



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2368999 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/55 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.07.14
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.03.12
(86)	Europeisk søknadsnr	11004496.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.05.12
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.09.28
(30)	Prioritet	2007.05.11, US, 917589 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(73)	Innehaver	Alexion Pharma Holding, Canon's Court 22 Victoria Street, Hamilton HM EX Bermuda, IE-Irland
(72)	Oppfinner	Crine, Philippe, 28 Avenue Claude-Champagne, Outremont, Quebec H2V 2X1, CA-Canada Boileau, Guy, 7645 Malherbe, Brossard, Quebec J4Y 1E6, CA-Canada Loisel, Thomas P., 4959 rue Saint-Gabriel, Montreal, Quebec H8Y 1Z7, CA-Canada Lemire, Isabelle, 6538 44ième avenue, Montreal, Quebec H1T 2PI, CA-Canada Leonard, Pierre, 12364 Notre-Dame-des-Anges, Montreal, Quebec H4J 2C4, CA-Canada Heft, Robert, 141 Fairview Street, Dollard-des-Ormeaux, Quebec H9A 1V5, CA-Canada Landy, Hal, 66 Clubhouse Drive, Hingham, MA 02043, US-USA
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	BEINSØKENDE ALKALISK FOSFATASE, SETT OG FREMGANGSMÅTER AV ANVENDELSE AV DENNE
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-2005/103263 WO-A2-2006/039480 US-A1- 2007 081 984 MILLÁN JOSÉ LUIS ET AL: "Enzyme replacement therapy for murine hypophosphatasia.", JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH : THE OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR BONE AND MINERAL RESEARCH JUN 2008 LNKD-PUBMED:18086009, vol. 23, no. 6, 17 December 2007 (2007-12-17), pages 777-787, XP002585178, ISSN: 1523-4681

NISHIOKA ET AL: "Enhancement of drug delivery to bone: Characterization of human tissue-nonspecific alkaline phosphatase tagged with an acidic oligopeptide", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 88, no. 3, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 244-255, XP005524861, ISSN: 1096-7192, DOI: 10.1016/J.YMGME.2006.02.012

DUMONT JENNIFER A ET AL: "MONOMERIC FC FUSIONS: IMPACT ON PHARMACOKINETIC AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF PROTEIN THERAPEUTICS", BIODRUGS: CLINICAL IMMUNOTHERAPEUTICS, BIOPHARMACEUTICALS AND GENE THERAPY, ADIS INTERNATIONAL, FR LNKD- DOI:10.2165/00063030-200620030-00002, vol. 20, no. 3, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 151-160, XP009082835, ISSN: 1173-8804

M P Whyte ET AL: "Alkaline phosphatase: placental and tissue-nonspecific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5'-phosphate. Substrate accumulation in carriers of hypophosphatasia corrects during pregnancy.", The Journal of clinical investigation, 1 April 1995 (1995-04-01), pages 1440-1445, XP055048635, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC295625/pdf/jcinvest00025-0024.pdf> [retrieved on 2013-01-04]

Beskrivelse

OPPFINNELSENS OMRÅDE

[0001] Foreliggende oppfinnelse vedrører en beinsøkende alkalisk fosfatase, sett og fremgangsmåter for anvendelse av dette.

5

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

[0002] Hypofosfatasi (HPP) er en sjelden, arvelig form av rakitt eller osteomalasi (Whyte 2001) med en forekomst så stor som 1 per 2 500 fødsler i kanadiske mennonitter (Greenberg, 1993) og 1 per 100 000 fødsler i den generelle befolkningen for den mer alvorlige formen av sykdommen. Mildere former er mer utbredt. Denne "medfødte feilen i stoffskiftet" er forårsaket av tap-av-funksjons-mutasjon(er) i genet (*ALPL*) som koder for det vevs-spesifikke isozymet av alkalisk fosfatase (TNALP; også kjent som lever/bein/nyretype-ALP) (Weiss et al 1988; Henthorn et al. 1992a; Henthorn et al. 1992b; Zurutuza et al. 1999; Millán 1995). Det biokjemiske kjennetegnet er lavere enn normal ALP-aktivitet i serum (hypofosfat-asemi), som fører til forhøyede blod- og/eller urinnivåer i tre fosfoforbindelses-substrater: uorganisk pyrofosfat (PP_i), fosfoetanolamin (PEA), og pyridoksal-5'-fosfat (PLP) (Whyte 1994).

[0003] HPP har et bemerkelsesverdig spekter av alvorlighetsgrad som varierer fra (mest alvorlig til mildest), perinatale, infantile, barndoms, voksne og odonto-hypofosfataseformer, klassifisert historisk i henhold til alderen ved diagnosen (Whyte 2001). Det kan være nesten fullstendig fravær av beinmineralisering *in utero* med dødfødsel, eller spontane brudd og tannsykdom som forekommer først i voksen alder. Perinatal (dødelig) hypofosfatasi uttrykkes *in utero* og kan føre til dødfødsel. Noen nyfødte kan overleve i flere dager, men lider økt respiratorisk kompromiss på grunn av den hypoplastiske og rakittsykdommen i brystet. Ved infantil HPP, diagnostisert før 6 måneders alderen, virker den postnatale utviklingen normal før debuten av dårlig matning, utilstrekkelig vektøkning, og tilsynekomst av rakitt. De radiologiske trekkene er karakteristiske og viser nedsatt skjelettmineralisering, noen ganger med progressiv skjelettdemineralisering som fører til ribbensbrudd og misdannet bryst. Barndomshypofosfatasi har også et sterkt variabelt klinisk uttrykk. Tidlig tap av melketenner oppstår fra aplasi, hypoplasi eller dysplasi av dental cementum som forbinder tannroten med det periodontale ligamentet. Rakitt fører til kortvoksthet og skjelettmisdannelsene kan inkludere bøyde bein, utvidede håndledd, knær og ankler som følge av utvidet metafyse. Voksen HPP oppstår vanligvis hos middelaldrende, men de har ofte en forhistorie med rakitt og/eller tidlig tap av tenner, deretter god helse i ungdomsårene og i ung voksen alder. Tilbakevendende metatarsale tretthetsbrudd er vanlige og kalsiumpyrofosfatdihydratavsetning forårsaker anfall av artritt- og pyrofosfatartropati. Odontohypofosfatasi er diagnostisert når den eneste

kliniske abnormiteten er tannsykdom og radiologiske undersøkelser, selv beinbiopsier, avdekker ingen tegn på rakitt eller osteomalasi.

[0004] De alvorlige kliniske formene for hypofosfatasi arves vanligvis som autosomalt recessive trekk med foreldre av slike pasienter som viser subnormale nivåer av serum-AP-aktivitet (Whyte 2001). For de mildere formene av hypofosfatasi, dvs. voksen og odontohypofosfatase, er det også dokumentert et autosomalt dominant arvemønster (Whyte 2001).

[0005] I det sunne skjelettet er TNALP, et ektoenzym, til stede på overflaten til plasmamembranen av osteoblaster og kondrocytter, blant annet på membranene i de avkastede matriksvesiklene deres (MV-er) (Ali et al. 1970; Bernard 1978) der enzymet er særlig anriket (Morris et al. 1992). Avsetning av hydroksyapatitt under bein-mineralisering starter normalt inne i hulrommet i disse MV-ene (Anderson et al. 2005a). Elektronmikroskopi har vist at TNALP-manglende MV-er fra alvorlig rammede HPP-pasienter og *Akp2*^{-/-}-mus (en TNALP-nullmusmodell, se nedenfor) inneholder hydroksyapatittkrystaller, men den ekstravesikulære krystallforplantningen fremstår forsinket (Anderson 1997; Anderson 2004). Denne feilen er knyttet til den ekstracellulære opphopningen av PP_i, en potent inhiberer av forkalkning (Meyer 1984) på grunn av mangel på TNALP-aktivitet (Hessle et al. 2002; Harmey et al. 2004; Harmey et al. 2006.).

[0006] Når PP_i er til stede nær fysiologiske konsentrasjoner, i området fra 0,01-0,1 mM, har PP_i evnen til å stimulere mineralisering i organdyrkede kyllinglårbein (Anderson & Reynolds 1973) og også i isolerte rotte-mV-er (Anderson et al. 2005b), mens ved konsentrasjoner over 1 mM, inhiberer PP_i-kalsiumfosfatmineraldannelse ved å belegge hydroksyapatittkrystaller, og dermed forebygge mineralkrystallvekst og proliferativ egenkimdannelse. Dermed har PP_i en dobbelt fysiologisk rolle; det kan virke som en promotoraktivator for mineralisering ved lave konsentrasjoner, men som en inhibitor for mineralisering ved høyere konsentrasjoner. TNALP har vist seg å hydrolysere mineraliseringsinhibitoren PP_i for å lette mineralutfelling og vekst (Rezende et al. 1998). Nylige studier ved hjelp av *Akp2*^{-/-}-mus har indikert at den primære rollen til TNALP *in vivo* er å begrense mengden av ekstracellulært PP_i for å oppnå tilstrekkelig skjelettmineralisering (Hessle et al. 2002; Harmey et al. 2004.).

[0007] Alvorlighetsgraden av hypofosfatasi er variabel og modulert av karakteren av TNALP-mutasjonen. Missense-mutasjoner i nærheten av det aktive setet til enzymet, homodimergrensesnittet, kronedomenet, den aminoterminalen armen og kalsiumbindingssetet er alle blitt funnet å påvirke den katalytiske aktiviteten til TNALP (Zurutuza et al. 1999). I tillegg har andre missense-, nonsense-, leseramme- og spleisesetemutasjoner har vist seg å føre til avvikende muterte proteiner eller intracellulære trafikkfeil som fører til subnormal aktivitet på celleoverflaten. De mange mutasjonene og det faktum at forbindelsesheterozygociteten er en vanlig forekomst i

hypofosfatasi forklarer også den variable ekspressiviteten og ufullstendige gjennomtrengningen som ofte observeres i denne sykdommen (Whyte 2001).

[0008] Utviklingen av den humane formen av sykdommen drar stor fordel av eksistensen av TNALP-nullmus (*Akp2^{-/-}*) som en dyremodell. Disse *Akp2^{-/-}*-musene fenokopierer infantil HPP bemerkelsesverdig godt, siden de er født med et normalt mineralisert skjelett, men utvikler radiografisk tilsynelatende rakitter etter omtrent 6 dager, og dør mellom dag 12-16 og lider av alvorlig skjeletthypomineralisering og apnéanfall og epileptiske anfall som skyldes forstyrrelser i PLP (vitamin B₆)-stoffskiftet (Waymire et al. 1995; Narisawa et al. 1997; Fedde et al. 1999; Narisawa et al. 2001).

[0009] Noen TNALP-aktive setemutasjoner har vist seg å påvirke enzymets evne til å metabolisere PPi eller PLP annerledes (Di Mauro et al. 2002). Både PLP og PPi er bekreftede naturlige substrater for TNALP og abnormiteter i PLP-stoffskiftet forklarer epileptiske anfall observert i *Akp2^{-/-}*-mus (Waymire et al. 1995; Narisawa et al. 2001), mens abnormiteter i PPi-stoffskiftet forklarer skjelettfenotypen i denne musemodellen for hypofosfatasi (Hessle et al. 2002; Anderson et al. 2004; Harmey et al. 2004; Harmey et al. 2006; Anderson et al. 2005a).

[0010] Det er ingen etablert medisinsk behandling for HPP. Kasusrapporter om tilfeller av enzymerstatningsterapi (ERT) med intravenøse (i.v.) infusjoner av TNALP-rikt plasma fra pasienter med Paget-beinsykdom og rensset placentar ALP har beskrevet at man ikke klarte å redde berørte spedbarn (Whyte et al. 1982; Whyte et al. 1984). I en annen tilsvarende studie gjorde Weninger et al. (Weninger et al. 1989) forsøk på ERT for en hardt rammet prematur gutt med hypofosfatasi med infusjoner av rensset human lever-TNALP. Behandling (1,2 IU/kg/min) startet ved tre ukers alderen og ble gjentatt i ukentlige intervaller inntil 10 ukers alderen, når barnet døde. TNALP-prøvene ble fortynnet med 10 ml fysiologisk saltløsning og infusert i løpet av 30 min via et umbilikalt arteriekateter. Ingen giftige eller allergiske bivirkninger ble observert. Serum-TNALP-aktiviteten økte fra 3 IU/l før behandling til et maksimalt nivå på 195 IU/l med en halveringstid på mellom 37 og 62 timer. Sekvensielle røntgenstudier viste imidlertid ingen bedring av beinmineraliseringen (Weninger et al. 1989).

[0011] Det virker som ALP-aktiviteten ikke må økes i sirkulasjonen, men i selve skjelettet. Denne hypotesen støttes av tilsynelatende fordelaktige responser fra to jenter med infantil HPP etter margcelletransplantasjon der de TNALP-holdige cellene ble innført i hele skjelettet (Whyte et al. 2003). Dermed ser det ut til å være et behov for å gi aktiv TNALP til skjelettet til disse pasientene. Nyere rapporter har indikert at polyaspartatsekvenser gir beinsøkende egenskaper til rekombinant TNALP (WO 2005/103263 til Crine et al.; Nishioka et al. 2006). WO 2005/103263 beskriver beinleveringskonjugater som inkluderer f.eks. løselig alkalisk fosfatase, og fremgangsmåter for å anvende dette til målrettet behandling av beindefekter.

[0012] En fersk rapport viste at den muterte formen av TNALP R450C (selv om Nasu et al. refererer til en R433C-mutasjon, gjelder his-nummerering det modne proteinet, og ikke en omfattende signalpeptidet) produserer et protein som har en dimer struktur sammenføydd med en disulfidbro mellom cysteinrestene i posisjon 450 av hver underenhet som sterkt inhiberte sin alkaliske fosfataseaktivitet. Nasu et al. konkluderte med at tapet av funksjon resulterer fra interkjededisulfidbroen og er den molekylære basisen for den dødelige hypofosfasien forbundet med R450C (Nasu et al. 2006).

[0013] Den foreliggende beskrivelsen refererer til en rekke dokumenter, innholdet av disse er innlemmet i dette dokumentet ved referanse i sin helhet.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

[0014] Gitt de nåværende begrensningene i den kliniske håndteringen og behandlingen av pasientene med HPP var det behov for en alternativ og effektiv behandling. Følgelig tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en effektiv enzym-erstatningsterapi for behandling av HPP.

