mM 8 se preparó en el laboratorio Chelatec.

-NaCl al 0.9% fue proporcionado por Versol®.

15

A.2 Método

850 μg de proteína, aproximadamente 600 μCi de Na^{125}I , 50 μl de regulador de pH Tris y 10 μl de cloramina-T (404.8 nmol, 50 equivalentes/proteína) se añadieron sucesivamente en un tubo eppendorf de 1.5 ml Lo-Bind. La reacción se dejó agitar durante 1 minuto a temperatura ambiente. 2 μl del medio de radiomarcado se mezcló con solución MBS al 5% y la eficiencia de radiomarcado se evaluó por cromatografía en capa fina instantánea (ITLC) con 10% de TCA como eluyente (fosfatasa alcalina en la parte inferior de la tira y 125-yodo libre se eluyó en la parte superior de la tira).

20

Después de añadir 30 μl de solución de tirosina (10 mg/ml en agua) a la mezcla cruda, la sALPI-PLAP yodada y LVL-recAP yodada se purificaron por filtración en gel (G10, GE Healthcare) se eluyó con NaCl 0.9%. Las fracciones de 0.2 ml de volumen se recogieron en tubos de ensayo. La radioactividad en cada fracción se midió en un contador automático gamma calibrado para radionucleido yodo-125 (Wallace Wizard 2470-Perkin Elmer). Se combinaron las fracciones que contenían el producto radioyodado deseado. La pureza radioquímica del compuesto radiomarcado se verificó mediante ITLC.

25

30

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

La eficiencia de radiomarcado determinado por ITLC era más del 85% para ambas proteínas. Después de la purificación G10, la radiopureza de la reacción de marcado es mayor que el 97% para ambas proteínas.

35

Las características de la solución de sALPI-PLAP radiomarcada después de la purificación de G-10 se resumieron en el cuadro 6.

CUADRO 6

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

	^{125}I -sALPI-PLAP	^{125}I -LVL-RecAP
Eficiencia del marcado (ITLC)	86.36%	85.64%
Purificación de G10		
Concentración (mg/ml)	1.149	1.145
Actividad específica (mCi/mg)	0.669	0.544
Actividad volúmica (mCi/ml)	0.791	0.637
Radiopureza (%)	97.23	97.8

A.4 Actividad de fosfatasa alcalina

La actividad enzimática de sALPI-PLAP radiomarcada se evaluó a través de ELISA.

Materiales

- Kit de ensayo colorimétrico de fosfatasa alcalina (ab83369 referencia - Número de lote: GR118166-3).

- Fosfatasa alcalina humana recombinante no marcada diluida en 0.25 mg/ml en NaCl 0.9%

- Fosfatasa alcalina humana recombinante radiomarcada diluida en 0.25 mg/ml en NaCl 0.9%

Protocolo

El kit Abcam utiliza fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) como un sustrato de fosfatasa que se vuelve amarillo ($\lambda_{\text{max}} = 405 \text{ nm}$) cuando se desfosforiló por AP. El kit puede detectar 10-250 μU AP en muestras.

El ensayo colorimétrico de la fosfatasa alcalina se realizó en sALPI-PLAP no marcada y radiomarcada. El ensayo se realizó como se describe en el protocolo proporcionado por Abcam.

En pocas palabras, una curva estándar fue generada de 0 a 20 nmol/pozo de estándar de pNPP (volumen final: 120 μl). Se añadieron 10 μl de solución de enzima AP en cada

pozo. En paralelo, la muestra de ensayo de sALPI-PLAP se diluyó 15000 y 8000 veces en regulador de pH de ensayo. Se añadieron 10 y 20 µl de cada dilución y el volumen final se llevó hasta 80 µl con regulador de pH de ensayo. Después, se añadieron 50 µl de solución pNPP a cada pozo que contenía la muestra de ensayo.

5 Las reacciones estándar y de muestra se incubaron 60 min a 25°C en la oscuridad. Todas las reacciones se detuvieron a continuación con 20 µl de solución de interrupción. El O.D. a 405 nm se midió en un lector de microplacas.

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

actividad de sALPI-PLAP (U/ml) = $A/V/T$ x factor de dilución de la muestra de prueba

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

V: volumen de la muestra añadida en el pozo de ensayo (en ml)

15 T: tiempo de reacción en minutos

Actividad de sALPI-PLAP (U/mg) = actividad de sALPI-PLAP (U/ml)/concentración de sALPI-PLAP (mg/ml)

Resultados

20 El cuadro 7 resume los resultados.

CUADRO 7

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

	Actividad de sALPI-PLAP (U/mg)		
	Dilución 1/15000	Dilución 1/8000	Media
sALPI-PLAP	474.6	471.6	473.1
¹²⁵ I-sALPI-PLAP	482.6	475.3	479.0
LVL-RecAP	501.3	530.2	515.8
¹²⁵ I-LVL-RecAP	539.2	588.5	563.8

30

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

35

**Parte B: ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA ¹²⁵I-SALPI-
PLAP EN RATAS SANAS**

B.1 Materiales

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

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

Manejo de los animales

20	Cría: Las ratas fueron alojadas en instalaciones de los animales antes del tratamiento y en la sala de radiactividad después del tratamiento. Alimentación: Dieta de rata de libre disposición. No hay periodo de ayuno antes del tratamiento. Agua: El agua del grifo fue entregada por botella de polipropileno ad libitum. Alojamiento: Antes del tratamiento, los animales fueron alojados en grupos de tres en jaulas de policarbonato en condiciones estándar, identificados por una tarjeta que indica el número de estudio, el número de animales, el sexo, y las fechas de comienzo y el final del estudio. Los animales designados para el equilibrio de excreción fueron trasladados en jaulas de metabolismo (uno por jaula) tras el tratamiento. Ambiental: La temperatura se registró cada día. La temperatura de la habitación era entre 22 y 24°C. El ciclo de luz artificial se controla mediante un temporizador automático (10 horas de luz, 14 horas de oscuridad). Personal: Los asociados involucrados fueron calificados y entrenados apropiadamente.
----	--

Selección: Los animales fueron examinados en la recepción por el director del estudio. Sólo se seleccionaron los animales sanos. Se prestó especial atención a cualquier signo de reacción inflamatoria en los animales (por ejemplo, abscesos; inflamación de la piel, etc).

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

Las soluciones yodadas de sALPI-PLAP y LVL-RecAP se diluyeron a 0.25 mg/ml en NaCl 0.9% justo antes de la administración in vivo.

10 B.3 Diseño del estudio

El diseño del estudio se presenta en los cuadros 8 y 9.

CUADRO 8

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

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

20

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

CUADRO 9

Diseño para el estudio para la distribución de ^{125}I -LVL-RecAP in vivo

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

30

B.4 Administración

En el momento del experimento, el peso medio de las ratas Sprague Dawley era aproximadamente 240 g. Ratas sin anestesiarse se inyectaron por vía intravenosa en la vena lateral de la cola (izquierda) en un nivel de dosis de 400 $\mu\text{g/kg}$ que corresponde a una cantidad de 96 μg de proteína por rata y una actividad de aproximadamente 58 μCi por rata. El volumen de inyección fue de aproximadamente 380 μl . Los volúmenes de dosis individuales se calcularon utilizando el peso corporal individual de cada rata en el día del tratamiento. Las ratas se colocaron en un dispositivo de contención. Con el fin de dilatar los vasos sanguíneos de la cola, la cola se sumergió en agua caliente (45°C) y luego se desinfectó con alcohol. La solución de dosificación se inyectó lentamente en la vena de la cola. Con el fin de calcular la dosis real recibida por cada rata, las jeringas se pesaron antes y después del tratamiento y una alícuota de solución de dosificación se contó en un contador gamma.

B.5 Distribución en varios órganos

En el momento del sacrificio, los animales se anestesiaron por inyección intraperitoneal de 2.5 ml/kg de peso corporal de una mezcla de clorhidrato de ketamina (50 mg/ml) y clorhidrato de xilazina (20 mg/ml) en PBS. Las ratas se sacrificaron entonces rápidamente por exanguinación mediante punción intracardiaca. Los órganos de interés se cosecharon seguido del corte en trozos de órganos con peso superior a 2 g como el hígado, el estómago, el intestino delgado y el colon. Cada pieza se enjuaga después con suero fisiológico antes de limpiarse con papel suave, se pesaron y se contaron separadamente. Los órganos seleccionados fueron el hígado, riñones, corazón, pulmones, bazo, músculo esquelético, fémur, cerebro, tiroides, estómago, intestino delgado con contenido, colon con contenido, piel y grasa perirrenal.

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

La concentración de radiactividad en los órganos/tejidos se expresa como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g). El análisis de datos incluye el porcentaje de la dosis inyectada (% ID) y la cantidad equivalente de proteína por órgano o tejido. Para órganos bien definidos, estos se calcularon utilizando la radiactividad contada en un órgano entero. Para la sangre, esto se aproximó suponiendo que los conteos de sangre representa el 6.4% del peso corporal total.

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

B.6 Distribución en la sangre y suero de rata

La sangre y el nivel radiactivo en suero

En el momento del sacrificio, las muestras de sangre se obtuvieron de exanguinación mediante punción intracardiaca en la rata anestesiada por inyección intraperitoneal de una mezcla de clorhidrato de ketamina y clorhidrato de xilazina en PBS.

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

Cada muestra de sangre se recogió en tubos previamente pesados Microvette con activador de coagulación (Sarstedt). Los tubos se pesaron y se midió la radiactividad en el contador gamma.

Las muestras de sangre se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y, a continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 10 000 g para preparar el suero. El suero se recogió en tubos previamente pesados y se contó en el contador gamma.

La concentración de radiactividad en la sangre y el suero se expresó como porcentaje de la dosis inyectada y la cantidad equivalente de sALPI-PLAP por ml.

El análisis de datos incluye el porcentaje de la inyección calculado para la sangre entera y suero.

Los cuadros 10 y 11 muestran la relación de radiactividad medida en los diferentes órganos en relación con la radiactividad de suero sanguíneo de sALPI-PLAP y LVL-RecAP respectivamente. La figura 2 muestra la relación de la relación de órgano/sangre LVL-RecAP a la relación órgano/sangre sALPI-PLAP. Una relación de 2, por ejemplo, indica que LVL-RecAP está dirigida dos veces para el órgano indicado como sALPI-PLAP. Las relaciones mayores indican además que relativamente más actividad de LVL-RecAP se encuentra en un órgano en particular cuando se utiliza la misma dosis.

CUADRO 10

Relación de órgano/sangre para sALPI-PLAP

ÓRGANOS	0.5H	2H	6H	24H	48H
Tiroides/ Tráquea	0.1624 ±0.0157	4.6771±0.4433	31.745±5.175	208.16±23.74	733.85±79.16
Piel	0.0307±0.0035	0.2842±0.0134	0.4661±0.1617	0.9448±0.2565	1.0787±0.3686
Riñones	0.2076±0.0011	0.3438±0.0310	0.3535±0.0219	0.3250±0.0467	0.4299±0.0219
Estómago	0.0446±0.0016	1.0699±0.1665	3.0622±0.6977	1.4478±0.1200	3.5819±0.9018
Bazo	0.5388±0.0796	0.4133±0.0322	0.2880±0.0283	0.2256±0.0270	0.2273±0.0254

5	Hígado	5.2403±0.1943	1.9917±0.0347	0.4811±0.0877	0.3219±0.0325	0.4676±0.0295
	Corazón	0.1824±0.0136	0.2259±0.0198	0.2605±0.0217	0.2791±0.0387	0.2809±0.0165
	Pulmones	0.1777±0.0119	0.2767±0.0318	0.3397±0.0730	0.3833±0.0091	0.3937±0.0251
	Músculo esquelético	0.0334±0.0033	0.0978±0.0193	0.0842±0.0178	0.0876±0.0038	0.0947±0.0150
	Grasa	0.0095±0.0023	0.0261±0.0070	0.0509±0.0111	0.0615±0.0065	0.0874±0.0153
	Cerebro	0.0160±0.0031	0.0257±0.0011	0.0213±0.0011	0.0253±0.0025	0.0408±0.0063
	Fémur	0.1886±0.0217	0.1991±0.0131	0.1901±0.0155	0.1602±0.0119	0.1612±0.0132
	Intestino delgado	0.1882±0.0247	0.8440±0.1896	1.1055±0.0827	1.0729±0.1268	0.6329±0.1044
	Colon	0.0227±0.0028	0.0777±0.0077	0.4150±0.0489	0.3473±0.0596	0.3991±0.0964

10

CUADRO 11**Relación de órgano/sangre para LVL-RecAP**

	ÓRGANOS	0.5H	2H	6H	24H	48H
15	Tiroides/ Tráquea	0.5934±0.0892	7.3638±1.5049	52.934±13.475	462.83±34.395	1075.2±118.65
	Piel	0.0942±0.0012	0.4110±0.0485	0.6843±0.0810	1.2130±0.1243	1.9213±0.8965
	Riñones	0.5793±0.0187	0.6425±0.0555	0.6428±0.0098	0.8238±0.0826	1.2481±0.1089
	Estómago	0.2262±0.1021	1.5983±0.3099	6.2917±3.5698	3.0042±1.2012	0.9930±0.3279
	Bazo	2.2771±0.1172	1.0977±0.1190	0.5831±0.0292	0.3673±0.0796	0.3623±0.0429
20	Hígado	7.6513±0.9295	3.8409±0.0277	0.6131±0.0900	0.5869±0.0967	0.7940±0.0133
	Corazón	0.2030±0.0105	0.2762±0.0096	0.2780±0.0316	0.2630±0.0138	0.3144±0.0023
	Pulmones	0.3007±0.0201	0.3740±0.0446	0.4332±0.0111	0.3966±0.0235	0.4515±0.0220
	Músculo Esquelético	0.0462±0.0072	0.0997±0.0142	0.1036±0.0251	0.0784±0.0113	0.0953±0.0080
	Grasa	0.0298±0.0078	0.0380±0.0063	0.0495±0.0034	0.0781±0.0155	0.0970±0.0245
	Cerebro	0.0261±0.0052	0.0389±0.0085	0.0253±0.0028	0.0288±0.0016	0.0646±0.0100
25	Fémur	0.3764±0.0102	0.2973±0.0098	0.2460±0.0149	0.1804±0.0325	0.1746±0.0370
	Intestino Delgado	0.1573±0.0049	0.5625±0.0393	1.0308±0.1134	0.9402±0.0935	0.6612±0.1003
	Colon	0.0361±0.0047	0.1049±0.0271	0.3658±0.0693	0.5353±0.1967	0.4787±0.0712

EJEMPLO 5

30

Modelo de ratón Akp2^{-/-} de hipofosfatasa infantil

El modelo de ratón Akp2^{-/-} de hipofosfatasa infantil se conoce en la técnica (J Dent Res 90 (4): 470-476, 2011). En resumen, los ratones Akp2^{-/-} fueron creados por la inserción del cartucho Neo en el exón 6 del gen TNALP de ratón (Akp2) a través de la recombinación homóloga

para inactivar funcionalmente el gen Akp2, lo que resulta en ARNm de TNALP no detectable o proteína.

El uso de animales y los procedimientos de recolección de tejido siguieron los protocolos aprobados por el

5 Comité de Sanford-Burnham Medical Research Institute de Ética Animal.

Los animales fueron tratados con vehículo (N = 10), 1 mg de LVL-RecAP/kg/día (N = 10); 8 mg de LVL-RecAP/kg/día (N = 8) o 16 mg de LVL-RecAP/kg/día (N = 10).

La supervivencia se midió y se evaluó el desarrollo del esqueleto. Se evaluó la mineralización de los riñones. Plasma PPI, plasma piridoxal, calcio plasmático y niveles de fosfato se midieron, el fémur y/o longitud de la tibia para los diferentes grupos de tratamiento se midieron. Los datos MicroCT se recolectaron para el análisis de hiperosteodosis residual en cada dosis.

Resultados

- La supervivencia a largo plazo mejorada para los animales tratados en 16 mg/kg/día (figura 3).

- Hubo rescate (incompleto) del defecto esquelético en los huesos largos, incluso a la dosis más alta (datos no mostrados)

- Hubo algo de rescate en el fenotipo dental (datos no mostrados).

- No parece haber rescate de craneosinostosis (datos no mostrados; pendiente de confirmación)

- El trabajo de los riñones está todavía en curso. No había indicación de mineral en los riñones de los ratones no tratados y menos mineral en los riñones de los ratones tratados (datos no mostrados).

25

EJEMPLO 6

Isquemia-reperfusión en un modelo de riñón de cerdo

MATERIALES Y MÉTODOS

Vehículo, Control e Información del artículo de prueba

30

Preparación del artículo de control y prueba

El artículo de control fresco, solución diluyente de LVL-RecAP (placebo), se preparó para su uso en el estudio antes de cada administración de la dosis y se almacenó refrigerada entre 2 y 8°C cuando no esté en uso.

El artículo de prueba, LVL-RecAP, se utilizó tal como se recibió. No se hizo el ajuste para la pureza en la preparación de las formulaciones de artículos de prueba. Las formulaciones del artículo de prueba se prepararon mezclando con el volumen apropiado de solución salina estéril para lograr concentraciones nominales de 0, 0.96, o 4.8 mg/ml. Las formulaciones se prepararon antes de cada administración de dosis bajo una campana de flujo laminar utilizando un equipo estéril y técnicas asépticas. Las formulaciones se dispensan en el número apropiado de botellas de suero de vidrio ámbar, se mantuvieron en hielo antes de su uso y se utilizaron para la dosificación en 2 horas de la preparación. En ocasiones, las preparaciones adicionales se hicieron según sea necesario durante el curso del estudio.

10

Análisis de las formulaciones de dosificación

Muestras por duplicado de 0.5 ml de la formulación de dosificación final se recolectan antes de la dosificación en cada día de la preparación en el día 0 (grupos 3 a 7) y el día 7 (grupo 7). Se recogieron muestras de las capas medias y se almacenaron congeladas (entre -50 y -90°C) para su posible análisis futuro.

15

Información del sistema de prueba

Adquisición de los animales y aclimatación

20

Cerdos mestizos Yorkshire domésticos sin tratamiento previo experimentalmente machos (cerdos de granja) (aproximadamente 8 a 10 semanas de edad, en la recepción) se recibieron de Midwest Research porcina, Gibbon, Minnesota. Durante el periodo de aclimatación de 10 a 28 días, los animales se observaron diariamente con respecto a la salud general y cualquier signo de enfermedad. Óvulos y evaluaciones de parásitos en muestras de heces se realizaron, y todos los resultados fueron negativos para los animales colocados en el estudio.

25

Aleatorización, asignación al estudio, y mantenimiento

El uso de procedimientos de asignación al azar simples separados, los animales (con un peso de 12.5 a 25.0 kg al azar) fueron asignados a los grupos de control y tratamiento identificadas en el cuadro 12 siguiente.

30

CUADRO 12
Asignaciones del grupo

Número de grupo	Nivel de dosis	Número de animales macho ^a	
		Inicial	Evaluable
1	Control	7	6
2	Simulado ^b	7	6
5	0.32 mg/kg	7	6
6	1.6 mg/kg	7	7
7	0.32 mg/kg/día ^c	7	7

^aEn el día 0, los animales fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico en el que se retiró el riñón izquierdo o derecho y la arteria renal contralateral se ocluyó durante 45 minutos. Después de la oclusión, el recipiente se dejó reperfundir. Siete animales se sometieron a cirugía en cada grupo con la intención de lograr seis animales en estudio.

^bLos animales simulados se sometieron al procedimiento quirúrgico en el que se retiró el riñón izquierdo. Sin embargo, la oclusión y reperfusión renal no se llevaron a cabo.

^cEn el día 0, la mitad de la dosis se administró antes de la reperfusión y la mitad restante de la dosis se administró en 8 ± 2 horas después de la reperfusión. Una dosis completa se administró diariamente durante el resto del periodo en la vida.

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

A cada animal se le asigna un número de animales utilizado en el sistema de recolección de datos Provantis™ y se implantó con un microchip que lleva un número de identificación único. Cada animal también fue identificado por una etiqueta de vendedor en la oreja. El número individual de los animales, el número de implantes, número de etiqueta auricular, y el número de estudio comprendió una identificación única para cada animal. Cada jaula se identificó por el número de animales, el número de estudio, número de grupo, y el sexo.

Los animales fueron alojados individualmente en corridas con suelo elevado o jaulas de acero inoxidable móviles con suelo recubierto de plástico. Este tipo de alojamiento proporciona un espacio adecuado para el ejercicio de estos animales. El enriquecimiento animal se proporciona de acuerdo con MPI Research SOP. Se proporcionó la iluminación fluorescente durante aproximadamente 12 horas por día. El ciclo de oscuridad fue interrumpido de manera intermitente debido al estudio de las actividades relacionadas. La temperatura y humedad se controlaron continuamente, registraron, y se mantuvieron en la mayor medida posible dentro de los intervalos del

protocolos designados de 16.1 a 27.2°C y 30 a 70%, respectivamente. Los resultados reales de temperatura y humedad no son reportados, pero se mantienen en el archivo de estudio.

La dieta (Certified Lab Diet # 5K99, PMI Nutrition International, Inc.) se ofrece a través de la alimentación limitada, excepto durante períodos designados. El enriquecimiento de los alimentos, incluyendo los bits de fibra o tabletas, se ofrece como sea necesario.

Procedimientos quirúrgicos

Medicamentos relacionados con el procedimiento

El siguiente cuadro 13 presenta los medicamentos relacionados con el procedimiento y los niveles de dosis utilizados durante el curso del estudio.

CUADRO 13

Medicaciones relacionadas con el procedimiento y niveles de dosis

15	Intervalo, nivel de dosis y ruta		
	Medicación	Cirugía (Día 0)	Poscirugía diaria
	Maleato de acepromazina	0.1 mg/kg IM	-
	Sulfato de atropina	0.05 mg/kg IM	-
	Telazol	5 a 8 mg/kg IM	-
	Isoflurano	Para realizar por inhalación	-
20	Buprenorfina	0.02 mg/kg IM TID	0.02 mg/kg IM TID x 3 días
	Ketoprofeno	3 mg/kg IM	3 mg/kg IM SID x 3 días
	Cefazolin	25 mg/kg IV	-
	Ceftiofur	2.2 mg/kg IM	2.2 mg/kg IM SID x 3 días
	Solución de Ringer lactada (LRS)	10 a 15 ml/kg/hr IV	-
25	Marcaína	2 mg/kg INF	-
	0.9% NaCl	Según se necesite para irrigación	-
30	IV – Intravenosa IM – Intramuscular	INF – Infundido en incisión SID – Una vez al día	TID – dos veces al día (cada 6 a 9 horas)

Los procedimientos pre y postoperatorios se realizaron de acuerdo con MPI Research SOP. Los animales se mantuvieron en ayunas durante al menos 8 horas antes de la cirugía y la anestesia fue inducida y mantenida como se indica en el cuadro 13. La temperatura corporal se

mantuvo a $37 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Antes de la cirugía, se realizan los ultrasonidos para determinar si los quistes renales estaban presentes. Si no se observaron quistes, el riñón izquierdo se eliminó y el riñón derecho se trató como se describe a continuación. Si los quistes estaban presentes en un riñón, esos riñones se eliminaron y el riñón contralateral se sometió al procedimiento de oclusión. Si los quistes estaban presentes en ambos riñones, el animal se eliminó del estudio sin someterse al procedimiento quirúrgico.

Procedimiento quirúrgico

La lesión renal por isquemia/reperfusión se indujo usando el procedimiento publicado por Lee et al (J. Vet. Med. Sci 72(1): 127-130). Una vez anestesiados, los animales se colocaron en decúbito dorsal y los sitios quirúrgicos se prepararon con toallitas alternantes de exfoliante de clorhexidina y solución. Una laparotomía media se realizó para exponer ambos riñones. Con base en los resultados del ultrasonido, se extirpó el riñón izquierdo o derecho.

Para animales del grupo 2 (simulado), las compresas de laparatomía insertadas después se retiraron y contabilizaron y el abdomen se lavó con cloruro de sodio caliente. El abdomen se cerró de una manera rutinaria y la piel se cerró con grapas para la piel y el pegamento de tejido. Los animales se dejaron recuperar entonces.

Para todos los otros animales, después de la extirpación del riñón designado, los vasos renales restantes fueron aislados y retraídos usando bucles de los vasos. Los bucles de los vasos se utilizaron para ocluir los vasos durante $45 (\pm 1)$ minutos, después de lo cual se dejó reperfundir los vasos. Una dosis de bolo intravenoso del artículo de control o de ensayo se administró en un volumen de dosis de 0.333 ml/kg (una dosis media de 0.167 ml/kg se administró a los animales del grupo 7) justo antes de la reperfusión. Para todos los grupos 1, 5 y 6 animales (control, 0.32, y 1.6 mg/kg), las compresas de laparatomía implantadas se retiraron a continuación y contabilizaron, el abdomen se lavó y se cerró como se describió anteriormente, y los animales se dejaron recuperar. Para todos los animales del grupo 7 (0.32 mg/kg/día), se realizó una incisión en la ingle y se aisló la vena femoral izquierda o derecha. Un catéter se avanzó en el vaso y el catéter se implantó debajo de la piel y exteriorizó a través de una incisión hecha en el tórax. Un puerto se adjuntó y ancló al músculo con una sutura no absorbible. Las compresas de laparatomía implantadas se retiraron a continuación y contabilizaron, el abdomen se lavó y se cerró como se describió anteriormente, y los animales se dejaron recuperar.

Administración del artículo de prueba o control

En el día 0, el artículo de control o de ensayo se administró por vía intravenosa a todos los animales de los grupos 1, 5, y 6 justo antes de la reperusión en una dosis completa de 0, 0.32, y 1.6 mg/kg, respectivamente. Todas las dosis se administraron a un volumen de dosis de 0.333 ml/kg. También en el día 0, el artículo de ensayo se administró por vía intravenosa a todos los animales del grupo 7 en un nivel de dosis combinada de 0.32 mg/kg en dos medias dosis separadas de 0.16 mg/kg en un volumen de dosis de 0.167 ml/kg. La primera dosis se administró justo antes de la reperusión y la segunda dosis se administró a aproximadamente 8 ($\pm$ 2) horas después de la reperusión. Las dosis completas de 0.32 mg/kg/día (0.333 ml/kg) se administraron a todos los animales del grupo 7 en los días 1 a 7 aproximadamente a la misma hora del día como la dosis inicial del día 0 ($\pm$ 2 horas).

Estadística

El cuadro 14 siguiente define el conjunto de comparaciones utilizadas en los análisis estadísticos descritos en esta sección.

CUADRO 14

Cuadro de comparaciones estadísticas

Grupo de referencia	Grupos de comparación
1	2, 5, 6, 7
2	5, 6, 7
5	7

25

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

30

Análisis de medidas repetidas de covarianza (RMANCOVA)

Para los puntos finales medidos en tres o más intervalos de tiempo después de la prueba, se realizó un análisis de medidas repetidas (modelo mixto). Para cada punto final, el modelo probado de los efectos del tratamiento, el tiempo, y la interacción de tratamiento y tiempo.

Los datos antes de la prueba (última medición antes de la dosificación) se incluyeron en el modelo como una covariable.