[0015] Til søkers kunnskaper, og i motsetning til tidligere forsøk på enzym-erstatningsterapi i enten TNALP-nullmus eller HPP-spedbarn der TNALP- eller andre ALP-isoenzymer ble gitt intravenøst, markerer foreliggende oppfinnelse første gang en nær fullstendig løsning av kliniske røntgen- og biokjemiske endringer er blitt dokumentert å forekomme med enzymerstatning alene.

Beinsøkende sALP

[0016] En beinsøkende alkalisk fosfatase omfatter et polypeptid som har strukturen:

$$\text{Z-sALP- Y-avstandsstykke-X-W}_n\text{- V,}$$

der sALP er det ekstracellulære domenet for alkalisk fosfatase;

der V er fraværende eller er en aminosyresekvens av minst én aminosyre; X er

fraværende eller er en aminosyresekvens av minst én aminosyre; Y er fraværende eller er en aminosyresekvens av minst én aminosyre; Z er fraværende eller er en aminosyresekvens av minst én aminosyre; W_n er et polyaspartat eller et polyglutamat der n = 10 til 16; og avstandsstykket omfatter en krystalliserbar fragmentregion (Fc), der sALP er fysiologisk aktivt mot fosfoetanolamin (PEA), uorganisk pyrofosfat (PPi) og pyridoksal-5'-fosfat (PLP).

ALP-er

[0017] Det er fire kjente ALP-isoenzymer, nemlig vevsuspesifikk alkalisk fosfatase nærmere beskrevet nedenfor, placentar alkalisk fosfatase (PALP) (f.eks. [NP_112603], [NP_001623]), kimcellealkalisk fosfatase (GCALP) (f.eks. [P10696]) og intestinal alkalisk fosfatase (f.eks. [NP_001622]). Disse enzymene har svært lik tredimensjonal struktur. Hvert av de katalytiske setene deres inneholder fire metallbindende domener for metallioner som er nødvendige for enzymatisk aktivitet, inkludert to Zn- og ett Mg-domene. Disse enzymene katalyserer hydrolysen av monoestere av fosforsyre, og katalyserer også en transfosforeringsreaksjon i nærvær av høye konsentrasjoner av fosfatakseptorer. Det har særlig vist seg at PALP er fysiologisk aktiv mot fosfoetanolamin (PEA), uorganisk pyrofosfat (PPi) og pyridoksal-5'-fosfat (PLP), alle tre er naturlige substrat for TNALP (Whyte, 1995). En samstilling av disse isoenzymene er presentert i figur 30.

TNALP

[0018] Som indikert ovenfor er TNALP et membranbundet protein forankret gjennom et glykolipid til dens C-terminal (Swiss-Prot, P05186). Dette glykolipid-ankeret (GPI) tilsettes posttranslasjonelt etter fjerning av en hydrofob C-terminal ende, som både virker som et midlertidig membrananker og som et signal for å tilsette GPI. Dermed omfattes den løselige humane TNALP-en anvendt i alle eksemplene nedenfor av et TNALP der den første aminosyren i den hydrofobe C-terminale sekvensen, nemlig alanin, erstattes av et stoppkodon. Den løselige TNALP-en (kalt sTNALP i dette dokumentet) som dannes på denne måten inneholder alle aminosyrene i nativ forankret form av TNALP som er nødvendig for dannelsen av det katalytiske setet, men mangler GPI-membranankeret. Kjent TNALP inkluderer human-TNALP [NP-000469, AAI10910, AAH90861, AAH66116, AAH21289, AAI26166]; rhesus-TNALP [XP-001109717]; rotte-TNALP [NP_037191]; hunde-TNALP [AAF64516]; grise-TNALP [AAN64273], muse-[NP_031457], storfe-[NP_789828, AAI18209, AAC33858], og katte-[NP_001036028].

[0019] Den beinsøkende sammensetningen ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter sekvenser som tilfredsstiller en konsensussekvens avledet fra det ALP-ekstracellulære domenet av humane ALP-isozymer og kjente funksjonelle TNALP-er (menneske, mus, rotte, storfe, katt og hund). Som anvendt i dette dokumentet er terminologien "ekstracellulært domene" ment å stå for en hvilken som helst funksjonell ekstracellulær del av det native proteinet (dvs. uten peptidsignalet). Det har blitt vist at de rekombinante sTNALP-ene som oppbevarer de opprinnelige aminosyrene 1 til 501 (18 til 501, ved utskillelse) (se Oda et al., J. Biochem 126: 694-699, 1999), aminosyrene 1 til 504 (18 til 504, ved utskillelse) (US-patent 6 905 689 til Bernd et al.) og

aminosyrene 1 til 505 (18-505, ved utskillelse) (US 2007/0081984 til Tomatsu et al.), er enzymatisk aktive. Eksempler som presenteres i dette dokumentet viser også at et rekombinant sTNALP som oppbevarer aminosyrene 1 til 502 (18 til 502, ved utskillelse) (figur 3) i det opprinnelige TNALP-et er enzymatisk aktivt. Dette indikerer at aminosyrerestene kan fjernes fra den C-terminale enden av det native proteinet uten å påvirke dens enzymaktivitet.

[0020] Tabell 1 nedenfor gir en oversikt over 194 mutasjoner kjent for å forårsake HPP. I spesifikke utførelsesformer av de beinsøkende polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse inkluderer ikke ALP-sekvensen noen av disse mutasjonene.

[0021] Derfor, i sALP-ene ifølge foreliggende oppfinnelse, ved anvendelse av nummereringen av en konsensussekvens avledet fra en samstilling av forskjellige TNALP-er og humane ALP-isozymer, er aminosyren i posisjon 22 ikke en fenylalaninrest; aminosyren i posisjon 33 (posisjon 11 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en cysteinrest; aminosyren i posisjon 38 (posisjon 16 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyren i posisjon 42 (posisjon 20 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en prolinrest; aminosyren i posisjon 45 (posisjon 23 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyreresten i posisjon 56 (posisjon 34 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serin- eller valinrest; aminosyreresten i posisjon 67 (posisjon 45 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucin-, isoleucin- eller valinrest; aminosyreresten i posisjon 68 (posisjon 46 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyreresten i posisjon 73 (posisjon 51 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en metioninrest; aminosyreresten i posisjon 76 (posisjon 54 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en cystein-, serin-, prolin- eller histidinrest; aminosyreresten i posisjon 77 (posisjon 55 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 80 (posisjon 58 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serinrest; aminosyreresten i posisjon 81 (posisjon 59 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en asparaginrest; aminosyreresten i posisjon 105 (posisjon 83 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en metioninrest; aminosyreresten i posisjon 113 (posisjon 89 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 116 (posisjon 94 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 117 (posisjon 95 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serinrest; aminosyreresten i posisjon 119 (posisjon 97 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en glycinrest; aminosyreresten i posisjon 121 (posisjon 99 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serin- eller treoninrest; aminosyreresten i posisjon 125 (posisjon 103 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en argininrest; aminosyreresten i posisjon 128 (posisjon 106 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en aspartatrest; aminosyreresten i posisjon 133 (posisjon 111 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en metioninrest; aminosyreresten i posisjon 134 (posisjon 112 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en argininrest; aminosyreresten i posisjon 137 (posisjon 115 i sekvensen uten signal-

peptid) er ikke en treonin- eller valinrest; aminosyreresten i posisjon 139 (posisjon 117 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en histidin- eller asparaginrest; aminosyreresten i posisjon 141 (posisjon 119 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en histidinrest; aminosyreresten i posisjon 153 (posisjon 131 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en alanin- eller isoleucinrest; aminosyreresten i posisjon 167 (posisjon 145 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serin- eller valinrest; aminosyreresten i posisjon 172 (posisjon 150 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en metioninrest; aminosyreresten i posisjon 175 (posisjon 153 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en aspartatrest; aminosyreresten i posisjon 176 (posisjon 154 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en tyrosin- eller argininrest; aminosyreresten i posisjon 181 (posisjon 159 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 182 (posisjon 160 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 184 (posisjon 162 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 186 (posisjon 164 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 189 (posisjon 167 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en tryptofanrest; aminosyreresten i posisjon 194 (posisjon 172 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en glutamatrest; aminosyreresten i posisjon 196 (posisjon 174 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en lysin- eller glycinrest; aminosyreresten i posisjon 197 (posisjon 175 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 198 (posisjon 176 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en alaninrest; aminosyreresten i posisjon 206 (posisjon 184 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en tyrosinrest; aminosyreresten i posisjon 208 (posisjon 186 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en glutamatrest; aminosyreresten i posisjon 207 (posisjon 190 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en prolinrest; aminosyreresten i posisjon 216 (posisjon 194 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en aspartatrest; aminosyreresten i posisjon 217 (posisjon 195 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en fenylalaninrest; aminosyreresten i posisjon 223 (posisjon 201 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 225 (posisjon 203 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valin- eller alaninrest; aminosyreresten i posisjon 226 (posisjon 204 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyreresten i posisjon 228 (posisjon 206 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en tryptofan- eller glutaminrest; aminosyreresten i posisjon 229 (posisjon 207 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en glutamatrest; aminosyreresten i posisjon 231 (posisjon 209 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 240 (posisjon 218 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en glycinrest; aminosyreresten i posisjon 251 (posisjon 229 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serinrest; aminosyreresten i posisjon 254 (posisjon 232 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyreresten i posisjon 269 (posisjon 247 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en argininrest; aminosyreresten i posisjon 277 (posisjon 255 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en

cystein-, leucin- eller histidinrest; aminosyreresten i posisjon 280 (posisjon 258 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en prolinrest; aminosyreresten i posisjon 295 (posisjon 273 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en fenylalaninrest; aminosyreresten i posisjon 297 (posisjon 275 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en lysinrest; aminosyreresten i posisjon 298 (posisjon 276 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 300 (posisjon 278 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en tyrosin- eller alaninrest; aminosyreresten i posisjon 301 (posisjon 279 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valin-, treonin- eller isoleucinrest; aminosyreresten i posisjon 303 (posisjon 281 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en aspiratrest; aminosyreresten i posisjon 304 (posisjon 282 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en lysinrest; aminosyreresten i posisjon 305 (posisjon 283 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en prolinrest; aminosyreresten i posisjon 312 (posisjon 290 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyreresten i posisjon 313 (posisjon 291 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serin- eller leucinrest; aminosyreresten i posisjon 317 (posisjon 295 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en lysinrest; aminosyreresten i posisjon 332 (posisjon 310 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en argininrest; aminosyreresten i posisjon 333 (posisjon 311 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en cystein-, glysin- eller leucinrest; aminosyreresten i posisjon 334 (posisjon 312 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 340 (posisjon 318 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en aspartatrest; aminosyreresten i posisjon 345 (posisjon 323 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en arginin- eller glutamatrest; aminosyreresten i posisjon 354 (posisjon 332 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 360 (posisjon 338 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en aspartatrest; aminosyreresten i posisjon 361 (posisjon 339 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treonin- eller isoleucinrest; aminosyreresten i posisjon 377 (posisjon 355 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 380 (posisjon 358 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en metioninrest; aminosyreresten i posisjon 383 (posisjon 361 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyreresten i posisjon 384 (posisjon 362 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyreresten i posisjon 387 (posisjon 365 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en argininrest; aminosyreresten i posisjon 388 (posisjon 366 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 395 (posisjon 373 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 397 (posisjon 375 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en cystein- eller histidinrest; aminosyreresten i posisjon 398 (posisjon 376 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en alaninrest; aminosyreresten i posisjon 401 (posisjon 379 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 405 (posisjon 383 i sekvensen uten signal-

peptid) er ikke en serin- eller valinrest; aminosyreresten i posisjon 406 (posisjon 384 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 412 (posisjon 390 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en glycinrest; aminosyreresten i posisjon 416 (posisjon 394 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest;

5 aminosyreresten i posisjon 417 (posisjon 395 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en alaninrest; aminosyreresten i posisjon 420 (posisjon 398 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en metioninrest; aminosyreresten i posisjon 423 (posisjon 401 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serinrest; aminosyreresten i posisjon 426 (posisjon 404 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serinrest; aminosyreresten i posisjon 429

10 (posisjon 407 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en alaninrest; aminosyreresten i posisjon 430 (posisjon 408 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en metioninrest; aminosyreresten i posisjon 432 (posisjon 410 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en cystein- eller aspartatrest; aminosyrerest i posisjon 434 (posisjon 412 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en prolinrest; aminosyrerest i posisjon 435 (posisjon 413 i

15 sekvensen uten signalpeptid) er ikke en lysinrest; aminosyrerest i posisjon 442 (posisjon 420 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en histidinrest; aminosyrerest i posisjon 451 (posisjon 429 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en prolinrest; aminosyrerest i posisjon 456 (posisjon 434 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en histidin- eller cysteinrest; aminosyrerest i posisjon 458 (posisjon 436 i sekvensen uten

20 signalpeptid) er ikke en lysinrest; aminosyrerest i posisjon 460 (posisjon 438 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en argininrest; aminosyrerest i posisjon 461 (posisjon 439 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serin- eller aspartatrest; aminosyrerest i posisjon 462 (posisjon 440 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en tryptofan- eller argininrest; aminosyrerest i posisjon 465 (posisjon 443 i sekvensen uten

25 signalpeptid) er ikke en metionin- eller leucinrest; aminosyrerest i posisjon 472 (posisjon 450 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyrerest i posisjon 473 (posisjon 451 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyrerest i posisjon 474 (posisjon 452 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyrerest i posisjon 479 (posisjon 457 i sekvensen uten signalpeptid)

30 er ikke en serinrest; aminosyrerest i posisjon 482 (posisjon 460 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en lysin- eller glycinrest; aminosyrerest i posisjon 484 (posisjon 462 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyrerest i posisjon 495 (posisjon 473 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serinrest; aminosyrerest i posisjon 496 (posisjon 474 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en fenylalaninrest; og

35 aminosyrerest i posisjon 497 (posisjon 475 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en argininrest.

[0022] Når et sTNALP anvendes i de beinsøkende sALP-ene ifølge den foreliggende oppfinnelsen, ved hjelp av nummereringen av den humane TNALP-sekvensen, er aminosyren i posisjon 17 også nærmere bestemt ikke en fenylalanin-

rest; aminosyren i posisjon 28 (posisjon 11 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en cysteinrest; aminosyren i posisjon 33 (posisjon 16 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyren i posisjon 37 (posisjon 20 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en prolinrest; aminosyren i posisjon 40 (posisjon 23 i sekvensen uten signal-

5 peptid) er ikke en valinrest; aminosyreresten i posisjon 51 (posisjon 34 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serin- eller valinrest; aminosyreresten i posisjon 62 (posisjon 45 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucin-, isoleucin- eller valinrest; aminosyreresten i posisjon 63 (posisjon 46 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyreresten i posisjon 68 (posisjon 51 i sekvensen uten

10 signalpeptid) er ikke en metioninrest; aminosyreresten i posisjon 71 (posisjon 54 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en cystein-, serin-, prolin- eller histidinrest; aminosyreresten i posisjon 72 (posisjon 55 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 75 (posisjon 58 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serinrest; aminosyreresten i posisjon 76 (posisjon 59 i sekvensen uten

15 signalpeptid) er ikke en asparaginrest; aminosyreresten i posisjon 100 (posisjon 83 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en metioninrest; aminosyreresten i posisjon 108 (posisjon 89 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 111 (posisjon 94 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 112 (posisjon 95 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en

20 serinrest; aminosyreresten i posisjon 114 (posisjon 97 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en glycinrest; aminosyreresten i posisjon 116 (posisjon 99 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serin- eller treoninrest; aminosyreresten i posisjon 120 (posisjon 103 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en argininrest; aminosyreresten i posisjon 123 (posisjon 106 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en aspartatrest;

25 aminosyreresten i posisjon 128 (posisjon 111 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en metioninrest; aminosyreresten i posisjon 129 (posisjon 112 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en argininrest; aminosyreresten i posisjon 132 (posisjon 115 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treonin- eller valinrest; aminosyreresten i posisjon 134 (posisjon 117 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en histidin- eller asparaginrest;

30 aminosyreresten i posisjon 136 (posisjon 119 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en histidinrest; aminosyreresten i posisjon 148 (posisjon 131 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en alanin- eller isoleucinrest; aminosyreresten i posisjon 162 (posisjon 145 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serin- eller valinrest; aminosyreresten i posisjon 167 (posisjon 150 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en metioninrest;

35 aminosyreresten i posisjon 170 (posisjon 153 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en aspartatrest; aminosyreresten i posisjon 171 (posisjon 154 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en tyrosin- eller argininrest; aminosyreresten i posisjon 176 (posisjon 159 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 177 (posisjon 160 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyre-

resten i posisjon 179 (posisjon 162 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 181 (posisjon 164 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 184 (posisjon 167 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en tryptofanrest; aminosyreresten i posisjon 189 (posisjon 172 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en glutamatrest; aminosyreresten i posisjon 191 (posisjon 174 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en lysin- eller glycinrest; aminosyreresten i posisjon 192 (posisjon 175 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 193 (posisjon 176 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en alaninrest; aminosyreresten i posisjon 201 (posisjon 184 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en tyrosinrest; aminosyreresten i posisjon 203 (posisjon 186 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en glutamatrest; aminosyreresten i posisjon 207 (posisjon 190 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en prolinrest; aminosyreresten i posisjon 211 (posisjon 194 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en aspartatrest; aminosyreresten i posisjon 212 (posisjon 195 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en fenylalaninrest; aminosyreresten i posisjon 218 (posisjon 201 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 220 (posisjon 203 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valin- eller alaninrest; aminosyreresten i posisjon 221 (posisjon 204 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyreresten i posisjon 223 (posisjon 206 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en tryptofan- eller glutaminrest; aminosyreresten i posisjon 224 (posisjon 207 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en glutamatrest; aminosyreresten i posisjon 226 (posisjon 209 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 235 (posisjon 218 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en glycinrest; aminosyreresten i posisjon 246 (posisjon 229 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serinrest; aminosyreresten i posisjon 249 (posisjon 232 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyreresten i posisjon 264 (posisjon 247 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en argininrest; aminosyreresten i posisjon 272 (posisjon 255 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en cystein-, leucin- eller histidinrest; aminosyreresten i posisjon 275 (posisjon 258 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en prolinrest; aminosyreresten i posisjon 289 (posisjon 272 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en fenylalaninrest; aminosyreresten i posisjon 291 (posisjon 274 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en lysinrest; aminosyreresten i posisjon 292 (posisjon 275 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 294 (posisjon 277 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en tyrosin- eller alaninrest; aminosyreresten i posisjon 295 (posisjon 278 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valin-, treonin- eller isoleucinrest; aminosyreresten i posisjon 297 (posisjon 280 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en aspiratrest; aminosyreresten i posisjon 298 (posisjon 281 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en lysinrest; aminosyreresten i posisjon 299 (posisjon 282 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en prolinrest; aminosyreresten i

posisjon 306 (posisjon 289 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyreresten i posisjon 307 (posisjon 290 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serin- eller leucinrest; aminosyreresten i posisjon 311 (posisjon 294 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en lysinrest; aminosyreresten i posisjon 326 (posisjon 309 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en argininrest; aminosyreresten i posisjon 327 (posisjon 310 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en cystein-, glysin- eller leucinrest; aminosyreresten i posisjon 328 (posisjon 311 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 334 (posisjon 317 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en aspartatrest; aminosyreresten i posisjon 339 (posisjon 322 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en arginin- eller glutamatrest; aminosyreresten i posisjon 348 (posisjon 331 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 354 (posisjon 337 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en aspartatrest; aminosyreresten i posisjon 355 (posisjon 338 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treonin- eller isoleucinrest; aminosyreresten i posisjon 371 (posisjon 354 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 374 (posisjon 357 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en metioninrest; aminosyreresten i posisjon 377 (posisjon 360 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyreresten i posisjon 378 (posisjon 361 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en valinrest; aminosyreresten i posisjon 381 (posisjon 364 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en argininrest; aminosyreresten i posisjon 382 (posisjon 365 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 389 (posisjon 372 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 391 (posisjon 374 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en cystein- eller histidinrest; aminosyreresten i posisjon 392 (posisjon 375 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en alaninrest; aminosyreresten i posisjon 395 (posisjon 378 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyreresten i posisjon 399 (posisjon 382 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serin- eller valinrest; aminosyreresten i posisjon 400 (posisjon 383 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 406 (posisjon 389 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en glycinrest; aminosyreresten i posisjon 410 (posisjon 393 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyreresten i posisjon 411 (posisjon 394 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en alaninrest; aminosyreresten i posisjon 414 (posisjon 397 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en metioninrest; aminosyreresten i posisjon 417 (posisjon 400 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serinrest; aminosyreresten i posisjon 420 (posisjon 403 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serinrest; aminosyreresten i posisjon 423 (posisjon 406 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en alaninrest; aminosyreresten i posisjon 424 (posisjon 407 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en metioninrest; aminosyreresten i posisjon 426 (posisjon 409 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en cystein- eller aspartatrest; aminosyrerest i posisjon 428 (posisjon 411 i sekvensen uten

signalpeptid) er ikke en prolinrest; aminosyrerest i posisjon 429 (posisjon 412 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en lysinrest; aminosyrerest i posisjon 436 (posisjon 419 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en histidinrest; aminosyrerest i posisjon 445 (posisjon 428 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en prolinrest; aminosyrerest i posisjon 450 (posisjon 433 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en histidin- eller cysteinrest; aminosyrerest i posisjon 452 (posisjon 435 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en lysinrest; aminosyrerest i posisjon 454 (posisjon 437 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en argininrest; aminosyrerest i posisjon 455 (posisjon 438 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serin- eller aspartatrest; aminosyrerest i posisjon 456 (posisjon 439 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en tryptofan- eller argininrest; aminosyrerest i posisjon 459 (posisjon 442 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en metionin- eller leucinrest; aminosyrerest i posisjon 466 (posisjon 449 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyrerest i posisjon 467 (posisjon 450 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyrerest i posisjon 468 (posisjon 451 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en treoninrest; aminosyrerest i posisjon 473 (posisjon 456 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serinrest; aminosyrerest i posisjon 476 (posisjon 459 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en lysin- eller glycinrest; aminosyrerest i posisjon 478 (posisjon 461 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en leucinrest; aminosyrerest i posisjon 489 (posisjon 472 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en serinrest; aminosyrerest i posisjon 490 (posisjon 473 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en fenylalaninrest; og aminosyrerest i posisjon 491 (posisjon 474 i sekvensen uten signalpeptid) er ikke en argininrest. I andre spesifikke utførelsesformer er én eller flere av X-ene definert som å være en hvilken som helst av aminosyrene funnet i den posisjonen i sekvensene til samstillingene eller en rest som utgjør en konservertert eller delvis konservertert substitusjon av en hvilken som helst av disse aminosyrene. I andre spesifikke utførelsesformer er X-ene definert som å være en hvilken som helst av aminosyrene funnet i den posisjonen i sekvensene av samstillingen. F.eks. er aminosyreresten i posisjon 51 (posisjon 34 i sekvensen uten signalpeptid) en alanin- eller valinrest; aminosyreresten i posisjon 177 (posisjon 160 i sekvensen uten signalpeptid) er en alanin- eller serinrest; aminosyreresten i posisjon 212 (posisjon 195 i sekvensen uten signalpeptid) er en isoleucin- eller valinrest; aminosyreresten i posisjon 291 (posisjon 274 i sekvensen uten signalpeptid) er en glutaminsyre- eller en asparaginsyrerest; og aminosyreresten i posisjon 374 (posisjon 357 i sekvensen uten signalpeptid) er en valin- eller isoleucinrest.

[0023] I spesifikke utførelsesformer består sALP-fragmentet i det beinsøkende fusjonsproteinet i foreliggende oppfinnelse av et hvilket som helst av fragmentene av en konsensussekvens avledet fra en samstilling av humane ALP-isozymer og TNALP-er fra forskjellige pattedyrarter som tilsvarer aminosyrerestene 18-498, 18-499, 18-500, 18-501, 18-502, 18-503, 18-504, eller 18 til 505 av human TNALP. Disse konsensus-

fragmentene er aminosyrerestene 23 til 508, 23 til 509, 23 til 510, 23 til 511, 23 til 512, 23 til 513, 23 til 514 og 23 til 515 i SEQ ID NO: 15 respektive. I disse konsensusfragmentene er X en hvilken som helst aminosyre bortsett fra en aminosyre som tilsvarer en patologisk mutasjon i den posisjonen til humant TNALP som rapportert i tabell 1. I andre spesifikke utførelsesformer er disse konsensusfragmentene aminosyrerestene henholdsvis 23 til 508, 23 til 509, 23 til 510, 23 til 511, 23 til 512, 23 til 513, 23 til 514 og 23 til 515 i SEQ ID NO: 18. I disse konsensusfragmentene er X en hvilken som helst aminosyre funnet i denne posisjonen i ALP-en av enten én av artene og humane ALP-isozymer av samstillingen som konsensusen avledes fra, men er ikke en aminosyre som tilsvarer en patologisk mutasjon ved den posisjonen for human TNALP som rapportert i tabell 1 (se figur 30).

[0024] I andre spesifikke utførelsesformer består sALP-fragmentet i det beinsøkende fusjonsproteinet ifølge foreliggende oppfinnelse av en hvilken som helst av fragmentene av en konsensussekvens avledet fra en samstilling av TNALP-er fra forskjellige pattedyrarter som tilsvarer aminosyrerestene 18-498, 18-499, 18-500, 18-501, 18-502, 18-503, 18-504, og 18 til 505 av human TNALP. Disse konsensusfragmentene er aminosyrerestene 18-498, 18-499, 18-500, 18-501, 18-502, 18-503, 18-504, og 18 til 505 i SEQ ID NO: 16. I disse konsensusfragmentene er X en hvilken som helst aminosyre som tilsvarer en patologisk mutasjon i den posisjonen av human TNALP som rapportert i tabell 1. I andre spesifikke utførelsesformer er disse konsensusfragmentene aminosyrerestene 18-498, 18-499, 18-500, 18-501, 18-502, 18-503, 18-504, og 18 til 505 i SEQ ID NO: 19. I disse konsensusfragmentene er X en hvilken som helst aminosyre funnet i den posisjonen i TNALP av enten én av artene av samstillingen konsensusen er avledet fra, men er ikke en aminosyre som tilsvarer en patologisk mutasjon ved den posisjonen for human TNALP som rapportert i tabell 1 (se figur 31).