Si no hay un tratamiento significativo ($p > 0.05$) por interacción en tiempo, se evaluó el efecto de tratamiento principal. Si el efecto del tratamiento no fue significativo ($p > 0.05$), los resultados se consideraron no significativo y no se realizaron más análisis en la variable. Si el efecto del tratamiento fue significativo ($p < 0.05$), contrastes lineales se construyeron para la comparación por pares de cada grupo de tratamiento con el grupo de referencia. Si la interacción fue significativa ($p < 0.05$), cada grupo de tratamiento se comparó con el grupo de referencia apropiado a través del simple efecto de "tratamiento" para cada punto de tiempo. Estas comparaciones por pares de simple efecto se obtuvieron de la interacción "tratamiento por tiempo".

Los resultados de todas las comparaciones por pares son reportados en los niveles de significancia 0.05 y 0.01. Todas las pruebas fueron pruebas de dos colas.

Resultados

Suero de creatinina

Como se muestra en la figura 4, hubo elevaciones de creatinina en todos los intervalos de media a moderada, con relación a los valores pre-prueba. La creatinina tendió a aumentar al máximo a las 24 horas post-reperfusión, y luego disminuir gradualmente en intervalos posteriores. Los cambios en la creatinina fueron consistentes con la reducción de la filtración glomerular secundaria a la lesión renal relacionada con el procedimiento (datos no mostrados). En la mayoría de los grupos de tratamiento, y en la mayoría de los intervalos, la administración del artículo de prueba tiende a atenuar las elevaciones relacionadas con el procedimiento en la creatinina, que muestra el efecto protector de LVL-recAP.

Como se ilustra en la figura 5 hubo elevaciones dependientes de la dosis en la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en todos los grupos de tratamiento que recibieron el artículo de prueba a las 24 horas post-reperfusión, en relación a los valores anteriores a la prueba. La actividad de ALP disminuyó gradualmente en los grupos de tratamiento que recibieron = 1.6 mg/kg, pero continuó aumentando progresivamente en los animales que recibieron 0.32 mg/kg/día.

EJEMPLO 7**Pruebas de seguridad en humanos**Materiales y métodos

5

Objetivos:

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

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

Diseño y Tratamientos

Este es un estudio de 2 partes de un solo centro en un número previsto de 50 sujetos sanos. La parte A será un estudio aleatorizado, doble ciego, con placebo controlado, de dosis única ascendente (SAD) en un máximo de 4 grupos secuenciales de 8 sujetos masculinos y femeninos sanos cada uno (6 en LVL-recAP y 2 en el grupo placebo). Se hará un intento de incluir en cada grupo de tratamiento un igual número de sujetos masculinos y femeninos, con un mínimo de 2 y un máximo de 4 hembras por grupo. Una sola dosis de LVL-recAP o placebo se administró por infusión i.v. durante 1 hora. La parte B será un estudio aleatorizado, doble ciego, de dosis múltiple ascendente, con placebo controlado (MAD) en un máximo de 2 grupos de 9 sujetos masculinos y femeninos sanos cada uno (6 en LVL-recAP y 3 en el grupo placebo). Se hará un intento de incluir en cada grupo de tratamiento un igual número de sujetos masculinos y femeninos, con un mínimo de 2 y un máximo de 4 hembras por grupo. Los sujetos recibirán una infusión i.v. de 1 hora de LVL-recAP o placebo en los días 1, 3 y 5. Se administraran los siguientes tratamientos:

25

Parte A

Grupo 1: infusión de 1 hora 200 U/kg LVL-recAP

Grupo 2: infusión de 1 hora 500 U/kg LVL-recAP

Grupo 3: infusión de 1 hora 1000 U/kg LVL-recAP

30

Grupo 4: infusión de 1 hora 2000 U/kg LVL-recAP

Parte B

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

Grupo 6: infusiones de 1 hora 1000 U/kg LVL-recAP en los días 1, 2 y 3

Después de la terminación del día 9 del grupo 1 y el día 4 del grupo 2 de la parte A, se realizará una evaluación intermedia PK.

En función de los resultados, los programas de muestreo de infusión y PK se pueden ajustar para los grupos SAD y MAD restantes.

- 5 En este primer estudio en seres humanos, los sujetos que participan en la dosis más baja en la parte A (grupo 1) se dosificarán de acuerdo con un diseño centinela de dosificación para garantizar el mínimo riesgo. Esto significa que, inicialmente, 2 sujetos serán dosificados. Uno de estos sujetos recibirá la medicación activa LVL-recAP y el otro sujeto recibirá placebo. Si los resultados de seguridad y tolerabilidad de las primeras 24 horas después de la dosificación de los
- 10 sujetos iniciales son aceptables para el Principal Investigador, los otros 6 sujetos del nivel de dosis más bajo se dosificarán de una manera aleatorizado con placebo controlado (5 activos, 1 placebo).

Período de observación

- 15 Parte A: desde el día -1 hasta 48 horas (día 3) después de la administración del fármaco. Las visitas cortas ambulatorias al centro de investigación clínica en los días 4, 6, 9 y 15

Parte B: desde el día -1 hasta 48 horas (día 7) después de la última administración del fármaco. Las visitas cortas ambulatorias al centro de investigación clínica en los días 8, 10, 13 y 19

Los sujetos serán seleccionados para elegibilidad a las 3 semanas anteriores a la administración del fármaco (primera) de cada grupo del estudio.

- 20 Los exámenes de seguimiento se llevarán a cabo en el día 15 (parte A) y el día 19 (parte B).

Sujetos

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

Principales criterios para la inclusión

- Género: masculino o femenino
- Edad: 18-55 años, inclusive
- 30 Índice de masa corporal (BMI): 18.0-30.0 kg/m², inclusive

Fármaco de estudio

Fármaco activo

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

Actividad: una enzima hidrolasa responsable de la desfosforilación de mono-ésteres de ácido fosfórico

Indicación: Lesión renal aguda
 Fuerza: 600, 1500, 3000 y 6000 U/ml
 5 Forma de dosificación: infusión i.v.
 Fabricante: pharmacy of PARA

Placebo

Sustancia: Citrato 20 mM, sorbitol 250 mM, 2 mM MgCl₂, 50 µM ZnCl₂, pH 7.0
 10 Actividad: ninguna
 Indicación: no aplicable
 Fuerza: no aplicable
 Forma de dosificación: infusión i.v.
 Fabricante: Nova Laboratories Ltd, Gloucester Crescent, Wigston, Leicester, LE18 4il,
 15 Reino Unido

Criterios para la evaluación

Seguridad: eventos adversos (AE), signos vitales (incluyendo sistólica en posición supina y presión arterial diastólica, pulso, temperatura corporal, frecuencia respiratoria),
 20 electrocardiograma de 12 derivaciones (ECG), monitoreo cardíaco continua (telemetría), laboratorio clínico (incluyendo la pruebas químicas clínicas [AP se considera un parámetro PK], hematología y análisis de orina), examen físico y anticuerpos anti-fármacos (ADA)

Farmacocinética: Los parámetros farmacocinéticos basados en el análisis de concentraciones séricas de la actividad de LVL-recAP y AP.

25

Resultados

Los períodos de tiempo de dosificación y observación para todos los grupos de dosificación se han concluido y no se observaron acontecimientos adversos graves en ninguno de los grupos. Los análisis de todos los parámetros medidos están en curso.

30

EJEMPLO 8

Materiales y Métodos

5

Ratones

La generación y caracterización de ratones $Alpl^{-/-}$ se han reportado previamente (Narisawa et al., 1997). La HPP infantil de fenocopia de ratones $Alpl^{-/-}$, incluyendo la deficiencia global de los defectos de acumulación y mineralización TNAP, PP_i (Fedde et al., 1999; Narisawa et al., 2001; Anderson et al., 2004; Millan et al., 2008). La suplementación dietética con vitamina B6
 10 suprime brevemente las convulsiones y extiende la vida útil hasta los días postnatales 18-22 pero la hipomineralización y la acumulación de osteoide siguen empeorando con la edad (Narisawa y col., 1997; Fedde et al., 1999; Narisawa et al., 2001; Millán et al., 2008). Por lo tanto, todos los animales (criadores, madres lactantes, perritos, y los animales destetados) en este estudio tuvieron libre acceso a la dieta de roedores modificada en laboratorio 5001 que contienen niveles elevados (325
 15 ppm) de piridoxina. La genotipificación se realizó por PCR sobre el ADN genómico como se describió anteriormente (Yadav et al., 2011). El Comité para el cuidado y uso de animales institucional (IACUC) aprobó todos los estudios con animales.

Fosfatasa alcalina humana quimérica soluble (LVL-RecAP)

20

Una solución de LVL-RecAP en 10.1 mg/ml en 25% glicerol p/v, 5 mM Tris/HCl, 2 mM $MgCl_2$, 50 μM $ZnCl_2$, y un pH 8.0 se usó. La enzima tenía una pureza de > 99.99%, determinada por cromatografía líquida de alta presión.

Estudio de respuesta a la dosis con LVL-RecAP

25

Los ratones $Alpl^{-/-}$ se dividieron en 5 cohortes: Tratado con vehículo Ratones $Alpl^{-/-}$ tratados con vehículo (n = 14) solamente; LVL-RecAP1: Ratones $Alpl^{-/-}$ tratados con LVL-RecAP en 1 mg/kg/día (n = 14); LVL-RecAP8: Los ratones $Alpl^{-/-}$ tratados con LVL-RecAP en 8 mg/kg/día (n=12); y LVL-RecAP16: Los ratones $Alpl^{-/-}$ tratados con LVL-RecAP en 16 mg/kg/día (n=10). Camadas de tipo salvaje de ratones $Alpl^{-/-}$ sirvieron como animales de referencia y no recibieron inyecciones
 30 (n=14). El vehículo o cohortes LVL-RecAP fueron inyectados diariamente SC en la región escapular. Las inyecciones se administraron entre 08:00-11 a.m. Los volúmenes administrados se calcularon con base en el peso corporal medido antes de la inyección. Todos los tratamientos se iniciaron el día 1 postnatal, y se repitieron diariamente hasta por 53 días o hasta el momento de la necropsia.

35

Recolección de muestras

La necropsia se realizó en el día postnatal 53 (p53), 24 horas después de la inyección final de LVL-RecAP para aquellos animales que completaron el protocolo experimental, o antes, para aquellos animales que parecían enfermos terminales. Avertin se administró por vía intraperitoneal antes de la eutanasia. La sangre se recogió en tubos de heparina de litio por punción cardiaca. La necropsia consistió en un examen de patología general y radiografías.

Radiografía y tomografía microcomputada (μ CT)

Radiografías de los esqueletos se obtuvieron con un Faxitron MX-20 DC4 (Chicago, IL, USA), utilizando una energía de 20 kV. Las hemi-mandíbulas fueron escaneadas a 30 kV. Los cráneos enteros diseccionados de ratones P21 se fijaron, y luego escanearon a una resolución de voxel isotrópico de 18 μ m utilizando el sistema de imágenes eXplore Locus SP μ CT (GE Healthcare Imaging Preclínica, London, ON, Canadá). Las mediciones se tomaron a un voltaje de funcionamiento de 80 kV y 80 mA de corriente, con un tiempo de exposición de 1600 ms utilizando la técnica de exploración de método de Parker, que gira 180 grados la muestra, además de un ángulo de abanico de 20 grados. Las exploraciones fueron calibradas a un fantasma hidroxapatita y las imágenes 3D se reconstruyeron en un tamaño voxel efectivo de 18 μ m³. Un umbral fijo de 1400 unidades Hounsfield se utilizó para discriminar tejido mineralizado. Las regiones de interés (ROI) para huesos parietales y frontales se establecieron como 1 mm de longitud, 1 mm de ancho, profundidad equivalente al espesor de los huesos y la posición de partida a una distancia de 0.75 mm a partir de las suturas sagital y coronal, como se ha descrito previamente (Liu et al., 2014). Los parámetros de volumen óseo, densidad y estructura se midieron utilizando la versión 2.2 del software Microview (GE Healthcare Imaging Preclínica, London, ON) y algoritmos establecidos (Meganck et al, 2009; Umoh et al., 2009). Se realizaron pruebas t de Student comparando los resultados cuantitativos para establecer diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos. Se analizaron los datos de hueso μ CT y se presentaron de acuerdo con las recomendaciones de Buxsein et al. 2010 (Buxsein et al., 2010).

Para las imágenes dentales, hemi-mandíbulas disecadas fueron escaneadas en un Scanco Médico μ CT 50 (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Suiza) a 10 micras de tamaño de voxel. Las mandíbulas z-apiladas se exportaron como archivos DICOM y reorientaron utilizando el software ImageJ (1.48r), con planos coronal, sagital y transversal comparables de sección elegidos para la comparación. Para el análisis cuantitativo, las mandíbulas fueron escaneadas en un Scanco Médico 35 μ CT en 6 micras de tamaño de voxel, 55KVp, 145 mA, con 0.36 grados de paso de rotación (intervalo angular de 180 grados) y una exposición de 400 ms por visión. Se utilizó el software Scanco μ CT (HP, DEOwindows Motif 1.6) para la reconstrucción 3D y visualización de imágenes.

Después de la reconstrucción en 3D, corona, esmalte, raíces, y los volúmenes de hueso alveolar fueron segmentados usando un umbral global de 0.6 g/cc. El volumen total (TV), volumen de hueso (BV) (tejido mineralizado), y la densidad mineral del tejido (TMD) se midieron para toda la corona y por separado para el esmalte, la dentina de la raíz y el hueso alveolar en la región de bifurcación.

- 5 Para el esmalte y la raíz, también se midió el espesor.