[0025]

Tabell 1: Patologiske mutasjoner i human TNALP

Totalt antall mutasjoner 188										
Ekson	Base-endering	Aminosyre-endering		Referanse	Pasientens kliniske tilstand	Pasientens genotype	VE-KT-%	ref.	E.col i	
		Ikke-standardisert nomenklatur	Standardisert nomenklatur							
1	C.-195C>T			Taillandier et al. 2000	perinatal	c.-195C>T/C184Y			na	Påvirker transkripsjonsstart-setet
2	c.17T>A	IL-12X	p.L6X	Taillandier et al. 2000	barn-dommen	L-12X/?			na	Non-sense-mutasjon
2	c.50C>T	S-1F	p.S17F	Mornet et al. 1998	infantil	S-1F/G58S	19,0	<u>1</u>	na	
3	c.83A>G	Y11C	p.Y28C	Taillandier et al. 2001	infantil	Y11C/R119H	7,2	<u>2</u>	-	
3	c.98C>T	A16V	p.A33V	Henthorn et al. 1992	barn-dommen	A16V/Y419H			-	
3	c.110T>C	L20P	p.L37P	Versailles lab oct. 2003	perinatal	L20/P1L20P			+	
3	c.119C>T	A23V	p.A40V	Mornet et al. 1998	perinatal	A23V/G456S	2,3	<u>1</u>	+	
3	c.132C>T	Q27X	p.Q44X	Momet E, upublisert	perinatal	Q27X/c.662in sG			na	Non-sense-mutasjon
3	c.151G>T	A34S	p.A51S	Mumm et al. 2002	infantil	A34S/T117H			+	
3	c.152G>T	A34V	p.A51V	Taillandier et al. 2001	infantil	A34V/V442M			+	
4	c.184A>T	M45L	p.M62L	Taillandier et al. 1999	infantil	M45L/c.1172delC	27,4	<u>1</u>	+	
4	c.184A>G	M45V	p.M62V	Spentchian et al. 2003	infantil	M45V/M45V				
4	c.186G>C	M45I	p.M62I	Taillandier et al. 2005	barn-dommen	M45I/E174K	0	<u>16</u>	+	
4	c.167G>C	G46R	p.G63R	Spentchian et al. 2003	infantil	G46R/G46R			+	

Totalt antall mutasjoner 188										
Ekson	Base-ending	Aminosyre-ending		Referanse	Pasientens kliniske tilstand	Pasientens genotype	VE-KT-%	ref.	E.col i	
		Ikke-standardisert nomenklatur	Standardisert nomenklatur							
4	c.188G>T	G46V	p.G63V	Lia-Baldini et al. 2001	infantil	G46V/N	0,8	<u>3</u>	+	
4	c.203C>T	T51M	p.T68M	Orimo et al. 2002	barn-dommen	T51M/A160T	5,2	<u>4</u>	+	
4	c.211C>T	R54C	p.R71C	Henthorn et al. 1992	infantil	R54C/D277A	0	<u>17</u>	+	
4	c.211C>A	R54S	p.R71S	Orimo et al. 2002	barn-dommen	R54S/?	2,9	<u>4</u>	+	
4	c.212G>C	R54P	p.R71P	Henthorn et al. 1999	perinatal	R54P/Q190P			+	
4	c.212G>A	R54H	p.R71H	Taillandier et al. 2001	perinatal	A23V/R54H			+	
4	c.219T>C	I55T	p.I72T	Versailles lab oct. 2004	odonto	I55T/N			-	
4	c.223G>A	G58S	p.G75S	Mornet et al. 1998	infantil	S-1F/G58S	3,5	<u>1</u>	+	
4	c.227A>G	Q59R	p.Q76R	Mornet et al. 2001	infantil	Q59R/T117N			-	
IVS4	c.298-2A>G			Taillandier et al. 2000	perinatal	c.298-2A>G/c.997+3 A>C			na	Denne mutasjonen påvirker spleisingen og ikke kodingen
5	c.299C>T	T83M	p.T100M	Mornet et al. 2001	infantil	T83M/E174K			+	
5	c.303_311del	N85_N87del	p.N102_N104del	Versailles lab Jul 2007	perinatal	c.303_311del/G474R			na	Sletting
5	c.323C>T	P91L	p.P108L	Herasse et al. 2003	odonto	P91L/N	0,4	u-pub.	-	
5	c.331G>A	A94T	p.A111T	Goseki-Sone et al. 1998	odonto	A94T/?			+	
5	c.334G>A	G95S	p.G112S	Witters et al. 2004	infantil	G95S/R374C			-	
5	c.340G>A	A97T	p.A114T	Mumm et al. 2001	infantil	A97T/D277A			+	
5	c.341C>G	A97G	p.A114G	Draguet et al. 2004	perinatal	A97G+c.348_349insACCGT			+	

Totalt antall mutasjoner 188										
Ekson	Base-ending	Aminosyre-ending		Referanse	Pasientens kliniske tilstand	Pasientens genotype	VE-KT-%	ref.	E.coli	
		Ikke-standardisert nomenklatur	Standardisert nomenklatur							
						C /G309R				
5	c.348_349ins A CCGTC			<u>Draguet et al. 2004</u>	perinatal	A97G+c.348_349insACCGT C /G309R			na	To missense-mutasjoner og Innføring
5	c.346G>T	A99S	p.A116S	Versailles lab Jul 2007	voksen	A99S/N400S			+	
5	c.346G>A	A99T	p.A116T	<u>Hu et al. 2000</u>	voksen	A99T/N	0,8	<u>3</u>	+	
5	c.358G>A	G103R	p.G120R	<u>Mornet et al. 1998</u>	perinatal	G103R/648+1 G>A			+	
5	c.368C>A	A106D	p.A123D	<u>Spentchian et al. 2006</u>	perinatal	A106D/S249_H250del			-	
5	c.382G>A	V111M	p.V128M	<u>Mumm et al. 2002</u>	perinatal	V111M/R206 W			-	
5	c.385G>A	G112R	p.G129R	<u>Momet et al. 1998</u>	perinatal	G112R/G474 R			+	
5	c.388_391del G TAA			<u>Spentchian et al. 2003</u>	perinatal	E294K/388_391delGTAA			na	Leseramme-mutasjon
5	c.389delT			<u>Spentchian et al. 2003</u>	perinatal	c.369delT/c.389delT			na	Leseramme-mutasjon
5	c.392delG			<u>Mumm et al. 2002</u>	perinat/sped-barn	c.392delG/A331T			na	Leseramme-mutasjon
5	c.394G>A	A115T	p.A132T	Versailles lab Jul 2006	voksen	A115T/E174K				
5	c.395C>T	A115V	p.A132V	<u>Watanabe et al. 2001</u>	voksen	A115V/?	16,9	<u>14</u>	-	
5	c.400_401AC>CA	T117H	p.T134H	<u>Mumm et al. 2002</u>	perinatal	T117H/F310del			-	
5	c.401C>A	T117N	p.T134N	<u>Taillandier et al. 2000</u>	perinatal	T117N/T117N	20,5	<u>5</u>	-	

Totalt antall mutasjoner 188										
Ekson	Base-ending	Aminosyre-ending		Referanse	Pasientens kliniske tilstand	Pasientens genotype	VE-KT-%	ref.	E.coli	
		Ikke-standardisert nomenklatur	Standardisert nomenklatur							
5	c.408C>T	R119C	p.R136C	Versailles lab oct. 2003	odonto	R119C/R119 H			-	
5	c.407G>A	R119H	p.R136H	Taillandier et al. 1999	infantil	R119H/G145V	33,4	1	-	
5	c.442A>G	T131A	p.T148A	Michigami et al. 2005	perinatal	T131A/?			-	
5	c.443C>T	T131I	p.T148I	Spentchian et al. 2003	infantil	T131I/G145S			-	
6	c.480delT			Versailles lab. Jan. 2008	perinatal	c.480delT/R206W			na	sletting
6	c.484G>A	G145S	p.G162S	Spentchian et al. 2003	infantil	T131I/G145S			+	
6	c.485G>T	G145V	p.G162V	Taillandier et al. 1999	infantil	R119H/G145 V	1,3	<u>1</u>	+	
6	c.500C>T	T150M	p.T167M	Versailles lab oct. 2003	infantil	T150M/E174K	0		+	
6	c.508A>G	N153D	p.N170D	Momet et al. 1998	perinatal	N153D/N153 D	0	<u>13</u>		
6	c.511C>T	H154Y	p.H171Y	Taillandier et al. 1999	infantil	H154Y/E174K	2,1	<u>1</u>	-	
6	c.512A>G	H154R	p.H171R	Mornet E, upublisert	voksen	H154R/E174K			-	
6	c.526G>A	A159T	p.A176T	Taillandier et al. 2000	barndommen	A159T/R229S	45,4	<u>5</u>	+	
6	c.529G>A	A160T	p.A177T	Goseki-Sone et al. 1998	voksen	A160T/F310L	83,8	<u>4</u>	-	
6	c.535G>A	A162T	p.A179T	Weiss et al. 1988	perinatal	A162T/A162T	18	<u>6</u>	+	
6	c.542C>T	S164L	p.S181 L	Lia-Baldini et al. 2001	infantil	S164L/del(ex12)	1,3	<u>3</u>	-	
6	c.544delG			Taillandier et al. 1999	perinatal	G232V/544delG			na	Leseramme-mutasjon
6	c.550C>T	R167W	p.R184W	Mornet et al. 1998	perinatal	R167W/W253X	0,6	<u>3</u>	+	
<u>6</u>	c.567C>A	D172E	p.D189E	Spentchian et al. 2003	perinatal	D172E/D172E			-	
6	c.568_570del	N173del	p.N190del	Michigami et al. 2005	perinatal	c.1559delT/N			-	Sletting av 1

Totalt antall mutasjoner 188										
Ekson	Base-ending	Aminosyre-ending		Referanse	Pasientens kliniske tilstand	Pasientens genotype	VE-KT-%	ref.	E.coli	
		Ikke-standardisert nomenklatur	Standardisert nomenklatur							
	A AC					173del				a.a.
6	c.571G>A	E174K	p.E191K	<u>Henthom et al. 1992</u>	infantil	E174K/D361V	88,0	<u>1</u>	-	
6	c.572A>G	E174G	p.E191G	<u>Goseki-Sone et al. 1998</u>	odonto	174G/c.1559 delT			-	
6	c.575T>C	M175T	p.M192T	Versailles lab Jul 2007	infantil	M175T/E294K			-	
6	c.577C>G	IP176A	p.P193A	<u>Mumm et al. 2002</u>	voksen	A97T/P176A			+	
6	c.602G>A	C184Y	p.C201Y	<u>Taillandier et al. 1999</u>	perinatal	c.-195C>T/C184 Y			-	
6	c.609C>G	D186E	p.D203E	Versailles lab oct. 2004	perinatal	D186E/D186E			-	
6	c.620A>C	Q190P	p.Q207P	<u>Henthorn et al. 1992</u>	perinatal	R54/Q190P			+	
6	c.631A>G	N194D	p.N211D	<u>Taillandier et al. 2001</u>	infantil	A99T/N194D			+	
6	c.634A>T	I195F	p.I212F	<u>Souka et al. 2002</u>	perinatal	I195F/E337D			-	
IVS6	c.848+1G>T			<u>Brun-Heath et al.2005</u>	perinatal	c.648+1G>T/D277A				Påvirker spleisingen
IVS6	c.648+1G>A			<u>Mornet et al. 1998</u>	perinatal	G103R/c.648+1G>A			na	Påvirker spleisingen
IVS6	c.649-1_3delinsAA			Versailles lab Jul 2006	perinatal	c.649-1_3delinsAA/c.649-1_3delinsAA				Leseramme-mutasjon
7	c.653T>C	I201T	p.1218T	Utsch et al., 2005. <u>contact?</u>	perinatal	I201T/R374C	3,7	upub.	-	
7	859G>T	G203V	p.G220V	<u>Taillandier et al. 2001</u>	odonto	E174K/G203V			+	

Totalt antall mutasjoner 188										
Ekson	Base-ending	Aminosyre-ending		Referanse	Pasientens kliniske tilstand	Pasientens genotype	VE-KT-%	ref.	E.coli	
		Ikke-standardisert nomenklatur	Standardisert nomenklatur							
7	659G>C	G203A	p.G220A	Spentchian et al. 2003	perinatal	G203A/G203 A			+	
7	662insG			Mornet E, upublisert	perinatal	Q27X/662ins G			na	Leseramme-mutasjon
7	c.662delG			Spentchian et al. 2003	perinatal	R255L/c.662del G			na	Leseramme-mutasjon
7	C.662G>T	G204V	p.G221V	Versadies lab oct. 2004	perinatal	G204V/M338 T			+	
7	c.667C>T	R206W	p.R223W	Momet et al. 1998	perinatal	R206W/?	2,8	<u>3</u>	-	
7	c.668G>A	R206Q	p.R223Q	Mumm et al. 2002	perinatal	R206Q/sletting			-	
7	c.670A>G	K207E	p.K224E	Mochizuki et al. 2000	infantil	K207E/G409C	43	<u>15</u>	+	
7	c.677T>C	M209T	p.M226T	Baumgartner-Sigl et al. 2007	infantil	M209T/T354I			-	
7	c.704A>G	E218G	p.E235G	Taillandier et al. 2001	voksen	E218G/A382S	3,6	<u>7</u>	+	
7	c.738G>T	R229S	p.R246S	Taillandier et al. 2000	barn-dommen	A159T/R229S	4,4	<u>5</u>	-	
7	c.746G>T	G232V	p.G249V	Fedde et al. 1996	perinatal	G232V/N	34,5	<u>3</u>	+	
7	c.971A>G	K247R	p.K264R	Versailles lab Jan.2007	perinatal	K247R/D361V				
8	c.797_802del del	S249_H250del	p.S266_H267del	Spentchian et al. 2006	perinatal	A106D/S249_H250del				Sletting av 2 a.a.
8	c.809G>A	W253X	p.W270X	Mornet et al. 1998	perinatal	R167W/W253 X			na	Non-sense-mutasjon
8	c.814C>T	R255C	p.R272C	Spentchian et al. 2006	perinatal	R255C/T117H			-	
8	c.815G>T	R255L	p.R272L	Spentchian et al. 2003	perinatal	R255L/c.662delG				
8	c.815G>A	R255H	p.R272H	Brun-Heath et al. 2005	infantil	R255H/R255 H	6,8	<u>16</u>		

Totalt antall mutasjoner 188										
Ekson	Base-ending	Aminosyre-ending		Referanse	Pasientens kliniske tilstand	Pasientens genotype	VE-KT-%	ref.	E.coli	
		Ikke-standardisert nomenklatur	Standardisert nomenklatur							
8	c.824T>C	L258P	p.L275P	Orimo et al. 2002	barn-dommen	L258P/A160T	3,3	<u>4</u>	-	
8	c.853_854ins G ATC	Y268X	p.Y285X	Michigami et al. 2005	perinatal	c1559delT/Y268X			na	Non-sense-mutasjon
IVS8	c.862+5G>A			Taillandier et al. 1999	infantil	c.862+5G>A/c.862+5G>A			na	Påvirker spleisingen
9	c.885C>T	L272F	p.L289F	Sugimoto et al. 1998	infantil	L272F/?	50	<u>8</u>	-	
9	c.871G>A	E274K	p.E291K	Mornet et al. 1998	infantil	E174K/E274K	8,3	<u>1</u>	-	
9	c.871G>T	E274X	p.E291X	Taillandier et al. 2000	perinatal	A94T/E274X			-	Non-sense-mutasjon
9	c.874C>A	P275T	p.P292T	Brun-Heath et al.	infantil	P275T/A16V	4,0	<u>16</u>	+	
9	c.876_881del A GGGA	G276_D277del		Spentchian et al. 2003	perinatal	G276_D277d	el/c.962 delG		na	
9	c.880G>T	D277Y	p.D294Y	Taillandier et al. 2001	infantil	A159T/D277Y			-	
9	c.881A>C	D277A	p.D294A	Henthorn et al. 1992	infantil	R54C/D277A	0	<u>17</u>	-	
9	c.883A>G	M278V	p.M295V	Mornet et al. 2001	barn-dommen	E174K/M278V			-	
9	c.884T>C	M278T	p.M295T	Brun-Heath et al. 2005	perinatal	M278T/R206W	8,5	<u>16</u>	-	
9	c.885G>A	M278I	p.M295I	Michigami et al. 2005	perinatal	M278I/c.1559 delT			-	
9	c.889T>G	Y280D	p.Y297D	Brun-Heath et al. 2005	barn-dommen	R119H/Y280D	1,3	<u>16</u>	-	
9	c.892G>A	E281K	p.E298K	Orimo et al. 1994	infantil	E281K/1559 delT			-	
9	c.896T>C	L282P	p.L299P	Versailles lab oct. 2003	infantil	L282P/L282P	9,7	<u>15</u>	-	
9	c.917A>T	D289V	p.D306V	Taillandier et al. 1999	infantil	D289V/D289V	0	<u>12</u>	-	

Totalt antall mutasjoner 188										
Ekson	Base-ending	Aminosyre-ending		Referanse	Pasientens kliniske tilstand	Pasientens genotype	VE-KT-%	ref.	E.coli	
		Ikke-standardisert nomenklatur	Standardisert nomenklatur							
9	c.919C>T	P290S	p.P307S	Versailles lab oct. 2004	infantil	P290S/M450T			+	
9	c.920C>T	P290L	p.P307L	Versailles lab Jul. 2006	barndommen	P290L/S164L				
9	c.928_929del T C			<u>Brun-Heath et al. 2005</u>	perinatal	T394A/c.928_929delITC				Leseramme-mutasjon
9	c.931G>A	E294K	p.E311K	<u>Spentchian et al. 2003</u>	perinatal	E294K/c.388_391delGTAA			-	
9	c.962delG			<u>Spentchian et al. 2003</u>	perinatal	G276_D277del/c.962delG			na	Leseramme-mutasjon
9	c.976G>C	G309R	p.G326R	<u>Litmanovitz et al. 2002</u>	perinatal	G309R/E274K			+	
9	c.981_983del C TT	F310delI	p.F327del	<u>Orimo et al. 1997</u>	infantil	F310del/c.1559delIT	-10	<u>15</u>	+	Aminosyre-sletting
9	c.979T>G	F310C	p.F327C	<u>Mornet et al. 2001</u>	perinatal	T117N/F310C			+	
9	c.979_980TT > GG	F310G	p.F327G	<u>Taillandier et al. 2001</u>	voksen	E174K/F310G			+	
9	c.979T>C	F310L	p.F327L	<u>Ozono et al. 1996</u>	infantil	F310L/G439R	72	<u>9</u>	+	
9	c.982T>A	F311L	p.F328L	<u>Michigami et al. 2005</u>	perinatal ikke-letal	F311L/T83M	-10	<u>15</u>	+	
IVS9	c.997+2T>A			<u>Taillandier et al. 2000</u>	perinatal	c.997+2T>A/C472S			na	Påvirker spleisingen
IVS9	c.997+2T>G			<u>Brun-Heath et al. 2005</u>	perinatal	c.997+2T>G/c.997+2T>G				Påvirker spleisingen
IVS9	c.997+3A>C			<u>Mornet et al. 1998</u>	perinatal	c.997+3A>C/c.997+3A>C			na	Påvirker spleisingen
IVS9	c.998-1G>T			<u>Taillandier et al. 2001</u>	perinatal	E174K/c.998-1G>T			na	Påvirker spleisingen

Totalt antall mutasjoner 188										
Ekson	Base-ending	Aminosyre-ending		Referanse	Pasientens kliniske tilstand	Pasientens genotype	VE-KT-%	ref.	E.coli	
		Ikke-standardisert nomenklatur	Standardisert nomenklatur							
10	c.1001G>A	G317D	p.G334D	Greenberg et al. 1993	perinatal	G317D/G317D	0	<u>10</u>		
10	c.1015G>A	G322R	p.G339R	Mumm et al. 2002	perinatal	G322R/A159T			-	
10	c.1016G>A	G322E	p.G339E	Versailles lab oct. 2004	infantil	G322E/V111 M			-	
10	c.10d2G>A	A331T	p.A348T	Taillandier et al. 2000	infantil	E174K/A331T	33,2	5	-	
10	c.1044_1055de l	L332_A335del	p.L349_A352del	Spentchian et al. 2006	perinatal	L332_A335del/G474R				Sletting av 4 a.a.
10	c.1062G>C	E337D	p.E354D	Souka et al. 2002	perinatal	I195F/E337D			+	
10	c.1064A>C	M338T	p.M355T	Versailles lab oct. 2004	perinatal	G204V/M338 T			-	
10	c.1065G>A	M338I	p.M355I	Versailles lab. Jan. 2008	infantil	M338I/R374C			-	
10	c.1101_1103de lCTC	S351del	p.S368del	Versailles lab oct. 2004	perinatal	c.1101_1103de lCTC/T372I				Sletting av 1 a.a.
10	c.1112C>T	T354I	p.T371I	Baumgartner-Sigl et al 2007	infantil	M209T/T354I			-	
10	c.1120G>A	V357M	p.V374M	Versailles lab oct. 2004	voksen	V357M/E281K			+	
10	c.1130C>T	A360V	p.A377V	Mornet et al. 2001	perinatal	A360V/A360V			+	
10	c.1133A>T	D361V	p.D378V	Henthom et al. 1992	infantil	E174K/D361V	1,2	<u>3</u>	+	
10	c.1142A>G	H364R	p.H381R	Taillandier et al. 2000	infantil	A23V/H364R			+	
10	c.1144G>A	V365I	p.V382I	Goseki-Sone et al. 1998	barn-dommen	F310L/V365I	0	<u>11</u>	+	
10	c.1166C>T	T372I	p.T389I	Versailles lab oct 2004	perinatal	T372I/S351de I				
10	c.1171C>T	R374C	p.R391C	Zurutuza et al.1999	barn-dommen	E174K/R374C	10,3	<u>1</u>		
10	c.1172G>A	R374H	p.R391H	Orimo et al. 2002	barn-dommen	R374H/?	3,7	<u>4</u>	-	
10	c.1172delC			Taillandier et al. 1999	infantil	JM45L/c.1172delC			na	Leseramme-mutasjon

Totalt antall mutasjoner 188										
Ekson	Base-ending	Aminosyre-ending		Referanse	Pasientens kliniske tilstand	Pasientens genotype	VE-KT-%	ref.	E.coli	
		Ikke-standardisert nomenklatur	Standardisert nomenklatur							
10	c.1175G>C	G375A	p.G392A	Versailles lab. Jan. 2008	perinatal	G375A/R119 C			-	
10	c.1182T>C	I378T	p.1395T	Versailles lab Jul.	perinatal	I378T/E174K				
11	c.1195G>T	A382S	p.A399S	<u>Taillandier et al. 2001</u>	voksen	E218G/A382S			-	
11	c.1196C>T	A382V	p.A399V	<u>Spentchian et al. 2006</u>	voksen	A382V/A16V			-	
11	c.1199C>T	P383L	p.P400L	<u>Spentchian et al. 2006</u>	infantil	P383L/P383L			+	
11	c.1214_1215del CA			Versailles lab Jul. 2006	voksen	c.1214_1215delCA/E174K				Leseramme-mutasjon
11	c.1216 1219del IGACA			<u>Brun-Heath et al. 2005</u>	perinatal	c.1216 1219delIGACA/?				
11	c.1217A>G	D389G	p.D406G	<u>Taillandier et al. 2000</u>	odonto.	D389G/R433 H	14,9	<u>5</u>	+	
11	c.1228T>C	F393L	p.F410L	<u>Versailles lab oct. 2004</u>	infantil	F393L/E174K			-	
11	c.1231A>G	T394A	p.T411A	<u>Brun-Heath et al. 2005</u>	perinatal	T394A/c.926_927delTC	0,3	<u>16</u>	-	
11	c.1240C>A	L397M	p.L414M	<u>Mumm et al. 2002</u>	perinatal	L397M/D277A			-	
11	c.1250A>G	N400S	p.N417S	<u>Sergl et al. 2001</u>	perinatal	N400S/c.648+1G>A	3	upub .	+	
11	c.1256delC			<u>Taillandier et al. 2000</u>	perinatal	c.1256delC/?		na		Leseramme-mutasjon
11	c.1258G>A	G403S	p.G420S	<u>Glaser et al. 2004</u>	perinatal	G403S/G403 S	0,4	upub .	-	
11	c.1268T>C	V406A	p.V423A	<u>Taillandier et al. 2001</u>	perinatal	A99T/V406A	15,7	<u>2</u>	-	
11	c.1270G>A	V407M	p.V424M	Versailles lab jan. 2007	voksen	V407M/V407 M			-	

Totalt antall mutasjoner 188										
Ekson	Base-ending	Aminosyre-ending		Referanse	Pasientens kliniske tilstand	Pasientens genotype	VE-KT-%	ref.	E.col i	
		Ikke-standardisert nomenklatur	Standardisert nomenklatur							
11	c.1276G>T	G409C	p.G426C	Mochizuki et al. 2000	infantil	K207A/G409C	18,5	<u>15</u>		
11	c.1277G>A	G409D	p.G426D	Mumm et al. 2002	barndommen	G409D/E174K			-	
11	c.1282C>T	R411X	p.R428X	Taillandier et al. 1999	perinatal	R411X/R411X				Non-sensemutasjon
11	c.1283G>C	R411P	p.R428P	Spentchian et al. 2006	perinatal	R411P/c.997+2T>A			-	
11	c.1285G>A	E412K	p.E429K	Versailles lab Jul. 2006	odonto.	E412K/?				
	c.1306T>C	Y419H	p.Y436H	Henthom et al. 1992	barndommen	A16V/Y419H			na	
12	c.1333T>C	S428P	p.S445P	Mornet et al. 1998	infantil	S428P/?	2,1	<u>1</u>	-	
12	c.1349G>A	R433H	p.R450H	Taillandier et al. 2000	odonto.	D389G/R433 H			-	
12	c.1348C>T	R433C	p.R450C	Mornet et al. 1998	infantil	R433C/R433c C	4,0	<u>1</u>	-	
12	c.1354G>A	E435K	p.E452K	Spentchian et al. 2003	perinatal	A94T/E435K			+	
12	c.1361A>G	H437R	p.H454R	Versailles lab oct. 2003	barn-dommen	E174K/H437R			+	
12	c.1363G>A	G438S	p.G455S	Draguet et al. 2004	voksen	G438S/G474 R			-	
12	c.1364G>A	G438D	p.G455D	Versailles lab jan. 2007	perinatal	G438D/G438D			-	
12	c.1366G>T	G439W	p.G456W	Versailles lab oct. 2003	barn-dommen	G439W/?			+	
12	c.1366G>A	G439R	p.G456R	Ozono et al.1996	infantil	G439R/?	1,5	upub .		
12	c.1375G>A	V442M	p.V459M	Taillandier et al. 2000	infantil	A34V/V442M			+	
12	c.1375G>T	V442L	p.V459L	Versailles lab oct. 2004	perinatal	V442L/E435K			-	
12	c.1396C>T	P449L	p.P466L	Versailles lab oct. 2003	perinatal	P449L/?			+	
12	c.1400T>C	M450T	p.M467T	Versailles lab oct. 2004	infantil	M450T/P290S			-	

Totalt antall mutasjoner 188										
Ekson	Base-endering	Aminosyre-endering		Referanse	Pasientens kliniske tilstand	Pasientens genotype	VE-KT-%	ref.	E.coli	
		Ikke-standardisert nomenklatur	Standardisert nomenklatur							
12	c.1402G>A	A451T	p.A488T	Spentchian et al. 2003	perinatal	A451T/A451T			+	
12	c.1417G>A	G456S	p.G473S	Mornet et al. 1998	perinatal	A23V/G456S			+	
12	c.1426G>A	E459K	p.E476K	Taillandier et al. 1999	perinatal	A94T/E459K			+	
12	c.1427A>G	E459G	p.E476G	Mornet et al. 2001	perinatal	E459G/E459 G			+	
12	c.1433A>T	N461I	p.N478I	Taillandier et al. 2000	barn-dommen	N461I/N	1,1	<u>3</u>	-	
12	c.1444_1445in sC			Brun-Heath et al. 2005	perinatal	c.1444_1445insC/G317D				Lese-ramme-mutasjon
12	c.1456G>C	C472S	p.C489 S	Taillandier et al. 2000	perinatal	C472S/c.997+2T>A	9,4	<u>5</u>	-	
12	c.1468A> T	I473F	p.1490F	Lia-Baldini et al. 2001	voksen	I473F/?	37,1	<u>3</u>	-	
12	c.1471G>A	G474R	p.G491 R	Mornet et al. 1998	perinatal	G112R/G474 R			-	
12	c.1471delG			Brun-Heath et al. 2005	odonto	c.1471delG/R119H				Lese-ramme-mutasjon
12	c.1559delT			Orimo et al. 1994	infantil	E281K/c.1559delT	28	<u>18</u>	na	Lese-ramme-mutasjon
Store slettinger										
sletting av eksone ne 3-5				Spentchian et al. 2006	perinatal	homozygot				
sletting av ekson 12 (3'-del)			Spentchian et al.2006	infantil	hetero-zygot for-bindelse med S164L					

Avstandsstykke

[0026] Uten å være begrenset til denne teorien, er det antatt at Fc-fragmentet anvendt i det beinsøkende sALP-fusjonsproteinet presentert i eksemplene nedenfor fungerer som et avstandsstykke som gjør det mulig for proteinet å foldes mer effektivt siden uttrykking av sTNALP-Fc-D10 var høyere enn for sTNALP-D10 (se eksempel 2
5 nedenfor). En mulig forklaring er at innføringen av Fc-fragmentet lindrer de frastøtende kreftene som forårsakes av nærvær av den svært negative lader-D10-sekvensen tilsatt i C-endepunktet til den testede sALP-sekvensen.

[0027] Nyttige avstandsstykker for foreliggende oppfinnelse inkluderer
10 polypeptider som omfatter et Fc, og hydrofile og fleksible polypeptider i stand til å lindre de frastøtende kreftene som skyldes nærværet av den sterkt negativt ladede D10-sekvensen tilsatt i den C-terminale enden av sALP-sekvensen. I en spesifikk utførelsesform lindrer avstandsstykket den steriske hindringen som forebygger to sALP-domener fra to sALP-monomerer å kommunisere med hverandre for å utgjøre den minimale
15 katalytiske aktive enheten.