Análisis histológicos

- Las muestras de hueso se limpiaron, se fijaron en paraformaldehído al 4%/solución salina amortiguada con fosfato durante 3 días a 4°C, y después se transfirieron a etanol al 70% para su almacenamiento a 4°C. Las secciones de plástico se prepararon como se ha descrito previamente (Yadav et al., 2012). La tinción tricrómica Von Kossa y Van Gieson se realizó en secciones de plástico como se ha descrito previamente (Narisawa et al., 1997). Las secciones teñidas con Von Kossa o Van Gieson fueron escaneadas por el sistema ScanScopeXT (Aperio, Vista, CA, USA), y las imágenes fueron analizadas utilizando el software Bioquant Osteo (Bioquant Osteoanalysis Co., Nashville, TN, USA). Las hemi-mandíbulas izquierdas usadas para histología se fijaron en solución de Bouin durante 24 horas, y luego desmineralizaron en solución AFS (ácido acético, formaldehído, cloruro de sodio), y se fijaron en parafina para el seccionamiento en serie, como se ha descrito previamente (Foster, 2012). Para la tinción con rojo picrosirio, las secciones de tejido desparafinado se tiñeron con una solución acuosa al 0.2% de hidrato de ácido fosfomolibdico, 0.4% Rojo directo 80, y 1.3% de 2,4,6-trinitrofenol (Polysciences, Inc., Warrington, PA), como se describe anteriormente (Foster, 2012). Se observaron secciones teñidas de rojo picrosirio bajo luz polarizada para una microfotografía.

Pruebas biomecánicas

- Después de la eliminación del tejido muscular, longitudes de fémur, tibia, húmero y el radio se midieron con un calibrador. Los huesos fueron congelados, envuelto en una gasa que contiene una solución salina para evitar la deshidratación. Los fémures y tibias aislados fueron evaluados con la prueba de flexión de tres puntos mediante el uso de la máquina de ensayo universal de material Instron 1101 como se describió previamente (Huesa et al., 2011). Los huesos se descongelaron lentamente y se mantuvieron a temperatura ambiente antes de la prueba. Los fémures intactos y tibias se colocaron en la máquina de ensayo sobre dos soportes separados por una distancia de 15 mm y la carga se aplicó a la mitad de la diáfisis, creando así una prueba de flexión en tres puntos a una velocidad de $2 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$.

Ensayo PP_i

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

Estadística

Teniendo en cuenta que las diferentes concentraciones de LVL-RecAP resultaron en diferentes tasas de supervivencia, no fue posible comparar las tres cohortes de tratamiento de una manera que la edad coincidiera. Por esta razón, se realizó la prueba t-Student paramétrica, no apareada, de dos colas para comparar los ratones Alpl^{-/-} con el cohorte WT. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Con el fin de comparar las diferencias en las curvas de supervivencia entre las cohortes de tratamiento, se realizó la prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Resultados

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

La supervivencia en los ratones que recibieron 8 mg/kg/día (LVL-RecAP8) o 16 mg/kg/día (LVL-RecAP16) de LVL-RecAP fue significativamente mejorada en comparación con el cohorte tratado con vehículo y cohorte (LVL -RecAP1) 1 mg/kg/día ($p = 0.001$) (figura 6A). Las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando las curvas de supervivencia de las cohortes tratadas se comparan entre sí ($p < 0.0001$ para todas las comparaciones). La mediana de la supervivencia fue de 44, 22 y 19 días en las cohortes LVL-RecAP8, LVL-RecAP1 y las cohortes tratadas con vehículo, respectivamente. Una no mediana de la supervivencia podría ser calculada para la cohorte LVL-RecAP16 ya que los animales vivían hasta la terminación del experimento en el día 53.

Los animales Alpl^{-/-} pesan menos que sus compañeros de camada WT, comenzando alrededor de p7. El tratamiento con 1 mg/kg/día de LVL-RecAP condujo a un aumento estadísticamente significativo en el peso corporal en comparación con los ratones tratados con vehículo, y una diferencia no significativa en comparación con los compañeros de camada WT a los 18 días de tratamiento (figura 6B). Los ratones Alpl^{-/-} mueren por lo general por p18-24 en la dieta de vitamina B6, por lo tanto, la comparación de cohortes de LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 de larga vida con los ratones tratados con vehículo no fue posible, y estos fueron comparados en cambio con los ratones WT. Los animales en la cohorte LVL-RecAP8 pesaron significativamente menos que sus compañeros de camada WT de p18 (figura 6B) mientras que los ratones en la cohorte LVL-RecAP16

mostraron la normalización del peso corporal, y eran indistinguibles de los ratones WT en p53 (figura 6B).

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

5 Las radiografías de ratones no tratados $Alpl^{-/-}$ (figura 7A) demostraron profundas anomalías esqueléticas, incluyendo reducción de la densidad mineral del tejido y huesos fracturados, como se describe anteriormente (Yadav et al., 2011). Encontramos una mejora en la patología esquelética en ratones $Alpl^{-/-}$ que recibieron 1 mg/kg/día de LVL-RecAP durante 18 días (figura 7A), y el beneficio fue más profundo en las cohortes LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 (figura 7B). Las
10 extremidades distales muestran una morfología normalizada, independientemente de la dosis, mientras que se observó la corrección parcial de la columna vertebral, extremidades delanteras, patas traseras, y la caja torácica para todas las cohortes de tratamiento. Los ratones LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 también presentaron pequeñas grietas o fracturas en los fémures y tibias. El contorno articular en las rodillas y codos presenta irregularidades en LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 en p44 y
15 p53, respectivamente (figura 7).

Para evaluar el grado de mejora de la osteomalacia, se realizó un análisis histomorfométrico de las secciones no descalcificadas incluidas en plástico de las patas traseras de ratones de control WT y tratados con LVL-RecAP (figuras 8A y 9A). Se midió el volumen de hueso y osteoide (figuras 8B, 8C) y los niveles de PP_i de suero también analizados (figuras 9B, 9C). De
20 acuerdo con resultados anteriores (Yadav et al., 2011), la tinción de von Kossa reveló que los ratones $Alpl^{-/-}$ muestran graves defectos en la mineralización, hueso cortical delgado, reducción de hueso trabecular y centros de osificación deteriorados (figura 8A), mientras que los animales tratados con LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 mostraron un hueso cortical significativamente incrementado y centros de osificación secundarios mejorados. La histomorfometría (figuras 8B, 8C)
25 reveló que la relación de BV/TV (figura 8B), en las cohortes LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16, fue todavía significativamente menor que en los controles WT de la misma edad (0.0321 y 0.0302, $N = 9$), mientras que el porcentaje de OV/BV (figura 8C) fue significativamente mayor para las dos cohortes de tratamiento en comparación con los controles WT (0.0001 y 0.0175, $N = 9$). Las diferencias entre las cohortes de tratamiento de LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 no fueron estadísticamente significativas.
30 La tinción con tricrómico histológico (figura 9A) en secciones de plástico de las extremidades posteriores confirmaron estos hallazgos. Los ratones $Alpl^{-/-}$ han reducido gravemente la masa ósea mineralizada (regiones de manchado verde), con deficiencias en el hueso cortical y trabecular marcado por acumulación de osteoide (regiones teñidas de rojo). Por el contrario, los controles WT de 53 días de edad tienen huesos corticales robustos, hueso trabecular presente en las osificaciones secundarias y poco osteoide en superficies óseas. Los ratones $Alpl^{-/-}$ en las cohortes LVL-RecAP8 y
35

LVL-RecAP16 muestran una mejora significativa en el hueso cortical, especialmente en la cohorte LVL-RecAP16, donde no se observaron diferencias importantes en comparación con los ratones WT. Si bien la formación de hueso trabecular en los centros de osificación secundarios en ratones $Alpl^{-/-}$ se mejora por el tratamiento, los ratones LVL-RecAP8 y LVL-RecAP16 todavía retuvieron las regiones más grandes que las normales de osteoide (rojo). De acuerdo con los hallazgos de esqueletos, encontramos la corrección de las concentraciones de PP_i en suero en todas las cohortes de tratamiento. Los animales LVL-RecAP1 (figura 9B) albergan niveles de PP_i reducidos significativamente en comparación con los animales de control tratados con vehículo. Los animales tratados con LVL-RecAP16 tienen niveles de PP_i que son estadísticamente indistinguible de aquellos de compañeros de camada WT.

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

Los ratones $Alpl^{-/-}$ cuentan con anomalías craneofaciales y la fusión de la sutura coronal (Liu et al., 2014). Para determinar el grado en que el esqueleto craneofacial se ve afectado por el tratamiento en ratones $Alpl^{-/-}$, se realizaron análisis basados en μ CT de huesos craneales frontal y parietal. Los resultados en p21 muestran que los huesos frontal y parietal de ratones $Alpl^{-/-}$ tratados con vehículo se redujeron de manera significativa en la fracción de volumen de hueso, contenido mineral óseo, densidad mineral ósea, contenido de mineral del tejido y la densidad mineral del tejido en comparación con WT o ratones $Alpl^{-/-}$ tratados (cuadro 15). En cambio, ni el hueso frontal y el hueso parietal de ratones $Alpl^{-/-}$ tratados fueron significativamente diferentes de aquellos de los ratones de tipo salvaje. Los cráneos adultos de ratones $Alpl^{-/-}$ tratados con LVL-RecAP16 no parecen diferentes de WT en términos de tamaño y forma (figura 10).

CUADRO 15
Análisis μ CT de huesos craneales

Los huesos frontal y parietal se analizaron en ratones $Alpl^{-/-}$ no tratados (vehículo), y ratones $Alpl^{-/-}$ tratados con RecAP en p21. Los valores se reportan como media $\pm$ SD.

	Fracción de volumen óseo	Contenido mineral (mg)	Densidad mineral ósea (mg/cc)	Contenido mineral de tejido (mg)	Densidad mineral de tejido (mg/cc)
FRONTAL					
10 $Alpl^{-/-}$	0.41 $\pm$ 0.06 *	0.008 $\pm$ 0.001 *	464 $\pm$ 27 *	0.004 $\pm$ 0.001 *	595 $\pm$ 28 *
LVL-RecAP16	0.72 $\pm$ 0.15	0.018 $\pm$ 0.005	615 $\pm$ 84	0.015 $\pm$ 0.006	697 $\pm$ 57
WT	0.70 $\pm$ 0.12	0.019 $\pm$ 0.008	615 $\pm$ 79	0.016 $\pm$ 0.008	709 $\pm$ 56
PARIETAL					
15 $Alpl^{-/-}$	0.52 $\pm$ 0.05 *	0.018 $\pm$ 0.001 *	494 $\pm$ 21 *	0.005 $\pm$ 0.001 *	597 $\pm$ 12 *
LVL-RecAP16	0.72 $\pm$ 0.08	0.018 $\pm$ 0.007	608 $\pm$ 74	0.015 $\pm$ 0.006	691 $\pm$ 61
WT	0.76 $\pm$ 0.10	0.020 $\pm$ 0.007	645 $\pm$ 73	0.017 $\pm$ 0.007	726 $\pm$ 51

* Indica la significación estadística entre los genotipos y entre cohortes de tratamiento.

Tratamiento de LVL-RecAP rescata parcialmente los defectos dentoalveolares $Alpl^{-/-}$

La ablación de $Alpl$ en ratones da lugar a defectos de mineralización del desarrollo en el cemento, la dentina, hueso alveolar, y el esmalte (Foster et al, 2014A;. Foster et al, 2014b; McKee et al. 2011; Yadav et al., 2012), en consonancia con los informes de casos en seres humanos con HPP. La ausencia de resultados de cemento acelular en la pérdida de unión periodontal a la superficie de la raíz del diente y la exfoliación prematura de dientes, una característica de la HPP. Los ratones $Alpl^{-/-}$ tratados con LVL-RecAP8 y tratados con vehículo se comparan con WT en p25-26, cuando la formación del diente molar está a punto de finalizar. La radiografía y la imagen de μ CT reveló que, en comparación con los controles (figuras 11A, D), las mandíbulas de los ratones $Alpl^{-/-}$ sin tratar destacan el hueso groseramente hipomineralizado, molares cortos con dentina fina y cámaras pulpares ancha, y los incisivos gravemente defectuosos (figura 11B, F). Por histología, los dientes de ratones $Alpl^{-/-}$ aparecen sin cemento acelular y el osteoide del hueso alveolar invadió el espacio del ligamento periodontal (PDL), que conduce a la anquilosis y la pérdida de un periodonto funcional (figura 11G vs. 11E). La administración de 8 mg/kg/día de LVL-RecAP mejora la apariencia radiológica de altura molar, el espesor de la dentina, y la mineralización ósea en p26, aunque el incisivo permaneció defectuoso (figura 11C, H). Histológicamente, aunque esta dosis de LVL-RecAP no restauró el cemento acelular a la superficie de la raíz, el espacio PDL molar-asociado y las fronteras de hueso alveolar se mantuvieron mejor (figura 11I).

La cohorte LVL-RecAP16 se comparó con WT en p50-53 para determinar los efectos sobre la estructura del diente maduro y función. La radiografía y la imagen de μ CT indican una mineralización ósea alveolar e interproximal reducida alrededor de los dientes molares en las mandíbulas de ratones $Alpl^{-/-}$, en comparación con los controles (figura 11J-M). La forma del diente molar y la dentina aparecieron en gran medida normalizadas en ratones LVL-RecAP16, y esto fue confirmado por análisis μ CT del primer molar (cuadro 16). Esmalte en el grupo LVL-RecAP16 no fue diferente de WT en BV/TV o TMD. Las coronas molares y raíces mostraron una disminución leve pero significativas de 4-10% en BV/TV y TMD en comparación con WT, lo que indica la mineralización de la dentina como no rescatada por completo, y el espesor de la raíz se redujo en un 15%. La mineralización del hueso alveolar se mantuvo más gravemente defectuosa en el grupo LVL-RecAP16, con BV/TV disminuido en un 27% y TMD disminuido un 13%, en comparación con WT. Los dientes incisivos en ratones $Alpl^{-/-}$ tratados también quedaron gravemente afectados (figura 11 K, M).

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

CUADRO 16
Análisis μ CT de tejidos dentoalveolares

Los primeros molares de la mandíbula y hueso alveolar asociado se compararon en p50-53 en WT (n=5) y ratones $Alpl^{-/-}$ tratados con RecAP16 (n=4). Los valores se reportan como media $\pm$ SD.