Fragmenter av det krystalliserbare fragmentet (Fc)

[0028] Nyttige Fc-fragmenter av foreliggende oppfinnelse inkluderer FC-fragmenter av IgG som omfatter hengselet, og CH2- og CH3-domenene. F.eks. kan
20 IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-3 og IgG-4 anvendes.

Negativt ladet peptid

[0029] Det negativt ladede peptidet ifølge foreliggende oppfinnelse kan være et poly-aspartat eller poly-glutamat valgt fra gruppen som består av D10 til D16 eller E10
25 til E16.

[0030] I spesifikke utførelsesformer bringes de beinsøkende sALP-fusjonsproteinene ifølge foreliggende oppfinnelse i kontakt på denne måten for å danne dimerer eller tetramerer.

[0031] Uten å være begrenset til denne teorien utgjør dimerer formodentlig to
30 beinsøkende sALP-monomerer kovalent bundet gjennom de to disulfidbindingene som befinner seg i hengselsområdene i de to Fc-fragmentene i spesifikke utførelsesformer av oppfinnelsen der det anvendes et polypeptid omfattende en Fc som et avstandsstykke. I denne dimerkonfigurasjonen forebygger den steriske hindringen som skyldes disulfidbindingene mellom kjedene formodentlig at sALP-domener går inn i den
35 dimere, minimalt katalytisk aktive enheten som finnes i normale celler.

[0032] Uten å være begrenset til denne teorien, er det antatt at i den tetramere strukturen, vil foreningen av fusjonsproteinene innebære ett sALP-domene fra en dimer, og en annen fra en annen dimer. Den steriske hindringen som antagelig forebygger to sALP-domener fra den samme Fc-skjømte dimeren fra å kommunisere

med hverandre for å utgjøre den minimalt katalytisk aktive entiteten kan eventuelt lettes ved å sette inn et lengre avstandsstykke enn Fc-en beskrevet i eksemplene presentert i dette dokumentet mellom sALP-fragmentet og polyaspartat- eller polyglutamatfragmentet.

5 **[0033]** Den beinsøkende sALP-en kan videre eventuelt omfatte én eller flere ytterligere aminosyrer 1) nedstrøms fra poly-aspartatet eller poly-glutamatet; og/eller 2) mellom poly-aspartatet og Fc-fragmentet; og/eller 3) mellom avstandsstykket, slik som Fc-fragmentet og sALP-fragmentet. Dette er tilfelle f.eks. når kloningsstrategien som anvendes til å produsere det beinsøkende konjugatet innfører eksogene
10 aminosyrer i disse stedene. De eksogene aminosyrene bør imidlertid velges slik at de ikke gir et ytterligere GPI-forankringssignal. Sannsynligheten for at en utformet sekvens spaltes av transamidase i vertscellen kan forutsies som beskrevet av Ikezawa (Ikezawa 2002).

[0034] Foreliggende oppfinnelse omfatter også fusjonsproteinet som post-
15 translasjonelt modifisert, slik som ved glykolisering inkludert de som uttrykkelig er nevnt i dette dokumentet, acetylering, amidering, blokkering, formylering, gamma-karboksyglutaminsyrehydroksylering, metylering, fosforylering, pyrrolidonkarboksylsyre og sulfatering.

[0035] Begrepet "rekombinant protein" anvendes i dette dokumentet for å stå for
20 et protein kodet for av en genetisk manipulert nukleinsyre satt inn i en prokaryot eller eukaryot vertscelle. Nukleinsyren blir generelt plassert i en vektor, f.eks. et plasmid eller virus, som er hensiktsmessig for den aktuelle vertscellen. Selv om kinesiske hamsterovarie (CHO)-celler er blitt anvendt som en vert for å uttrykke konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse i eksemplene presentert i dette dokumentet, vil en
25 person med ordinære ferdigheter innen teknikken forstå at det kan anvendes en rekke andre verter for å produsere rekombinante proteiner ifølge fremgangsmåter som er rutinemessige innen teknikken. Representative fremgangsmåter er offentliggjort i Maniatis, et al. Cold Springs Harbor Laboratory (1989). "Recombinant cleavable protein", som anvendt i dette dokumentet er ment å stå for et rekombinant protein som
30 kan spaltes av en verts enzym for å produsere et utskilt/løselig protein. Uten å være begrenset på denne måten kan også HEK293-celler, PERC6, babyhamsternyreceller anvendes.

[0036] Som anvendt i dette dokumentet er terminologien "forhold egnet til å
35 bevirke uttrykking av polypeptidet" ment å stå for et hvilket som helst kulturmedium som vil muliggjøre produksjon av fusjonsproteinet ifølge foreliggende oppfinnelse. Uten å være begrenset på denne måten inkluderer det medier fremstilt med en buffer, bikarbonat og/eller HEPES, ioner som klorid, fosfat, kalsium, natrium, kalium, magnesium, jern, karbonkilder som enkle sukkerarter, aminosyrer, potensielle lipider, nukleotider, vitaminer og vekstfaktorer som insulin; vanlige kommersielt tilgjengelige

medier som alfa-MEM, DMEM, Hams-F12 og IMDM supplert med 2-4 mM L-glutamin og 5 % føtalt bovint serum; vanlige kommersielt tilgjengelige dyreproteinfrie medier som Hyclone™ SFM4CHO, Sigma CHO DHFR-, Cambrex POWER™ CHO CD supplementert med 2-4 mM L-glutamin. Disse mediene fremstilles fortrinnsvis uten tymidin, hypoksantin og L-glycin for å opprettholde selektivt trykk og tillater stabil protein-produkt-uttrykking.

[0037] Uten å være begrenset på denne måten inkluderer vertsceller nyttige for å uttrykke fusjonen ifølge foreliggende oppfinnelse L-celler, C127-celler, 3T3-celler, CHO-celler, BHK-celler, COS-7-celler eller kinesiske hamsterovarier (CHO)-celler. Særlige CHO-celler av interesse for å uttrykke fusjonsproteinet i foreliggende oppfinnelse inkluderer CHO-DG44 og CHO/dhfr⁻, også referert til som CHO duk⁻. Denne sistnevnte cellelinjen er tilgjengelig gjennom the American Type Culture Collection (ATCC-nummer CRL-9096).

[0038] Begrepet "beinvev" anvendes i dette dokumentet for å stå for vev syntetisert av osteoblaster som består av en organisk matriks som hovedsakelig inneholder kollagen og mineralisert ved avsetning av hydroksyapatitkrystaller.

[0039] Fusjonsproteinene omfattet i beinleveringskonjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse er nyttige for terapeutisk behandling av skjelettdefektsykdommer ved å gi en effektiv mengde av fusjonsproteinet til beinet. Fusjonsproteinene er gitt i form av farmasøytiske sammensetninger i hvilke som helst standard farmasøytisk akseptable bærere, og administrert ved en hvilken som helst standard prosedyre, f.eks. ved intravenøs injeksjon.

[0040] Som anvendt i dette dokumentet er terminologien "HPP-fenotype" ment å stå for en hvilken som helst av rakitter (defekt i vekstplatebrusk), osteomalasi, forhøyede blod- og/eller urinnivåer av uorganisk pyrofosfat (PP_i), fosfoetanolamin (PEA) eller pyridoksal-5'-fosfat (PLP), anfall, beinsmerter, kalsiumpyrofosfatdihydratkrystallavsetning (CPPD) i leddene som fører til kondrokalcinose og for tidlig død. Uten å være begrenset til dette, kan en HPP-fenotype dokumenteres med veksthemming med en reduksjon i lang beinlengde (som lårbein, skinnebein, humerus, radius, ulna), en reduksjon i gjennomsnittlig tetthet av totalbein og en reduksjon av beinmineralisering i bein som lårbein, skinnebein, ribbein og metatarsi, og phalange, en reduksjon i tannmineralisering, et for tidlig tap av melketenner (f.eks. aplasi, hypoplasi eller dysplasi av dental cementum). Uten å være begrenset til dette, kan korreksjon eller forebyggelse av beinmineraliseringsdefekt observeres av én eller flere av de følgende: en økning av lang beinlengde, en økning av mineralisering i bein og/eller tenner, en korreksjon av bøyning av beinene, en reduksjon av beinsmerte og en reduksjon av CPPD-krystallavsetning i leddene.

[0041] Som anvendt i dette dokumentet er terminologien "riktig" i begrepet "korrigere en hypofosfatasifenotype" ment å stå for enhver delvis eller fullstendig

reduksjon av en pre-eksisterende HPP-fenotype. Tilsvarende er terminologien "forebygge" i begrepet "forebygge en hypofosfatasifenotype" ment å stå for en hvilken som helst forsinkelse eller bremsing av utviklingen av en HPP-fenotype eller en hvilken som helst delvis eller fullstendig unngåelse av utviklingen av en HPP-fenotype.

5 **[0042]** Som anvendt i dette dokumentet er begrepet "individ" ment å stå for et hvilket som helst pattedyr, inkludert menneske, mus, rotte, hund, katt, gris, ku, ape, hest osv. I en bestemt utførelsesform refererer det til et menneske.

[0043] Som anvendt i dette dokumentet er begrepet "individ som trenger det/individ som har behov for det" i en fremgangsmåte for å administrere en
10 forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse ment å stå for et individ som vil ha nytte av å motta en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse. I spesifikke utførelsesformer refererer det til et individ som allerede har minst én HPP-fenotype eller til et individ som er sannsynlig å utvikle minst én HPP-fenotype eller minst én HPP-fenotype. I en annen utførelsesform refererer det videre til et individ som har aplasi, hypoplasi eller
15 dysplasi av dental cementum eller et individ som er sannsynlig å utvikle aplasi, hypoplasi eller dysplasi av dental cementum.

[0044] Som anvendt i dette dokumentet er "et individ som er sannsynlig å utvikle minst én HPP-fenotype" et individ som har minst én tap-av-funksjons-mutasjon i genet (*ALPL*).

20 **[0045]** Som anvendt i dette dokumentet er "et individ som er sannsynlig å utvikle aplasi, hypoplasi eller dysplasi av dental cementum" et individ som har HPP eller en periodontal sykdom på grunn av en bakteriell infeksjon. Periodontal sykdom på grunn av en bakteriell infeksjon kan indusere endring av sement som kan føre til eksfoliering av tennene.

25 Administreringsvei

[0046] Beinsøkende sALP-er ifølge foreliggende oppfinnelse kan administreres ved f.eks. oral, nasal, intravenøs, intramuskulær, subkutan, sublingual, intratekal eller intradermal vei. Administreringsveien kan avhenge av en rekke faktorer, slik som
30 miljøet og terapeutiske mål. Som anvendt i dette dokumentet refererer individer til dyr som mennesker der forebyggelse, eller korreksjon av beinmineraliseringsdefekt som karakteriserer HPP eller andre fenotyper assosiert med HPP eller forebyggelse eller korreksjon av defekt cementum er ønskelig.

[0047] Som et eksempel kan farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen
35 være i form av en væske, løsning, suspensjon, pille, kapsel, tablett, gelkapsel, pulver, gel, salve, krem, tåke, atomisert damp, aerosol eller fytosom. For oral administrering kan det fremstilles tabletter eller kapsler ved konvensjonelle midler med farmasøytisk akseptable eksipienter slik som bindemidler, fyllstoffer, smøremidler, desintegrerende midler eller fuktemidler. Tablettene kan belegges ved hjelp av fremgangsmåter kjent i

teknikken. Flytende preparater for oral administrering kan ta form av f.eks. løsninger, siruper eller suspensjonen, eller de kan presenteres som et tørt produkt for konstituering med saltløsning eller annen egnet flytende vehikkel før anvendelse. Kosttilskudd ifølge oppfinnelsen kan også inneholde farmasøytisk akseptable additiver slik som suspensjonsmidler, emulgeringsmidler, ikke-vandige vehikler, konserveringsmidler, buffersalter, smaksstoffer, fargestoffer og søtningsmidler etter behov. Preparater for oral administrering kan også hensiktsmessig formuleres for å gi kontrollert frigjøring av de aktive bestanddelene.

[0048] Enteriske belegg kan videre anvendes på tabletter ifølge foreliggende oppfinnelse til å motstå forlenget kontakt med den svært sure magesaften, men løser seg opp i det middels sure eller nøytrale miljøet i tarmen. Uten å være begrenset til dette kan celluloseacetatftalat, Eudragit™ og hydroksypropylmetylcelluloseftalat (HPMCP) anvendes i enteriske belegg av farmasøytiske sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse. Celluloseacetatftalatkonsentrasjoner som generelt anvendes er 0,5-9,0 % av kjernevekten. Tilsetning av myknere øker vannbestandigheten av dette beleggmateriallet, og formuleringer som anvender slike myknere er mer effektive enn når celluloseacetatftalat anvendes alene. Celluloseacetatftalat er kompatibel med mange myknere, inkludert acetyllert monoglycerid; butylftalybutylglykolat; dibutyltartrat; dietylftalat; dimetylftalat; etylftalyetylglykolat; glyserin; propylenglykol; triacetin; triacetincitrat; og tripropionin. Det anvendes også i kombinasjon med andre beleggmidler slik som etylcellulose, i medikamentkontrollert-frigjørende preparater.

Dosering

[0049] En mengde av en farmasøytisk sammensetning kan gis til et individ. Dosene vil avhenge av mange faktorer, inkludert administreringsmåten og alderen til individet. Vanligvis er mengden beinsøkende ALP ifølge oppfinnelsen inneholdt i en enkelt dose en mengde som effektivt forebygger, forsinker eller korrigerer bein-mineraliseringsdefekt i HPP uten å indusere signifikant giftighet. Slik det anvendes i dette dokumentet er begrepet "terapeutisk effektiv mengde" ment å stå for en mengde effektiv til å oppnå den ønskede terapeutiske effekten og samtidig unngå uønskede bivirkninger. Vanligvis kan beinsøkende sALP-er i samsvar med foreliggende oppfinnelse administreres til individer i doser i området fra 0,001 til 500 mg/kg/dag og, i en mer spesifikk utførelsesform, omtrent 0,1 til omtrent 100 mg/kg/dag og, i en mer spesifikk utførelsesform, omtrent 0,2 til omtrent 20 mg/kg/dag. Den allometriske skaleringsmetoden til Mahmood et al. (Mahmood et al. 2003) kan anvendes til å ekstrapolere dosen fra mus til menneske. Dosen tilpasses av legen i samsvar med konvensjonelle faktorer slik som omfanget av sykdommen og forskjellige parametere fra pasienten.