	TV (mm ³)	BV (mm ³)	BV/TV (%)	TMD (g HA/cm ³)	Espesor (μ m)
Esmalte					
WT	0.25 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.02	98.77 $\pm$ 0.52	1.69 $\pm$ 0.05	70.2 $\pm$ 0.5
LVL-RecAP16	0.20 $\pm$ 0.02 *	0.20 $\pm$ 0.02 *	98.97 $\pm$ 0.27	1.68 $\pm$ 0.03	63.0 $\pm$ 0.5
Corona					
WT	0.61 $\pm$ 0.04	0.56 $\pm$ 0.03	91.06 $\pm$ 0.64	ND	ND
LVL-RecAP16	0.53 $\pm$ 0.03 *	0.46 $\pm$ 0.03 *	86.92 $\pm$ 0.69 *	ND	ND
Raíz					
WT	0.65 $\pm$ 0.05	0.56 $\pm$ 0.05	85.84 $\pm$ 0.74	1.07 $\pm$ 0.01	140.4 $\pm$ 8.4
LVP-RecAP16	0.56 $\pm$ 0.06	0.44 $\pm$ 0.04 *	77.27 $\pm$ 2.37 *	1.02 $\pm$ 0.01 *	121.5 $\pm$ 1.7 *
Hueso alveolar					
WT	0.44 $\pm$ 0.04	0.29 $\pm$ 0.05	65.72 $\pm$ 5.08	1.01 $\pm$ 0.02	ND
LVL-RecAP16	0.32 $\pm$ 0.05 *	0.15 $\pm$ 0.02 *	47.91 $\pm$ 4.25 *	0.88 $\pm$ 0.02 *	ND

* p < 0.05 mediante la prueba-t de muestras independientes

ND = no determinado

Referencias de literatura para el ejemplo 8

Anderson H.C., Sipe J.B., Hessle L., Dhanyamraju R., Atti E., Camacho N.P., Millán J.L. Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. Am. J. Pathol. 2004;164(3):841-847.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ and Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. J Bone Miner Res 2010;25(7):1468-86.

Fedde KN, Blair L, Silverstein, J, Coburn SP, Ryan LM, Weinstein RS, Waymire K, Narisawa S, Millán, JL, MacGregor GR, Whyte MP, Alkaline phosphatase knockout mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. J Bone Miner Res 1999; 14: 2015-2026.

Foster BL, Nagatomo KJ, Nociti FH, Fong H, Dunn D, Tran AB, Wang W, Narisawa S, Millán JL, Somerman MJ 2012 Central role of pyrophosphate in acellular cementum formation. *PLoS One* 7(6):e38393.

5 Foster B.L., Nagatomo K.J., Tso H.W., Tran A.B., Nociti F.H., Jr., Narisawa S., Yadav M.C., McKee M.D., Millan J.I., Somerman M.J. Tooth root dentin mineralization defects in a mouse model of hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 2013;28(2):271-82.

Foster BL, Nociti FH, Jr., Somerman MJ (2014a). The rachitic tooth. *Endocr Rev* 35(1):1-34.

10 Foster BL, Ramnitz MS, Gafni RI, Burke AB, Boyce AM, Lee JS et al. (2014b). Rare Bone Diseases and Their Dental, Oral, and Craniofacial Manifestations. *J Dent Res* 93(7 suppl): 7S-19S.

Hessle L., Johnson K.A., Anderson H.C., Narisawa S., Sali A., Goding J.W., Terkeltaub R., Millán J.L. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 15 2002; 99(14):9445-9449.

Huesa C., Yadav M.C., Finnillä M.A., Goodyear S.R., Robins S.P., Tanner K.E., Aspden R.M., Millán J.L., Farquharson C. PHOSPHO1 is essential for mechanically competent mineralization and the avoidance of spontaneous fractures. *Bone.* 2011;48(5):1066-1074.

20 Liu J, Nam HK, Campbell C, Gasque KC, Millán JL, Hatch NE. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase deficiency causes abnormal craniofacial bone development in the *Alpl*(-/-) mouse model of infantile hypophosphatasia. *Bone* 2014;67:81-94.

McKee M.D., Nakano Y., Masica D.L., Gray J.J., Lemire I., Heft R., Whyte M.P., Crine P., Millán J.L. Enzyme replacement therapy prevents dental defects in a model of hypophosphatasia. *J. Dent. Res.* 2011;90(4):470-476.

25 Meganck JA, Kozloff KM, Thornton MM, Broski SM and Goldstein SA. Beam hardening artifacts in micro-computed tomography scanning can be reduced by X-ray beam filtration and the resulting images can be used to accurately measure BMD. *Bone* 2009;45(6):1104-1116.

30 Millán JL, Narisawa S, Lemire I, Loisel TP, Boileau G, Leonard P, Gramatikova S, Terkeltaub R, Pleshko Camacho N, McKee MD, Crine P and Whyte MP, Enzyme replacement therapy for murine hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 777-787.

Narisawa S, Wennberg C. Millán JL, Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *J Pathol* 2001; 193: 125-133.

35 Narisawa S, Fröhlander N, Millán JL, Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn* 1997; 208: 432-446.

Umoh JU, Sampaio AV, Welch I, Pitelka V, Goldberg HA, Underhill TM et al. In vivo micro-CT analysis of bone remodeling in a rat calvarial defect model. *Phys Med Biol* 2009;54(7):2147-61.

Yadav M.C., Lemire I., Leonard P., Boileau G., Blond L., Beliveau M., Cory E., Sah R.L., Whyte M.P., Crine P., Millán J.L. Dose response of bone-targeted enzyme replacement for murine hypophosphatasia. *Bone*. 2011;49(2):250-256.

Yadav M.C., de Oliveira R.C., Foster B.L., Fong H., Cory E., Narisawa S., Sah R.L., Somerman M., Whyte M.P., Millán J.L. Enzyme replacement prevents enamel defects in hypophosphatasia mice. *J. Bone Miner. Res.* 2012;27(8):1722-1734.

Yadav, M. C., Huesa, C., Narisawa, S., Hoylaerts, M. F., Moreau, A., Farquharson, C. and Millán, J. L. Ablation of osteopontin improves the skeletal phenotype of *Phospho1^{-/-}* mice. *J. Bone Miner. Res.* In Press (2014).

EJEMPLO 9

La fosfatasa alcalina protege contra la inflamación renal

Métodos

Cultivo celular

De forma rutinaria, ciPTEC se cultivaron a 33°C (Wilmer, 2010). Las células fueron transfectadas con virus de simio 40 T-antígeno y la subunidad catalítica esencial de telomerasa humana, lo que permite que proliferen constantemente. Las células se cultivaron en F-12 de DMEM/Ham, libre de fenol rojo (Gibco, Paisly, Reino Unido), suplementado con ITS (insulina 5 µg/ml, transferrina 5 µg/ml, selenio 5 ng /ml, Sigma-Aldrich, Zwijndrecht , Países Bajos), 36 ng/ml de hidrocortisona 10 ng/ml de factor de crecimiento epidermal (Sigma-Aldrich), 40 pg/ml de triyodotironina y 10% de suero de ternero fetal (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). Precediendo a un experimento, las células se sembraron en una placa de pozos (48400 células/cm²), se incubaron durante 1 día a 33°C seguido de un período de maduración de 7 días a 37°C. En el día del experimento, se pre-incubaron las células durante dos horas con LVL-RecAP (1, 5 o 10 U/ml, especie de regalo de AM-Pharma, Bunnik, Países Bajos) (Kiffer-Moreira, 2014), seguido por incubación durante 24 horas con 10 µg/ml LPS (*E. coli* 0127:B8; Sigma-Aldrich) disuelto en 10 mM HEPES HBSS, pH 7.4 (HEPES: Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania; HBSS: Gibco). Alternativamente, 10 U/ml LVL-RecAP (~17 µg/ml) se administró a las células incubadas con LPS de forma simultánea o después de dos horas. Las células de control se incubaron con medio de cultivo únicamente. DLPS (*E. coli* 055:B5; Sigma-Aldrich, 10 µg/ml) e LVL-RecAP inactiva (17 µg/ml, regalo de AM-Pharma) se usaron como controles negativos. En diferentes series de experimentos, LPS fue sustituido por proteína hu-

mana TNF- α recombinante (Ebioscience, Viena, Austria), o sobrenadante de PBMC, preestimulado durante 24 horas con o sin LPS (1 ng/ml). Todos los experimentos (n = 5) se realizaron mínimamente por duplicado.

5 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Las PBMC se aislaron de capas leucocitarias obtenidas de donantes de sangre sanos (banco de sangre Nijmegen, n = 5) por centrifugación diferencial sobre Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Diegem, Bélgica). Las PBMC fueron resuspendidas en medio RPMI-1640 (Gibco) enriquecido con 0.5 mg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich), piruvato 1 mM (Gibco) y glutamax 2 mM (Gibco). Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 0.5×10^6 células/pozo, se pre-incubaron con o sin AP (10 unidades/ml) durante 2 horas, seguido de incubación de LPS (1 ng/ml) durante 24 horas. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

15 Ensayo de medición de ATP y de viabilidad celular

El sobrenadante se recogió 30 minutos después de la administración de LPS, con o sin tratamiento previo de LVL-RecAP, seguido de la medición directa de la producción de ATP mediante el kit de ensayo de bioluminiscencia ATP CLS II (Roche Diagnostics) según el protocolo del fabricante. La viabilidad celular se evaluó después de 24 horas de incubación de LPS llevando a cabo el ensayo de MTT. En resumen, el medio se sustituyó por solución precalentada-MTT 100 μ l (Sigma-Aldrich; 0.5 mg/ml en medio de cultivo), se incubaron durante 3 horas a 37°C, seguido por la adición de 200 μ l de DMSO para solubilizar los cristales de formazán intracelular solubilizados. La extinción de colorante se midió a 570 nm con la corrección de longitud de onda de 670 nm.

25 Modelo Animal

Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices y protocolos de los Institutos Nacionales de Salud fueron aprobados por la junta de revisión institucional de los experimentos con animales. Ratas Sprague-Dawley macho libres de patógenos específicos (RjHan: SD; Janvier, Francia) se dividieron en tres grupos: placebo (n = 6), LPS (n = 6) o LPS + LVL-RecAP (n = 6). Una muestra de plasma de referencia (sangre heparina de lito) se recogió siete días anteriores a la experimentación a través de una punción en la vena caudal usando un Multivette (Sarstedt, Etten-Leur, Países Bajos). Tres días anteriores al experimento, la función renal basal fue valorada como FITC-sinistrina $t_{1/2}$ (Schock-Kusch, 2011). En t = 0 horas, placebo (0.9% de NaCl, solución salina) o 0.3 mg/kg BW LPS (E. coli 0127: B8, disuelto en solución salina) se administró como un bolo IV para inducir insuficiencia renal inducida por LPS. En t = 1.5 horas se obtuvo plasma como se describe anteriormente. En t = 2 horas, la rata recibió un bolo IV de placebo

o LVL-RecAP (1000 U/kg de peso corporal, diluido en solución salina), seguido de una segunda medición de la función renal. En $t = 5$ horas, todos los animales recibieron 5 ml de solución salina (s.c.) para prevenir la deshidratación, seguido de un período de recolección de orina por 16 horas. En $t = 21.5$ horas la tercera medición transcutánea se realizó. En $t = 24$ horas, las ratas fueron anestesiadas (ip, 3 mg/kg de peso corporal xilazina y 80 mg/kg de peso corporal ketamina 10%), una muestra de sangre heparina de litio retrobulbar fue retirada para obtener el plasma, y se inició la perfusión corporal entera (6 min, solución salina + 50 UI/ml de heparina, 210 mbar; 3 min, 4% de paraformaldehído (PFA; 210 mbar). Después de la perfusión de solución salina, el riñón derecho se retiró cuidadosamente, se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. El riñón izquierdo, eliminado después de perfusión de PFA, se almacenó en 4% PFA a 4°C hasta su procesamiento para histología e inmunohistoquímica. Un animal del grupo LPS + LVL-RecAP y una muestra de orina del grupo placebo fueron excluidos debido a las dificultades de inyección y recolección, respectivamente.

15 Mediciones de la función renal

La función renal se evaluó en el movimiento libremente de ratas despiertas a través de la cinética de eliminación transcutánea medida de FITC-sinistrina (Fresenius Kabi, Linz, Austria), un marcador disponible en el mercado de GFR, mediante el uso de un nuevo dispositivo de medición tal como se publicó anteriormente (Schock-Kusch 2011, Schock -Kusch 2009). Brevemente, las ratas fueron anestesiados por inhalación de isoflurano (5% de inducción, mantenimiento 1.5-2%; Abbott Laboratories, Illinois, USA) y se afeitó en la parte posterior. La parte óptica del dispositivo se fijó en esta región depilada usando un parche adhesivo de doble cara diseñado específicamente (Lohmann GmbH, Neuwied, Alemania), mientras que la parte electrónica del dispositivo se incorporó en una chaqueta de roedor (Lomir Biomedical, Malone, USA). Después de establecer la señal de línea de base, se inyectó FITC-sinistrina (5 mg por 100 g de peso corporal, diluido en solución salina amortiguada) en la vena de la cola. Después de esto, los animales se dejan recuperarse de la anestesia mientras que la medición continuó durante aproximadamente 120 minutos post-inyección. $T_{1/2}$ se calculó mediante un modelo de un compartimiento aplicado sobre las cinéticas de eliminación de FITC-sinistrina medidas transcutáneamente (Schock-Kusch, 2009). Además, los parámetros de la función renal se determinaron en muestras de plasma y orina utilizando el analizador automático Hitachi 704 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). La excreción de urea fraccionada y eliminación de creatinina endógena se calcularon los valores de plasma promedio de $t=1.5$ y $t=24$.

Histología e inmunohistoquímica

Después de la fijación durante al menos 24 horas, se procesó el tejido, incrustado en el paraplasto y se seccionaron a 3 μ M de grosor. Para la histología de rutina, la tinción de HE se realizó en el tejido renal. El daño renal se evaluó utilizando un sistema de puntuación con una escala de 0 a 4 (0 = sin cambios; 4 = graves daños, por ejemplo, cambios marcados en las células del túbulo). KIM-1 se detectó por el anticuerpo primario cabra-anti-rata KIM-1 (1:50; AF3689, R & D Systems, Abingdon, Reino Unido) y anticuerpo secundario IgG de conejo-anti-cabra (1:200; P0449, DAKO, Heverlee, Bélgica). La inmunotinción se visualizó con reactivos del sistema VECTASTAIN Elite ABC (Vector Labs, Amsterdam, Países Bajos) y 3,3'-diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich), seguido de contratinción de hematoxilina. Toda la puntuación se llevó a cabo de una manera ciega.

Citoquinas y marcadores de daño renal

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

Homogeneización de tejidos

Los riñones congelados al instante se homogeneizaron por el TissueLyser LT (Qiagen, Venlo, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en el reactivo de extracción de la proteína del tejido (T-PER; Thermo Scientific, Rockford, EE.UU.), suplementado con tabletas de cóctel de inhibidores de proteasa libre de EDTA completas (Roche Applied Science, Almere, Países Bajos). El contenido total de proteína se determinó utilizando el kit de ensayo de proteína de ácido bicinónico (Thermo Scientific) y las muestras se almacenaron a -80°C hasta el ensayo.

Análisis de PCR en tiempo real

Se extrajo ARN de pella celular congelada o riñones pulverizados (2000, 30 seg; Mikro-Dismembrator U, Sartorius Stedim Biotech, Aubagne Cedex, Francia) por el reactivo Trizol. El ARN se transcribe inversamente en ADNc utilizando la transcriptasa inversa del virus de leucemia de murino de Moloney (M-MLV) (Invitrogen, Breda, Países Bajos). PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR) se realizó usando Taqman® (Applied Biosystems, Carlsbad, E.U.A.). Los genes se amplificaron y se normalizaron a la expresión de GAPDH (ciPTEC: Ct: 18.9 $\pm$ 0.1; tejido renal: Ct: 24.8 $\pm$ 0.2). La reacción de PCR se inició con una etapa de incubación de 2 min a 50°C seguido de la

desnaturalización inicial durante 10 minutos a 95°C, y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Las diferencias entre grupos se calcularon por el método comparativo $\Delta\Delta Ct$. Conjuntos de iniciadores/sonda se resumen en el cuadro 17.

5 Contenido de purina urinaria

El contenido de adenosina urinaria, AMP, ADP, ATP y cAMP se determinó por HPLC. En resumen, 4 volúmenes de orina se mezclaron con 1 volumen de cloroacetaldehído (6x diluido en regulador de pH de acetato 1M, pH 4.5; Sigma-Aldrich), seguido de derivación (60 min, 70°C, 500 rpm) y centrifugación (3 min, RT, 13400 rpm), donde después el sobrenadante se transfirió a un vial de HPLC y se inyectó. Las purinas se separaron por el sistema de HPLC (Thermo Scientific) usando una columna C18-AQ Polaris (150 x 4.6 mm) con gradiente de elución usando eluyente A (K_2HPO_4 0.1M, TBAHS 10 mM (pH 6.5), y 2% de MeOH) y eluyente B (H_2O : ACN: THF; 50:49:1). Los tiempos de retención son 7.1 (adenosina), 8.4 (AMP), 12.5 (ADP), 16.2 (ATP) y 14.8 min (cAMP). La cuantificación se basa en áreas pico de las muestras y estándares de referencia medidos con fluorescencia (excitación: 280 nm; emisión: 420 nm).

Análisis estadístico

Los datos se expresan como media $\pm$ SEM o mediana [percentil 25, percentil 75]. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias estadísticas entre los grupos se estimaron por ANOVA con comparaciones post-hoc utilizando la prueba de comparación múltiple de Bonferroni o mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la post-prueba de Dunn. Un valor de p de dos caras menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Todas las pruebas se realizaron con GraphPad Prism 5.00 para Windows (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

25

LVL-recAP atenúa la respuesta inflamatoria inducida por LPS in vitro

El pre-tratamiento de ciPTEC humano (Wilmer, 2010) con LVL-RecAP atenuada dependientemente de dosis la producción de citoquina inducida por LPS de TNF- α , IL-6 e IL-8 en el nivel de gen y proteína (figura 12A-B). LPS desintoxicado (dLPS) se utilizó como un control negativo y no tiene efecto. Los resultados protectores similares a nivel de proteína se obtuvieron cuando LVL-RecAP se administró simultáneamente con LPS o 2 horas después de la exposición de LPS (figura 12C). Un experimento de control se llevó a cabo para verificar si LVL-RecAP desfosforila las citoquinas excretadas en el medio, lo cual no es el caso (figura 17). Para confirmar que la reducción inducida por LVL-RecAP en la producción de citoquinas es debido a la naturaleza desfosforilante de

la enzima, el efecto de LVL-RecAP inactivo que carece de propiedades hidrolizantes se investigó. LVL-RecAP inactiva no atenuó la respuesta inflamatoria inducida por LPS en ciPTEC (figura 12D).

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

Para investigar además el mecanismo protector renal de LVL-RecAP, ciPTEC se incubaron con TNF- α de citoquina pro-inflamatoria, que no puede ser desfosforilado por IAP de ternero (Chen, 2010). La producción de citoquina inducida por TNF- α de IL-6 e IL-8 también se atenuó por pre-tratamiento con LVL-RecAP, mientras que LVL-RecAP inactiva no tiene ningún efecto (figura 13A).

En la patogénesis de AKI asociada con la sepsis, LPS induce una respuesta inflamatoria local a través de la unión a TLR4 expresado en PTEC (ciPTEC Ct: 30.5 ± 3.9 ; $n=5$). Otra característica de la enfermedad es la respuesta inflamatoria sistémica, que afecta tanto a las células epiteliales como endoteliales renales que causan el desarrollo de AKI (Peters, 2014). Para imitar esta inflamación renal inducida por endotoxina, ciPTEC se incubó con el sobrenadante de las células mononucleares de sangre periférica estimuladas con LPS (PBMC, 1 ng/ml LPS). Esto indujo la producción de IL-6 e IL-8, que se disminuyó cuando ciPTEC se pretrató con LVL-RecAP (figura 13B, TNF- α no es detectable). Junto con el hallazgo de que las respuestas inflamatorias mediadas por TNF- α se atenuaron por el tratamiento de LVL-RecAP, esto sugiere la presencia de otro mediador dirigido de LVL-RecAP. En contraste, el pretratamiento de PBMC con LVL-RecAP no afectó a la respuesta inflamatoria inducida por LPS en estas células (figura 13C), lo que indica que los efectos de LVL-RecAP son específicos del riñón.

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

Un segundo objetivo potencial de LVL-RecAP es ATP, liberado durante el estrés celular causado por, por ejemplo, inflamación e hipoxia (Eltzschig, 2012). ATP extracelular tiene efectos perjudiciales, pero se puede convertir mediante ectonucleotidasas (por ejemplo, AP) en ADP, AMP y, finalmente, en la adenosina, ejerciendo efectos anti-inflamatorios y protectores del tejido a través de la unión a uno de los receptores de adenosina A1, A2A, A2B y A3 (Bauerle de 2011, Di Sole, 2008). Curiosamente, mientras que la expresión de los receptores de adenosina A1, A2B y A3 en ciPTEC no se vio afectada por la incubación de LPS (datos no mostrados), la expresión A2A se sobre-reguló en la estimulación de LPS (aumento doble: 4.1 ± 0.4 ; $p < 0.001$ en comparación con placebo). Este efecto se atenuó por el co-tratamiento de LVL-RecAP (aumento doble: 2.9 ± 0.2 ; $p < 0.001$ en comparación con placebo; $p < 0.05$ en comparación con LPS), lo que sugiere un papel de

la vía de adenosina en el efecto protector de LVL-RecAP. Por otra parte, se observaron concentraciones de ATP extracelulares incrementadas después de la incubación de LPS, que fue más pronunciado con una concentración de LPS más alta pero a la inversa por la pre-incubación de LVL-RecAP (figura 14). LPS no afectó la viabilidad celular hasta 24 horas (datos no mostrados). Esto soporta la hipótesis de que LVL-RecAP puede ejercer su efecto protector renal a través de la vía de ATP/adenosina.

El tratamiento LVL-RecAP durante AKI inducida por LPS en ratas atenúa la función renal deteriorada

Para confirmar los efectos beneficiosos de LVL-RecAP in vivo, AKI se indujo en ratas por LPS (0.3 mg/kg de BW) y la función renal se evaluó mediante la medición transcutánea de las cinéticas de sinistrina etiquetadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) como se reportó anteriormente (Schock-Kusch, 2011). FITC-sinistrina se elimina por los riñones a través de filtración únicamente y su desaparición del compartimento de plasma se puede medir de forma transcutánea en tiempo real (Schock-Kusch, 2011, Schock-Kusch, 2009). Esto permite la investigación de la progresión de AKI de una manera más precisa en comparación con la eliminación de creatinina usada comúnmente. Precediendo a la inyección de LPS, una muestra de sangre de referencia se elaboró para determinar los parámetros clínicos y citoquinas plasmáticas, y la vida media de FITC-sinistrina de línea de base ($t_{1/2}$) se determinó a partir de las cinéticas medidas para determinar la homogeneidad entre los grupos (datos no presentados). Después de 1.5 horas, el tratamiento de LPS resultó en niveles de citoquinas de plasma incrementados, anomalías en varios parámetros del plasma (cuadro 18), piloerección, diarrea y actividad espontánea reducida, que confirman la presencia de inflamación sistémica. Dos horas después de la administración de LPS, las ratas se trataron con LVL-RecAP (1000 U/kg de BW) o placebo (solución salina), seguido directamente por las mediciones transcutáneas de función renal. LPS prolongó significativamente $t_{1/2}$ de FITC-sinistrina, que revela una reducción significativa en la función renal. Esta tendencia se atenuó por el tratamiento de LVL-RecAP (figura 15A). En todos los grupos, la función renal se recuperó totalmente dentro de las 24 horas (figura 15B). Todavía, los niveles de urea en plasma fueron significativamente inferiores en animales tratados con LVL-RecAP en comparación con los animales que recibieron LPS sin LVL-RecAP (cuadro 19). Además, el tratamiento de LVL-RecAP impidió el incremento inducido por LPS de la excreción fraccional de urea (figura 15C) y la disminución inducida por LPS de eliminación de creatinina endógena (figura 15D). La bioactividad de LVL-RecAP se confirmó en el plasma y mostró un aumento de ocho veces 22 horas después de la inyección (Placebo: 293 ± 12 U/ml; LPS: 260 ± 13 U/ml; LPS+AP: 2150 ± 60 U/ml; $p < 0.0001$).

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

El efecto protector renal de LVL-RecAP sobre AKI inducida por LPS se investigó además a través de la evaluación de la histología renal y marcadores de lesión tubular específicos. No se encontraron diferencias en la histología entre los grupos de tratamiento, con cambios que

5 varían desde la ausencia de daño (0) hasta cambios degenerativos mínimos como aspecto espumoso y mínima hinchazón de las células tubulares proximales (1) y apariencia espumosa y moderada hinchazón, así como unos pocos casos de apoptosis (2) (Placebo: 1 [0.75-2]; LPS: 1.5 [0-2]; LPS+ LVL-RecAP: 1 [0-1.0]). El tratamiento de LPS resultó en un incremento significativo en niveles de expresión de IL-6 renales, mientras que otras citoquinas y marcadores de lesión (MPO,

10 mieloperoxidasa; BAX, proteína X asociada con Bcl2; iNOS, sintasa de óxido nítrico inducible) no se vieron afectados (cuadro 20). LVL-RecAP no podría reducir los niveles de expresión de IL-6 renales, pero no incrementan la expresión renal de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (cuadro 20). Además, la administración de LPS resultó en un incremento significativo en la excreción urinaria de la molécula de lesión de riñón (KIM)-1 y la lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos (NGAL),

15 que se acompañó por niveles de expresión de gen renal incrementados. Este efecto se previno por la co-administración de LVL-RecAP (figuras 16A a 16B, cuadro 20). Se observaron efectos similares de LVL-RecAP para los niveles de NGAL en plasma (figura 16C) y para los niveles de proteína renales de KIM-1 (figura 16D), que se localizaron principalmente a la superficie apical de las células epiteliales del túbulo proximal (figura 16E).

20

La excreción de adenosina urinaria reducida durante AKI inducida por LPS in vivo

Con el fin de dilucidar el mecanismo protector renal de LVL-RecAP, se investigó el papel de la vía de ATP-adenosina. El tratamiento de LPS tendió a reducir los niveles de expresión génica en el riñón para los cuatro receptores de adenosina, de los cuales sólo el receptor de

25 adenosina A3 alcanzó significación estadística (cuadro 20). Curiosamente, el tratamiento de LPS disminuyó significativamente la excreción urinaria de adenosina (placebo: 68.0 ± 7.8 pg de adenosina/10 mg de creatinina; LPS: 19.4 ± 6.3 pg de adenosina/10 mg de creatinina; $p < 0.001$), sin alterar la excreción de cAMP, ATP, ADP y AMP (datos no mostrados). Esto puede sugerir que el riñón utiliza adenosina durante AKI inducida por LPS. El tratamiento de LVL-RecAP no tuvo ningún

30 efecto sobre la expresión del gen del receptor de adenosina (cuadro 20), o en la excreción urinaria de adenosina (LPS + LVL-RecAP: 16.7 ± 6.8 pg de adenosina/10 μ g de creatinina: $p < 0.001$ en comparación con placebo) en comparación con LPS solo.