[0050] Den terapeutisk effektive mengden av beinsøkende sALP kan også måles

direkte. Den effektive mengden kan gis daglig eller ukentlig eller fraksjoner av dette. Vanligvis kan en farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen administreres i en mengde fra omtrent 0,001 mg opptil omtrent 500 mg per kg kroppsvekt per dag (f.eks. 0,05, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 0,8, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 30 mg, 50 mg, 100 mg eller 250 mg). Doser kan tilveiebringes i enten et enkelt doseregime eller flere doseregimer. F.eks., i noen utførelsesformer er den effektive mengden en dose som varierer fra omtrent 0,1 til omtrent 100 mg/kg/dag, fra omtrent 0,2 mg til omtrent 20 mg av beinsøkende sALP per dag, omtrent 1 mg til omtrent 10 mg beinsøkende sALP per dag, fra omtrent 0,07 mg til omtrent 210 mg beinsøkende sALP per uke, 1,4 mg til omtrent 140 mg beinsøkende sALP per uke, omtrent 0,3 mg til omtrent 300 mg beinsøkende sALP hver tredje dag, omtrent 0,4 mg til omtrent 40 mg beinsøkende sALP annenhver dag, og omtrent 2 mg til omtrent 20 mg beinsøkende sALP annenhver dag.

[0051] Dette er bare veiledende siden den faktiske dosen må velges nøye og styrkeberegnes av den behandlende legen ut fra kliniske faktorer som er unike for hver pasient, eller av en ernæringsfysiolog. Den optimale daglige dosen bestemmes med fremgangsmåter som er kjent i faget, og vil påvirkes av faktorer som pasientens alder, som angitt ovenfor, og andre klinisk relevante faktorer. Dessuten kan det hende at pasienter tar legemidler for andre sykdommer eller lidelser. De kan fortsette med de andre legemidlene i løpet av den tiden en beinsøkende sALP gis til pasienten, men i slike tilfeller oppfordres det sterkt å begynne med lave doser for å finne ut om pasienten opplever bivirkninger.

Bærere/vehikler

[0052] Preparater som inneholder en beinsøkende sALP kan gis til pasienter i kombinasjon med farmasøytisk akseptable sterile vandige eller ikke-vandige løsningsmidler, suspensjoner eller emulsjoner. Eksempler på ikke-vandige løsningsmidler er propylenglykol, polyetylenglykol, vegetabilsk olje, fiskeolje, og injiserbare organiske estere. Vandige bærere inkluderer vann, vann-alkohol-løsninger, emulsjoner eller suspensjoner, inkludert saltløsning og bufrede medisinsk parenterale vehikler inkludert natriumkloridløsning, Ringers dektroseløsning, dekstrose pluss natriumkloridløsning, Ringers løsning som inneholdt laktose, eller fikserte oljer. Intravenøse vehikler kan inkludere væske og næringskomplettene, elektrolyttkomplettene, slik som de basert på Ringers dekstrose og lignende.

[0053] I enda en annen utførelsesform kan de farmasøytiske sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse leveres i et kontrollert frigjøringsystem. I en utførelsesform kan det anvendes polymere materialer, inkludert polymelkesyre, polyortoestere, tverrbundne amfipatiske blokkopolymerer og hydrogeler, polyhydroksysmørsyre og polydihydropyraner (se også Smolen and Ball, Controlled Drug

Bioavailability, Drug product design and performance, 1984, John Wiley & Sons; Ranade and Hollinger, Drug Delivery Systems, pharmacology and toxicology series, 2003, 2. utgave, CRRC Press), i en annen utførelsesform kan en pumpe anvendes (Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574).

5 **[0054]** Fusjonsproteinene ifølge foreliggende oppfinnelse kan være i form av et lyofilisert pulver ved hjelp av egnede eksipientløsninger (f.eks. sukrose) som fortynningsmidler.

[0055] Videre kan nukleotidsegmentene eller proteinene ifølge foreliggende oppfinnelse innføres i individer på en rekke måter. F.eks. kan osteoblaster isoleres fra
10 det berørte individet, omgjøres med et nukleotidkonstrukt ifølge oppfinnelsen og gjeninnføres til det berørte individet på en rekke måter, inkludert intravenøs injeksjon. Alternativt kan nukleotidkonstruktet administreres direkte til det berørte individet, f.eks. ved injeksjon. Nukleotidkonstruktet kan også leveres gjennom en
15 vehikkel slik som et liposom, som kan utformes til å rettes mot en spesifikk celletype og konstrueres for administrering gjennom forskjellige veier.

[0056] Fusjonsproteinene ifølge foreliggende oppfinnelse kunne også med fordel leveres ved genterapi. Nyttige genterapeutiske metoder inkluderer de som er beskrevet i WO06060641A2, US7179903 og WO0136620A2 til Genzyme ved hjelp av f.eks. en
20 adenovirusvektor for det terapeutiske proteinet og målrette hepatocytter som proteinproduserende celler.

[0057] En "genleveringsvehikkel" er definert som et hvilken som helst molekyl som kan føre innsatte polynukleotider inn i en vertscelle. Eksempler på genleveringsbærere er liposomer, biokompatible polymerer, inkludert naturlige polymerer og syntetiske polymerer; lipoproteiner; polypeptider; polysakkarider; lipopoly-
25 sakkarider; kunstige virushylser; metallpartikler; og bakterier eller virus, slik som baculovirus, adenovirus og retrovirus, bakteriofager, kosmider, plasmider, soppvektorer og andre rekombinasjonsvehikler som vanligvis anvendes innen teknikken, som er blitt beskrevet for uttrykking i en rekke eukaryote og prokaryote verter, og kan anvendes for genterapi og for enkel proteinuttrykking. "Genlevering,"
30 "genoverføring" og lignende som anvendt i dette dokumentet, er begreper som henviser til innføring av et eksogent polynukleotid (noen ganger referert til som et "transgen") inn i en vertscelle, uansett hvilken metode som anvendes i innføringen. Slike metoder inkluderer en rekke velkjente metoder som f.eks. vektor-formidlet genoverføring (f.eks. virusinfeksjon/transfeksjon, eller forskjellige andre proteinbaserte eller lipid-baserte
35 genleveringskomplekser), så vel som metoder som letter leveringen av "nakne" polynukleotider (slik som elektroporering, "genpistol"-levering og andre forskjellige metoder som anvendes til å innføre polynukleotider). Det innførte polynukleotidet kan opprettholdes stabilt eller forbigående i vertcellen. Stabil opprettholdelse krever vanligvis at det innførte polynukleotidet enten inneholder et replikasjonsorigo som er

kompatibelt med vertscellen, eller integrerer inn i et replikon i vertscellen, slik som et ekstrakromosomalt replikon (f.eks. et plasmid) eller et kjernechromosom eller mitokondriekromosom. Mange vektorer er kjent for å være i stand til å mediere overføring av gener til pattedyrceller, som er kjent innen teknikken og beskrevet i dette dokumentet.

[0058] En "virusvektor" er definert som et rekombinant produsert virus eller viruspartikkel som omfatter et polynukleotid som skal leveres inn i en vertscelle, enten *in viva*, *ex viva* eller *in vitro*. Eksempler på virusvektorer inkluderer retrovirale vektorer, adenovirusvektorer, adeno-assosierte virusvektorer, slik som de beskrevet i WO06002203A2, alfavirusvektorer og lignende. Alfavirusvektorer, slik som Semliki Forest-virusbaserte vektorer og Sindbis-virusbaserte vektorer, har også blitt utviklet for anvendelse i genterapi og immunterapi.

[0059] I aspekter der genoverføring medieres av en DNA-virusvektor, slik som et adenovirus (Ad) eller adeno-assosiert virus (MV), refererer et vektorkonstrukt til polynukleotidet omfattende virusgenomet eller en del av dette, og et transgen. Adenovirus (Ad-er) er en relativt godt karakterisert, homogen gruppe av virus, inkludert over 50 serotyper. Se f.eks. internasjonal PCT-søknad nr. WO 95/27071. Ad-er er lette å dyrke og krever ikke integrering inn i ertscellegenomet. Rekombinante Ad-avledede vektorer, spesielt de som reduserer muligheten for rekombinasjon og generering av villtypevirus, er også blitt konstruert. Se internasjonal PCT-søknad nr. WO 95/00655 og WO 95/11984. Vektorer som inneholder både en promotor og et kloningssete et polynukleotid kan bindes operativt i er velkjent innen teknikken. Slike vektorer er i stand til å transkribere RNA *in vitro* eller *in vivo*, og er kommersielt tilgjengelige fra kilder som Stratagene (La Jolla, CA) og Promega Biotech (Madison, WI). For å optimalisere uttrykking og/eller *in vitro*-transkripsjon, kan det være nødvendig å fjerne, tilføye eller endre 5'- og/eller 3'-ikke-translaterte deler av klonene for å eliminere ekstra, potensielt upassende alternative translasjonsinitieringskodoner, eller andre sekvenser som kan forstyrre med eller redusere uttrykking, enten på nivået av transkripsjon eller translasjon.

[0060] Den beinsøkende sALP-en ifølge foreliggende oppfinnelse kan også anvendes i kombinasjon med minst én annen aktiv bestanddel for å korrigere en beinmineraliseringsdefekt eller annet skadelig symptom på HPP. Den kan også anvendes i kombinasjon med minst én annen aktiv bestanddel for å korrigere sementdefekten.

[0061] Begrepet "høy stringens" står for forhold som gjør det mulig å binde sekvenser med høy homologi. Uten at de skal være begrensende, er eksempler på slike forhold oppført i håndboken "Molecular cloning, a laboratory manual, andre utgave av 1989 fra Sambrook *et al.*: 6XSSC eller 6XSSPE, Denhardts reagens eller ikke, 0,5 %

SDS, og temperaturen som anvendes for å oppnå høy stringens er oftest i området rundt 68 °C (se sidene 9,47 til 9,55 i Sambrook) for nukleinsyre av 300 til 1500 nukleotider. Selv om den optimale temperaturen som skal anvendes for en spesifikk nukleinsyre-probe kan beregnes empirisk, og selv om det er rom for alternativer i de valgte bufferbetingelsene, vil nukleinsyren som fanges ikke variere signifikant innen disse meget velkjente tilstandsområdene. Sambrook indikerer tydelig at "valget avhenger i stor grad av personlige preferanser" (se side 9,47). Sambrook angir formelen for å beregne den optimale temperaturen som varierer med fraksjonen av guanin og cytosin i nukleinsyreproben og lengden på sonden (10 til 20 °C lavere enn T_m der $T_m = 81,5\text{ °C} + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 (\text{fraksjon G+C}) - 0,63 (\% \text{ formamid } -(600/I))$ (se side 9.50 og 9.51 i Sambrook).

Sett

[0062] Foreliggende oppfinnelse vedrører også et sett for å korrigere eller forebygge en HPP-fenotype eller cementumdefekt som omfatter en nukleinsyre, et protein eller en ligand ifølge foreliggende oppfinnelse. Det kan f.eks. bestå av en beinsøkende sammensetning ifølge foreliggende oppfinnelse eller en vektor som koder det samme, og instruksjoner for å administrere sammensetningen eller vektoren til et individ for å korrigere eller forebygge en HPP-fenotype. Slike sett kan videre omfatte minst ett annet aktivt middel i stand til å forbygge eller korrigere en HPP-fenotype. Når settet anvendes til å forbygge eller korrigere en HPP-fenotype i et HPP-individ, kan settet også ytterligere omfatte minst ett annet aktivt middel i stand til å forbygge eller korrigere eventuelle andre uheldige symptomer på HPP. I tillegg inkluderer et rominndelt sett ifølge foreliggende oppfinnelse et hvilken som helst sett der reagensene befinner seg i separate beholdere. Slike beholdere inkluderer små glassbeholdere, plastbeholdere eller strimler av plast eller papir. Slike beholdere muliggjør effektiv overføring av reagenser fra ett rom til et annet rom, slik at prøvene og reagensene ikke kontamineres med hverandre, og at midlene eller løsningene i hver beholder kan tilsettes på en kvantitativ måte fra ett rom til et annet.

[0063] Nærmere bestemt, i samsvar med et første aspekt av foreliggende oppfinnelse, er det tilveiebrakt en beinsøkende alkalisk fosfatase omfattende et polypeptid med følgende struktur: Z-sALP-Y-avstandsstykke-X-Wn-V, der sALP er det ekstracellulære domenet til alkalisk fosfatase; der V er fraværende eller er en aminosyresekvens av minst én aminosyre; X er fraværende eller er en aminosyresekvens av minst én aminosyre; Y er fraværende eller er en aminosyresekvens av minst én aminosyre; Z er fraværende eller er en aminosyresekvens av minst én aminosyre; og Wn er et polyaspartat eller et polyglutamat der $n = 10$ til 16 .

[0064] I en spesifikk utførelsesform omfatter sALP aminosyrerestene 23-508 i SEQ ID NO: 15. I en annen spesifikk utførelsesform består sALP av aminosyrerestene

23-512 i SEQ ID NO: 15. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter sALP aminosyrerestene 23-508 i SEQ ID NO: 18. I en annen spesifikk utførelsesform består sALP av aminosyrerestene 23-512 i SEQ ID NO: 18. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter sALP aminosyrerestene 18-498 i SEQ ID NO: 16. I en annen spesifikk utførelsesform består sALP av aminosyrerestene 18-502 i SEQ ID NO: 16. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter sALP aminosyrerestene 18-498 i SEQ ID NO: 19. I en annen spesifikk utførelsesform består sALP av aminosyrerestene 18-502 i SEQ ID NO: 19. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter sALP aminosyrerestene 18-498 i SEQ ID NO: 19. I en annen spesifikk utførelsesform består sALP av aminosyrerestene 18-502 i SEQ ID NO: 19. Som også beskrevet i dette dokumentet omfatter sALP aminosyrerestene 18-498 i SEQ ID NO: 8. I en annen spesifikk utførelsesform består sALP av aminosyrerestene 18-502 i SEQ ID NO: 8.