CUADROS**CUADRO 17****Iniciador/especificaciones de la sonda**

5	Símbolo gen	del	Nombre del gen	ID del ensayo
	ciPTEC			
	GAPDH		gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Hs02758991_g1
10	TNF- α		factor de necrosis tumoral	Hs01113624_g1
	IL-6		interleucina 6	Hs00985639_m1
	IL-8		interleucina 8	Hs00174103_m1
	TLR4		receptor 4 tipo toll	Hs00152939_m1
	ADORA1		receptor A1 de adenosina	Hs00379752_m1
15	ADORA2A		receptor A2a de adenosina	Hs00169123_m1
	ADORA2B		receptor A2b de adenosina	Hs00386497_m1
	ADORA3		receptor A3 de adenosina	Hs01560269_m1
	Riñón de rata			
20	GAPDH		gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Rn01775763_g1
	IL-1 β		interleucina 1 beta	Rn00580432_m1
	IL-6		interleucina 6	Rn01410330_m1
	IL-10		interleucina 10	Rn00563409_m1
	TNF- α		factor de necrosis tumoral	Rn99999017_m1
25	IFN- γ		interferón gamma	Rn00594078_m1
	HAVCR1		receptor 1 celular del virus de hepatitis A	Rn00597703_m1
	LCN2		lipocalina 2	Rn00590612_m1
	MPO		mieloperoxidasa	Rn01460204_m1
	BAX		proteína X asociada a Bcl2	Rn02532082_g1
30	NOS2		óxido nítrico sintasa 2 inducible	Rn00561646_m1
	ADORA1		receptor A1 de adenosina	Rn00567668_m1
	ADORA2A		receptor A2a de adenosina	Rn00583935_m1
	ADORA2B		receptor A2b de adenosina	Rn00567697_m1
35	ADORA3		receptor A3 de adenosina	Rn00563680_m1

CUADRO 18**Citoquinas plasmáticas y parámetros experimentales**

		Placebo	LPS	LPS + recAP
5	citoquinas			
	IL-1 β (pg/ml)	9 $\pm$ 9	6913 $\pm$ 1362 [#]	5764 $\pm$ 1259 [#]
	IL-6 (pg/ml)	ND	74294 $\pm$ 11240 [#]	70247 $\pm$ 13812 [#]
	IL-10 (pg/ml)	17 $\pm$ 17	10054 $\pm$ 2017 [#]	8693 $\pm$ 2513 [#]
	TNF- α (pg/ml)	1 $\pm$ 1	21071 $\pm$ 3375 [#]	10514 $\pm$ 889 [#] *
	INF- γ (pg/ml)	ND	ND	ND
10	Parámetros de plasma			
	Creatinina (mg/dl)	0.16 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.04
	Urea (mg/dl)	28 $\pm$ 2	39 $\pm$ 2 [#]	48 $\pm$ 3 [#] *
	Lactato (mg/dl)	24 $\pm$ 5	34 $\pm$ 2	33 $\pm$ 3
	Glucosa (mg/dl)	143 $\pm$ 3	260 $\pm$ 25 [#]	216 $\pm$ 13 [#]
15	Proteína (mg/ml)	58 [56-58]	58 [48-61]	56 [56-58]
	Calcio (mmol/l)	2.59 $\pm$ 0.03	2.43 $\pm$ 0.03 [#]	2.41 $\pm$ 0.06 [#]
	Fósforo inorgánico (mmol/l)	3.01 $\pm$ 0.10	2.76 $\pm$ 0.09	2.81 $\pm$ 0.10
	Sodio (mmol/l)	149 $\pm$ 2	148 $\pm$ 2	146 $\pm$ 3
	Potasio (mmol/l)	5.89 [5.66-6.21]	4.87 [4.66-5.23]	5.08 [4.76-5.18]

20

Los parámetros del plasma se determinaron 1.5 horas después de la administración de LPS. Los datos se expresaron como la media $\pm$ SEM y mediana [percentil 25, percentil 75], dependiendo de la distribución de cada parámetro. Las diferencias en la distribución de los

25 parametros de plasma en comparación con t = 24 es probable que estén relacionadas al tamaño de la muestra. Las diferencias significativas estimadas usando ANOVA de una derivación con Bonferroni después de la prueba o la prueba de Kruskal-Wallis con Dunns después de la prueba. Placebo, LPS n = 6; LPS + recAP n = 5. # P < 0.05 en comparación con placebo. * P < 0.05 en comparación con LPS. LPS, lipopolisacárido; recAP, fosfatasa alcalina recombinante; ND: no detectado.

30

CUADRO 19
Plasma y parámetros urinarios

		Placebo	LPS	LPS + recAP
5	Parámetros de plasma			
	Creatinina (mg/dl)	0.20±0.01	0.24±0.02	0.20±0.01
	Urea (mg/dl)	28±2	48±4 [#]	36±2*
	Lactato (mg/dl)	10 [8-31]	14 [12-21]	12.0 [10-14]
	Glucosa (mg/dl)	144±7	132±11	161±3
	Proteína (mg/ml)	56 [54-57]	56 [52-57]	54 [54-58]
10	Calcio (mmol/l)	2.84 [2.7-3.1]	2.65 [2.6-2.7]	2.70 [2.6-2.8]
	Fósforo inorgánico (mmol/l)	2.95±0.09	3.06±0.10	2.95±0.09
	Sodio (mmol/l)	150 [148-157]	154 [147-155]	150 [141-154]
	Potasio (mmol/l)	4.24±0.04	4.32±0.10	4.42±0.24
	Parámetros urinarios			
15	Creatinina (mg)	5.4±0.3	6.1±0.3	5.7±0.6
	Urea (mg)	267±26	482±21 [#]	440±19 [#]
	Albumina (μg)	0 [0-54]	0 [0-663]	310 [0-419]
	Glucosa (mg)	1.59±0.25	1.74±0.28	0.99±0.27
	Proteína (μg)	38±6	67±9	61±9
	Calcio (μmol)	4.1±0.7	7.2±0.9	7.4±1.7
20	Fósforo inorgánico (mmol)	0.50 [0.3-0.9]	0.63 [0.6-1.0]	0.64 [0.6-0.8]
	Sodio (mmol)	1.6 [1.3-2.0]	1.5 [1.3-1.7]	1.5 [1.4-2.4]
	Potasio (mmol)	1.6±0.3	2.3±0.4 [#]	1.9±0.1 [#]

25 Los parámetros del plasma se determinaron 24 horas después de la administración de LPS. Los parámetros urinarios se determinaron entre 5 y 21 horas después de la administración de LPS. Los datos se expresaron como la media±SEM y mediana [percentil 25, percentil 75], dependiendo de la distribución de cada parámetro. Las diferencias significativas estimadas usando la prueba Kruskal-Wallis con Dunns después de la prueba o ANOVA de una derivación con Bonferroni

30 después de la prueba. Placebo, LPS n = 6; LPS + recAP n = 5; parámetros urinarios Placebo n=5 # P <0.05 en comparación con placebo. * P <0.05 en comparación con LPS. LPS, lipopolisacárido; recAP, fosfatasa alcalina recombinante.

CUADRO 20
Niveles de expresión génica renal

		Valores Ct			Veces de incremento ($2^{\Delta\Delta Ct}$)		
		Placebo	LPS	LPS + recAP	Placebo	LPS	LPS + recAP
Citoquinas							
	IL-1 β	27.7 $\pm$ 0.5	26.6 $\pm$ 0.2	26.9 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.5
	IL-6	37.4 [36.3-38.0]	33.5 [33.3-34.8]	34.7 [34.4-36.4]	1.2 $\pm$ 0.3	4.9 $\pm$ 0.5 [#]	5.2 $\pm$ 1.2 [#]
	IL-10	34.8 $\pm$ 0.4	32.5 $\pm$ 0.1	32.9 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.9	5.5 $\pm$ 1.2 [#]
	TNF- α	36.7 $\pm$ 0.2	35.8 $\pm$ 0.4	37.2 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.3
	INF- γ	36.3 $\pm$ 0.3	35.3 $\pm$ 0.4	35.6 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.2
Marcadores de lesión							
	KIM-1	31.7 $\pm$ 0.4	22.9 $\pm$ 0.7	25.3 $\pm$ 0.6	0.8 [0.6-1.9]	430 [195-530] [#]	113 [43-336]
	NGAL	29.1 $\pm$ 0.2	24.1 $\pm$ 1.4	25.5 $\pm$ 1.6	1.2 $\pm$ 0.3	33 $\pm$ 9 [#]	28 $\pm$ 8
	MPO	32.4 $\pm$ 0.3	31.4 $\pm$ 0.7	33.0 $\pm$ 1.0	1.0 [0.4-2.9]	1.4 [0.4-3.9]	0.6 [0.3-3.2]
	BAX	25.2 $\pm$ 0.2	24.8 $\pm$ 0.1	25.1 $\pm$ 0.3	0.9 [0.7-1.5]	0.7 [0.3-2.1]	1.0 [0.5-1.3]
	iNOS	36.2 $\pm$ 0.5	35.0 $\pm$ 0.2	34.8 $\pm$ 0.8	1.1 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 0.8
Receptores de adenosina							
	A1	28.6 $\pm$ 0.3	27.9 $\pm$ 0.3	29.3 $\pm$ 0.6	1.3 [0.4-2.3]	0.7 [0.5-1.4]	0.8 [0.3-1.5]
	A2A	27.0 $\pm$ 0.1	26.4 $\pm$ 0.2	27.3 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2
	A2B	29.0 [28.9-29.3]	28.4 [28.1-29.0]	29.0 [28.9-30.2]	1.2 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1
	A3	34.3 $\pm$ 0.3	34.2 $\pm$ 0.4	35.0 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1 [#]	0.7 $\pm$ 0.1

Los datos se expresaron como la media $\pm$ SEM y mediana [percentil 25, percentil 75], dependiendo de la distribución de cada parámetro. Las diferencias significativas del incremento múltiplo se estimaron usando la prueba Kruskal-Wallis con Dunns después de la prueba o ANOVA de una derivación con Bonferroni después de la prueba. Placebo, LPS n = 6; LPS + recAP n = 5. # P <0.05 en comparación con placebo. * P <0.05 en comparación con LPS. LPS, lipopolisacárido; recAP, fosfatasa alcalina recombinante; MPO, mieloperoxidasa; BAX, proteína X Bcl2-asociada; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible.

Referencias de literatura para el ejemplo 9

- 10 Bauerle, J.D., Grenz, A., Kim, J.H., Lee, H.T., and Eltzschig, H.K. 2011. Adenosine generation and signaling during acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 22:14-20.
- Chen, K.T., Malo, M.S., Moss, A.K., Zeller, S., Johnson, P., Ebrahimi, F., Mostafa, G., Alam, S.N., Ramasamy, S., Warren, H.S., et al. 2010. Identification of specific targets for the gut mucosal defense factor intestinal alkaline phosphatase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299:G467-475.
- 15 Di Sole, F. 2008. Adenosine and renal tubular function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:399-407.
- Eltzschig, H.K., Sitkovsky, M.V., and Robson, S.C. 2012. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med* 367:2322-2333.
- 20 Kiffer-Moreira, T., Sheen, C.R., Gasque, K.C., Bolean, M., Ciancaglini, P., van Elsas, A., Hoylaerts, M.F., and Millan, J.L. 2014. Catalytic signature of a heat-stable, chimeric human alkaline phosphatase with therapeutic potential. *PLoS One* 9:e89374.
- Peters, E., Heemskerk, S., Masereeuw, R., and Pickkers, P. 2014. Alkaline Phosphatase: A Possible Treatment for Sepsis-Associated Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients. *Am J Kidney Dis.* 63:1038-48
- 25 Schock-Kusch, D., Sadick, M., Henninger, N., Kraenzlin, B., Claus, G., Kloetzer, H.M., Weiss, C., Pill, J., and Gretz, N. 2009. Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate using FITC-sinistrin in rats. *Nephrol Dial Transplant* 24:2997-3001.
- Schock-Kusch, D., Xie, Q., Shulhevich, Y., Hesser, J., Stsepankou, D., Sadick, M., Koenig, S., Hoecklin, F., Pill, J., and Gretz, N. 2011. Transcutaneous assessment of renal function in conscious rats with a device for measuring FITC-sinistrin disappearance curves. *Kidney Int* 79:1254-1258.
- 30 Wilmer, M.J., Saleem, M.A., Masereeuw, R., Ni, L., van der Velden, T.J., Russel, F.G., Mathieson, P.W., Monnens, L.A., van den Heuvel, L.P., and Levtchenko, E.N. 2010. Novel

conditionally immortalized human proximal tubule cell line expressing functional influx and efflux transporters. Cell Tissue Res 339:449-457.

EJEMPLO 10

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

10.6. MATERIALES

10.6.1 Estándares de referencia

LVL-RecAP

10 Número de lote: NB1963p1
 PRA ID : 14-049
 Contenido de proteína: 9.9 mg/ml (OD280)
 Actividad: 6537 U/ml (660 U/mg)
 Condición de almacenamiento: nominal a -70°C
 15 Fecha de caducidad: 08 de enero de 2015

RecAP

Número de lote: 2013-052, lote 62
 PRA ID: 14-311
 Contenido de proteína: 13.3 mg/ml (OD280)
 20 Actividad: 9871 U/ml (742 U/mg)
 Condición de almacenamiento: a 2-8°C
 Fecha de caducidad: 06 de junio de 2016

10.6.2 Matriz en blanco

25 La matriz biológica después se utilizó para la preparación de soluciones de muestra.

Matriz: suero

Especies: humano

Proveedor: Sera Laboratories International, Haywards Heath, RU

Condición de almacenamiento: A una temperatura de almacenamiento nominal de -

30 20°C

PRA IDs: 14-0624, 14-0647 y 14-0652

Fecha de caducidad: 02 de mayo de 2016 (14-0624),
 06 de mayo de 2016 (14-0647 y 14-0652)

10.7. MÉTODOS

10.7.1 Preparación de soluciones

10.7.1.1 Hidróxido de sodio 2M

Una solución de hidróxido de sodio 2 molar se preparó al disolver 8 g de hidróxido de sodio en aproximadamente 90 ml de agua Milli-Q y después de enfriar a temperatura ambiente el volumen se ajustó a 100 ml. La solución se almacenó a temperatura ambiente hasta un máximo de un mes.

10.7.1.2 Cloruro de magnesio 1M

Una solución de cloruro de magnesio 1 molar se preparó al disolver 4.06 g de cloruro de magnesio hexahidratado en aproximadamente 16 ml de agua Milli-Q. Después de disolver el volumen se ajustó a 20 ml. La solución se almacenó a +4°C nominal hasta un máximo de un mes.

10.7.1.3 Cloruro de zinc 0.1M

Una solución de cloruro de zinc 0.1 molar se preparó al disolver 272.5 mg de cloruro de zinc en aproximadamente 16 ml de agua Milli-Q. Después de disolver, se ajustó el volumen a 20 ml.

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

10.7.1.4 Solución de pH 9.6 de glicina 0.025M para método de 25°C.

Una solución de pH 9.6 de glicina 0.025 molar se preparó al disolver 3.76 g de glicina en aproximadamente 1800 ml de agua Milli-Q. La solución se calentó a 25°C y se ajustó a pH 9.6 con hidróxido de sodio 2M (véase la sección 10.7.1.1). El volumen se completó hasta 2000 ml y el pH se volvió a comprobar. El pH debe ser pH 9.6 a 25°C. La solución se almacenó a +4°C nominal hasta un máximo de una semana.

10.7.1.5 Regulador de pH diluyente enzimático para método de 25°C

El regulador de pH diluyente enzimático se preparó al mezclar 0.5 ml de cloruro de magnesio 1M (véase la sección 10.7.1.2) con 0.5 ml de cloruro de zinc 0.1 M (véase la sección 10.7.1.3) y 500 ml de solución a pH 9.6 de glicina 0.025M (véase la sección 10.7.1.4). A esta solución, 5.00 g de manitol y 0.25 g de albúmina de suero bovino se añadió y se disolvió bajo agitación. El pH se verificó y si se considera necesario se ajustó a pH 9.6 a 25°C utilizando hidróxido de sodio 2M. El regulador de pH diluyente enzimático se preparó recientemente cada día.

10.7.1.6 Fosfato de p-nitrofenilo 0.0103M a pH 6 para método de 25°C

Un fosfato de p-nitrofenilo 0.0103 M a pH 9.6 se preparó al disolver 1528 mg de fosfato de p-nitrofenilo en aproximadamente 360 ml de solución a pH 9.6 de glicina 0.025M (véase la sección 10.7.1.4). El pH se verificó y si se considera necesario se ajustó a pH 9.6 a 25°C usando 5 hidróxido de sodio 2M (véase la sección 10.7.1.1). Después de verificar el pH, el volumen se ajustó a 400 ml con solución a pH 9.6 de glicina 0.025M. La solución se almacenó a +4°C nominal hasta un máximo de 5 días.

10.7.1.7 Sustrato de trabajo para método de 25°C

10 El sustrato de trabajo se preparó al mezclar 120 ml de solución a pH 9.6 de fosfato de p-nitrofenilo 0.0103M (véase la sección 10.7.1.6) con 1.25 ml de solución de cloruro de magnesio 1M (véase la sección 10.7.1.2). A esta solución aproximadamente 15 ml de solución a pH 9.6 de glicina 0.025M (véase la sección 10.7.1.4) se añadió y el pH se verificó y si se considera necesario se ajustó a pH 9.6 a 25°C utilizando hidróxido de sodio 2M (véase la sección 10.7.1.1). El volumen se 15 ajustó a 145 ml con solución a pH 9.6 de glicina 0.025 M. El sustrato de trabajo se preparó recientemente cada día.

10.7.1.8 Solución de pH 9.6 de glicina 0.025M para método de 37°C

Una solución de pH 9.6 de glicina 0.025 molar se preparó al disolver 3.76 g de 20 glicina en aproximadamente 1800 ml de agua Milli-Q. La solución se calentó a 25°C y se ajustó a pH 9.6 con hidróxido de sodio 2M (véase la sección 10.7.1.1). El volumen se completó hasta 2000 ml y el pH se volvió a comprobar. El pH debe ser pH 9.6 a 37°C. La solución se almacenó a +4°C nominal hasta un máximo de una semana.

10.7.1.9 Regulador de pH diluyente enzimático para método de 37°C

25 El regulador de pH diluyente enzimático se preparó al mezclar 0.5 ml de cloruro de magnesio 1M (véase la sección 10.7.1.2) con 0.5 ml de cloruro de zinc 0.1 M (véase la sección 10.7.1.3) y 500 ml de solución a pH 9.6 de glicina 0.025M (véase la sección 10.7.1.8). A esta solución, 5.00 g de manitol y 0.25 g de albúmina de suero bovino se añadió y se disolvió bajo 30 agitación. El pH se verificó y si se considera necesario se ajustó a pH 9.6 a 37°C utilizando hidróxido de sodio 2M. El regulador de pH diluyente enzimático se preparó recientemente cada día.

10.7.1.10 Fosfato de p-nitrofenilo 0.0103M a pH 6 para método de 37°C

Un fosfato de p-nitrofenilo 0.0103 M a pH 9.6 se preparó al disolver 1528 mg de 35 fosfato de p-nitrofenilo en aproximadamente 360 ml de solución a pH 9.6 de glicina 0.025M (véase la

sección 10.7.1.8). El pH se verificó y si se considera necesario se ajustó a pH 9.6 a 37°C usando hidróxido de sodio 2M (véase la sección 10.7.1.1). Después de verificar el pH, el volumen se ajustó a 400 ml con solución a pH 9.6 de glicina 0.025M. La solución se almacenó a +4°C nominal hasta un máximo de 5 días.

5

10.7.1.11 Sustrato de trabajo para método de 37°C

El sustrato de trabajo se preparó al mezclar 120 ml de solución a pH 9.6 de fosfato de p-nitrofenilo 0.0103M (véase la sección 10.7.1.10) con 1.25 ml de solución de cloruro de magnesio 1M (véase la sección 10.7.1.2). A esta solución aproximadamente 15 ml de solución a pH 9.6 de glicina 0.025M (véase la sección 10.7.1.4) se añadió y el pH se verificó y si se considera necesario se ajustó a pH 9.6 a 37°C utilizando hidróxido de sodio 2M (véase la sección 10.7.1.1). El volumen se ajustó a 145 ml con solución a pH 9.6 de glicina 0.025 M. El sustrato de trabajo se preparó recientemente cada día.

15

10.7.2 Solución adicionada de LVL-RecAP (500 µg/ml)

Una solución adicionada de recAP se preparó al diluir 252.5 µl de LVL-RecAP (sección 10.6.1) a 5.00 ml con regulador de pH diluyente enzimático (sección 10.7.1.5). La concentración final de la solución adicionada es 500 µg/ml, se utilizó esta solución para la preparación de las muestras de suero humano adicionadas con recAP (sección 10.7.4).

20

10.7.3 Solución adicionada de RecAP (500 µg/ml)

Una solución adicionada de RecAP se preparó al diluir 188.0 µl de RecAP (sección 10.6.1) a 5.00 ml con regulador de pH diluyente enzimático (sección 10.7.1.5). La concentración final de la solución adicionada es 500 µg/ml, se utilizó esta solución para la preparación de muestras de suero humano adicionadas con RecAP (sección 10.7.5).

25

10.7.4 Preparación de muestras de suero humano adicionadas con LVL-recAP

Las muestras de suero se prepararon por LVL-RecAP adicionada a tres lotes de suero en blanco individuales utilizando la siguiente concentración:

30

Muestras de suero de LVL-RecAP	Concentración (µg/ml)	Actividad calculada (U/L)	Volumen de adición (µl)	Volumen total (ml)
1	10.0	6603	100	5.00
2	8.00	5282	80.0	5.00
3	6.00	3962	60.0	5.00

35

4	4.00	2641	40.0	5.00
5	2.00	1321	20.0	5.00
6	1.00	660	10.0	5.00
7	endógeno	endógeno	0	5.00

5 Las muestras de suero se almacenaron a -70°C nominal hasta el análisis.

10.7.5 Preparación de muestras de suero humano adicionadas con RecAP

Las muestras de suero se prepararon por RecAP adicionada a tres lotes de suero en blanco individuales utilizando la siguiente concentración:

10

Muestras suero de RecAP	de Concentración (µg/ml)	Actividad calculada (U/L)	Volumen adición (µl)	de Volumen total (ml)
1	9.00	6680	90.0	5.00
2	7.20	5344	72.0	5.00
3	5.40	4088	54.0	5.00
4	3.60	2672	36.0	5.00
5	1.80	1336	18.0	5.00
6	0.900	668	9.00	5.00
7	endógeno	endógeno	0	5.00

15

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

20

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

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

30 La muestra 1 de la muestra LVL-RecAP y/o RecAP se diluyó al tomar 125 µl de la muestra de suero LVL-RecAP y/o RecAP y se diluyó hasta 2.50 ml con regulador de pH diluyente enzimático para preparar la solución de la muestra final para la actividad enzimática de LVL-RecAP o RecAP.

35 La muestra 2 de la muestra LVL-RecAP y/o RecAP se diluyó al tomar 125 µl de la muestra de suero LVL-RecAP y/o RecAP y se diluyó hasta 2.00 ml con regulador de pH diluyente enzimático para preparar la solución de la muestra final para la actividad enzimática de LVL-RecAP o RecAP.

La muestra 3 de la muestra LVL-RecAP y/o RecAP se diluyó al tomar 167 μ l de la muestra de suero LVL-RecAP y/o RecAP y se diluyó hasta 2.00 ml con regulador de pH diluyente enzimático para preparar la solución de la muestra final para la actividad enzimática de LVL-RecAP o RecAP.

5 La muestra 4 de la muestra LVL-RecAP y/o RecAP se diluyó al tomar 250 μ l de la muestra de suero LVL-RecAP y/o RecAP y se diluyó hasta 2.00 ml con regulador de pH diluyente enzimático para preparar la solución de la muestra final para la actividad enzimática de LVL-RecAP o RecAP.

10 La muestra 5 de la muestra LVL-RecAP y/o RecAP se diluyó al tomar 500 μ l de la muestra de suero LVL-RecAP y/o RecAP y se diluyó hasta 2.00 ml con regulador de pH diluyente enzimático para preparar la solución de la muestra final para la actividad enzimática de LVL-RecAP y/o RecAP.

15 La muestra 6 de la muestra LVL-RecAP y/o RecAP se diluyó al tomar 1000 μ l de la muestra de suero LVL-RecAP y/o RecAP y se diluyó hasta 2.00 ml con regulador de pH diluyente enzimático para preparar la solución de la muestra final para la actividad enzimática de LVL-RecAP y/o RecAP.

20 El endógeno (muestra 7) de la muestra LVL-RecAP y/o RecAP se diluyó al tomar 1000 μ l de la muestra de suero LVL-RecAP y/o RecAP y se diluyó hasta 2.00 ml con regulador de pH diluyente enzimático para preparar la solución de la muestra final para la actividad enzimática de LVL-RecAP y/o RecAP.

10.8. EJECUCIÓN, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.8.1 Equipo y Configuración

Se utilizó el siguiente método y configuraciones:

25 Espectrofotómetro: Thermo Fisher Evolution 300 UV/VIS con calentador Peltier de célula sencilla fijado a 25°C (AN-18-3) o 37°C (AN-18-4) con un agitador magnético

Longitud de onda: 405 nm

Medición: Durante 3 minutos, cada 15 segundos una medición. El primer minuto no se tuvo en cuenta para los cálculos.

30 Tipo de cubeta: Vidrio

Las siguientes soluciones se pipetearon en una cubeta de vidrio. La temperatura de las soluciones era de 25°C $\pm$ 0.5°C para AN-18-3 o 37°C $\pm$ 0.5°C para AN-18-4.

	Reactivo	Solución de muestra	Blanco
	Sustrato de trabajo	1450 μ l	1450 μ l
	Diluyente enzimático		50.0 μ l
	Muestra	50.0 μ l	
5	Volumen total	1500 μ l	1500 μ l

En primer lugar el sustrato de trabajo y el diluyente de enzima se mezclaron antes de añadir la muestra. La solución se mezcló y la cubeta se colocó inmediatamente en el espectrofotómetro y el aumento en la absorbancia se midió a partir de 1 a 3 minutos en pasos de 15 segundos para obtener al menos 9 puntos de datos. En el punto de datos del minuto 3 (último) la densidad óptica fue de = 1.5. Además la linealidad fue aceptable; el coeficiente de correlación (r) para cada réplica debe ser = 0.990. Todos los resultados de la muestra con un coeficiente de correlación (r) = 0.990 fueron tomados en cuenta para la evaluación, se informaron resultados de la muestra con un coeficiente de correlación (r) <0.990 para la única información. La actividad enzimática se realizó en modo por duplicado, una prueba de cada dilución.

10.8.2 Actividad enzimática de LVL-RecAP y RecAP

Aunque en el plan de estudio se describió que la diferencia de los dos resultados individuales (actividad enzimática) debe ser = 5.0% para aceptar los dos resultados de dilución individuales, todos los resultados con un coeficiente de correlación (r) para cada medición = 0.990 fueron utilizados para la evaluación. Esto debido a que el método de la actividad enzimática fue validado para muestras de productos farmacológicos LVL-RecAP a $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y no para otros orígenes de fosfatasa alcalina y/u otras condiciones.

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

La figura 20 muestra la actividad/ μ g de proteína a 25°C y 37°C para RecAP y LVL-RecAP. Los valores representan la actividad Δ entre 25°C y 37°C para una concentración de proteína determinada.