[0065] I en annen spesifikk utførelsesform omfatter avstandsstykket en fragmentkrystalliserbar region (Fc). I en annen spesifikk utførelsesform omfatter Fc et CH2-domene, et CH3-domene og et hengselområde. I en annen spesifikk utførelsesform er Fc et konstant domene av et immunglobulin valgt fra gruppen som består av IgG-1, IgG-2, IgG-3 og IgG-4. I en annen spesifikk utførelsesform er Fc et konstant domene av et immunglobulin IgG-1. I en annen spesifikk utførelsesform er Fc som angitt i SEQ ID NO: 3. I en annen spesifikk utførelsesform er Wn et polyaspartat. I en annen spesifikk utførelsesform er n=10. I en annen spesifikk utførelsesform er Z fraværende. I en annen spesifikk utførelsesform er Y to aminosyrerester. I en annen spesifikk utførelsesform er Y leucin-lysin. I en annen spesifikk utførelsesform er X 2 aminosyrerester. I en annen spesifikk utførelsesform er X aspartat-isoleucin. Som også beskrevet i dette dokumentet, er V fraværende. I en annen spesifikk utførelsesform er polypeptidet som fremsatt i SEQ ID NO: 4.

[0066] I en annen spesifikk utførelsesform omfatter den beinsøkende alkaliske fosfatasen polypeptidet i en form som omfatter en dimer. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter den beinsøkende alkaliske fosfatasen polypeptidet i form av en tetramer.

[0067] I en annen spesifikk utførelsesform er den beinsøkende alkaliske fosfatasen i en farmasøytisk akseptabel bærer. I en annen spesifikk utførelsesform er den farmasøytisk akseptable bæreren en saltløsning. I en annen spesifikk utførelsesform er den beinsøkende alkaliske fosfatasen i en lyofilisert form. I en annen spesifikk utførelsesform er den beinsøkende alkaliske fosfatasen i en daglig dose på omtrent 0,2 til omtrent 20 mg/kg. I en annen spesifikk utførelsesform er den beinsøkende alkaliske fosfatasen i en dosering på omtrent 0,6 til omtrent 60 mg/kg for administrering hver tredje dag. I en annen spesifikk utførelsesform er den beinsøkende alkaliske fosfatasen i en ukentlig dose på omtrent 1,4 til omtrent 140 mg/kg. I en annen spesifikk utførelsesform er den beinsøkende alkaliske fosfatasen i en ukentlig dose på omtrent

0,5 mg/kg.

[0068] Nærmere bestemt, i samsvar med et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse, er det tilveiebrakt en isolert nukleinsyre som omfatter en sekvens som koder for polypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse.

5 **[0069]** I samsvar med et annet aspekt ved foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt en isolert nukleinsyre som består av en sekvens som koder for polypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse. Som beskrevet i dette dokumentet er det tilveiebrakt en isolert nukleinsyre som omfatter en sekvens som fremsatt i SEQ ID NO: 17.

[0070] I samsvar med et annet aspekt ved foreliggende oppfinnelse er det
10 tilveiebrakt en rekombinant uttrykingsvektor omfattende en nukleinsyre ifølge foreliggende oppfinnelse. Nærmere bestemt, i samsvar med et annet aspekt ved foreliggende oppfinnelse, er det tilveiebrakt en rekombinant adeno-assosiert virusvektor som omfatter nukleinsyren ifølge foreliggende oppfinnelse. Nærmere bestemt, i samsvar med et annet aspekt ved foreliggende oppfinnelse, er det tilveiebrakt
15 en isolert rekombinant vertscelle omgjort eller transfektert med vektoren ifølge foreliggende oppfinnelse.

[0071] I samsvar med et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for å produsere den beinsøkende alkaliske fosfatasen for foreliggende oppfinnelse, som omfatter å dyrke vertscellen ifølge foreliggende
20 oppfinnelse under forhold som egner seg for å bevirke uttrykking av den beinsøkende alkaliske fosfatasen, og utvinne den beinsøkende alkaliske fosfatasen fra dyrkningsmediet.

[0072] I en spesifikk utførelsesform er vertscellen en L-celle, C127-celle, 3T3-celle, CHO-celle, BHK-celle, COS-7-celle eller en kinesisk hamsterovarie (CHO)-
25 celle. I en annen spesifikk utførelsesform er vertscellen en kinesisk hamsterovarie (CHO) -celle. I en spesifikk utførelsesform er vertscellen en CHO-DG44-celle.

[0073] I samsvar med et annet aspekt ved foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt et sett som omfatter den beinsøkende alkaliske fosfatasen for foreliggende oppfinnelse, og instruksjoner for å administrere polypeptidet til et individ for å
30 korrigere eller forebygge en hypofosfatasi(HPP)-fenotype.

[0074] I samsvar med et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse, er det tilveiebrakt et sett som omfatter den beinsøkende alkaliske fosfatasen i foreliggende oppfinnelse, og instruksjoner for å administrere polypeptidet til et individ for å korrigere eller forebygge aplasi, hypoplasi eller dysplasi av dental cementum.

35 **[0075]** I samsvar med et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse, er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for å anvende den beinsøkende alkaliske fosfatasen i foreliggende oppfinnelse, for å korrigere eller forebygge minst én hypofosfatase (HPP) fenotype, som omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av den

beinsøkende alkaliske fosfatasen til et individ med behov for dette, hvorved den minst ene HPP-fenotypen korrigeres eller forebygges i individet.

[0076] I en spesifikk utførelsesform har individet minst én HPP-fenotype. I en annen spesifikk utførelsesform er individet sannsynlig å utvikle minst én HPP fenotype. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter den minst ene HPP-fenotypen HPP-relaterte anfall. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter den minst ene HPP-fenotypen tidlig tap av melketenner. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter den minst ene HPP-fenotypen ufullstendig beinmineralisering. I en annen spesifikk utførelsesform er ufullstendig beinmineralisering ufullstendig femoral beinmineralisering. I en annen spesifikk utførelsesform er ufullstendig beinmineralisering ufullstendig skinnbeinbeinmineralisering. I en annen spesifikk utførelsesform er ufullstendig beinmineralisering ufullstendig metatarsal beinmineralisering. I en annen spesifikk utførelsesform er ufullstendig beinmineralisering ufullstendig ribbeinmineralisering. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter den minst ene HPP-fenotypen forhøyede blod- og/eller urinnivåer av uorganisk pyrofosfat (PPI). I en annen spesifikk utførelsesform omfatter den minst ene HPP-fenotypen forhøyede blod- og/eller urinnivåer av fosfoetanolamin (PEA). I en annen spesifikk utførelsesform omfatter den minst ene HPP-fenotypen forhøyede blod- og/eller urinnivåer av pyridoksal-5'-fosfat (PLP). I en annen spesifikk utførelsesform omfatter den minst ene HPP-fenotypen utilstrekkelig vektøkning. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter den minst ene HPP-fenotypen rakitt. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter den minst ene HPP-fenotypen beinsmerte. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter den minst ene HPP-fenotypen kalsiumpyrofosfatdihydratkrySTALLAVSETNING. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter den minst ene HPP-fenotypen aplasi, hypoplasi eller dysplasi av dental cementum. I en annen spesifikk utførelsesform har individet som trenger det infantil HPP. I en annen spesifikk utførelsesform har individet som trenger det barndoms-HPP. I en annen spesifikk utførelsesform har individet som trenger det perinatal HPP. I en annen spesifikk utførelsesform har individet som trenger det voksen HPP. I en annen spesifikk utførelsesform har individet som trenger det, odontohypofosfatase HPP.

[0077] I samsvar med et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for anvendelse av beinsøkende alkalisk fosfatase i foreliggende oppfinnelse, for å korrigere eller forebygge aplasi, hypoplasi eller dysplasi av dental cementum, som omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av beinmålrettet alkalisk fosfatase til et individ som trenger det, der aplasi, hypoplasi eller dysplasi av dental cementum korrigeres eller forebygges i individet.

[0078] I en spesifikk utførelsesform omfatter administrering å transfektere en celle i individet med en nukleinsyre som koder for den alkaliske fosfatasen. I en annen spesifikk utførelsesform utføres transfeksjon av cellen *in vitro*, slik at den beinsøkende

alkaliske fosfatasen uttrykkes og skilles ut i en aktiv form, og administreres til individet med cellen. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter administreringen subkutan administrering av beinsøkende alkalisk fosfatase til individet. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter administreringen intravenøs administrering av beinsøkende alkalisk fosfatase til individet.

[0079] I samsvar med et annet aspekt ved foreliggende oppfinnelse tilveiebringes beinsøkende alkalisk fosfatase i foreliggende oppfinnelse, for anvendelse i å korrigere eller forebygge minst én HPP-fenotype.

[0080] I samsvar med et annet aspekt ved foreliggende oppfinnelse tilveiebringes beinsøkende alkalisk fosfatase i foreliggende oppfinnelse, for anvendelse i å korrigere eller forebygge aplasi, hypoplasi eller dysplasi av dental cementum.

[0081] I samsvar med et annet aspekt ved foreliggende oppfinnelse tilveiebringes en anvendelse av beinsøkende alkalisk fosfatase ifølge foreliggende oppfinnelse i fremstillingen av et medikament.

[0082] I samsvar med et annet aspekt ved foreliggende oppfinnelse tilveiebringes en anvendelse av beinsøkende alkalisk fosfatase i foreliggende oppfinnelse, for å korrigere eller forebygge minst én HPP-fenotype.

[0083] I samsvar med et annet aspekt ved foreliggende oppfinnelse tilveiebringes en anvendelse av beinsøkende alkalisk fosfatase ifølge foreliggende oppfinnelse, for å korrigere eller forebygge aplasi, hypoplasi eller dysplasi av dental cementum

[0084] Andre formål, fordeler og trekk ved foreliggende oppfinnelse vil bli mer åpenbare ved å lese den følgende ikke-begrensede beskrivelsen av spesifikke utførelsesformer av denne, gitt i form av eksempel med henvisning til de vedlagte tegningene.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

[0085] I de vedlagte tegningene:

Figur 1 viser utformingen og den skjematiske strukturen av beinsøkende ALP ifølge foreliggende oppfinnelse eksemplifisert ved hsTNALP-FcD10. Rute A viser en skjematisk fremstilling av det fullstendige primære translasjonsproduktet av det humane ikke-vevsspesifikke alkalisk fosfatase-genet (TNALP) inkludert signalpeptidet i N-enden og det forbigående membran-forankrede signalet for GPI-tilsetning. Rute B viser det primære translasjonsproduktet av fusjonsproteinet. Rute C viser det primære translasjonsproduktet uten det spaltbare TNALP-signalpeptidet;

Figur 2 viser proteinsekvensen for hTNALP-FcD10 ((SEQ ID NO: 1), inkludert det N-terminale peptidsignalet-17 først aa), der hTNALP-delen (SEQ ID NO: 2) er i

kursiv inkludert peptidsignaldelen vist i kursiv og understreket, og Fc-fragmentet er understreket (SEQ ID NO: 3);

Figur 3 viser proteinsekvensen for hsTNALP-FcD10 anvendt i eksemplene som presenteres i dette dokumentet (SEQ ID NO: 4) (uten det N-terminale peptid-signalet), der hsTNALP-delen (SEQ ID NO: 5) er i kursiv, og Fc-fragmentet er understreket (SEQ ID NO: 3). De dobbelt understrekede asparagin-(N)-restene tilsvarer antatte N-glykosylerings seter og fete aminosyrerester (LK & DI) tilsvarer linkere mellom hsTNALP og Fc, og henholdsvis Fc- og D10-domenene. Disse linkerene avledes fra endonukleasekartrestriksjons seter introdusert ved cDNA-teknikk;

Figur 4 viser grafisk den komparative uttrykkingen av sTNALP-D10 og sTNALP-FcD10 i CHO-DG44-celler;

Figur 5 viser sTNALP-FcD10-rensing på protein-A-Sepharosemolekylsikt-kromatografi på Sephacryl™ 3-300 samt SDS-PAGE-analyse av rensset sTNALP-FcD10 under reduserende (DTT+)- og ikke-reduserende (DTT)-forhold. Den viser også en skjematisk versjon av sTNALP-FcD10. Proteinet rensset ved protein A-Sepharose™-affinitetskromatografi ble analysert ved SDS-PAGE og bånd farget med Sypro™ Ruby. Hovedarter av sTNALP-FcD10 migrerte med en tilsynelatende molekylvekt på 90 000 Da under reduserende forhold og 200 000 Da under ikke-reduserende forhold;

Figur 6 viser posisjonen av papainspaltningssetet i sTNALP-FcD10;

Figur 7 viser en ikke-denaturerende SEC-HPLC-analyse av sTNALP-FcD10 på TSK-Gel G3000WXL-kolonne. Vanlig kurve: papaindigerert prøve. -X-kurve: identisk prøve inkubert ved de samme forholdene uten papain (kontroll);

Figur 8 viser en SDS-PAGE-analyse av sTNALP-FcD10 inkubert med eller uten papain som viser hvilket fragment som er ansvarlig for hvilket bånd på gelen. Analysen ble utført under reduserende (+DTT)- eller ikke-reduserende (-DTT)-forhold;

Figur 9 viser en *in vitro*-bindingsanalyse. sTNALP-FcD10 og ikke-spesifikk alkalisk fosfatase fra storfenyrevev ble sammenlignet i den rekonstituerte mineralbindingsanalysen som beskrevet i eksempel 2. Total aktivitet er summen av den enzymatiske aktiviteten gjenvunnet i de frie og bundne fraksjonene. Total aktivitet ble funnet å

være 84 % og 96 % av opprinnelig mengde av enzymatisk aktivitet innført i hvert sett av analyser for henholdsvis de bovine og sTNALP-FcD10-formene av enzym. Resultatene er gjennomsnittet av to bindinger;

- 5 Figur 10 viser farmakokinetiske og distribusjonsprofiler av sTNALP-FcD10 i serum, skinneben og muskel hos voksne WT-mus. Konsentrasjoner av sTNALP-FcD10 i serum, skinneben og muskel er uttrykt i $\mu\text{g/g}$ vev (våt vekt) etter en enkel intravenøs bolusinjeksjon på 5 mg/kg hos voksne WT-mus;
- 10 Figur 11 viser den farmakokinetiske profilen til sTNALP-FcD10-serumkonsentrasjonen hos nyfødte WT-mus. Serumkonsentrasjoner av sTNALP-FcD10 som en funksjon av tid etter en enkelt i.p. (rute A), eller s.c. (rute B) injeksjon av 3,7 mg/kg hos (1 dag gamle) nyfødte WT-mus;
- 15 Figur 12 viser den forutsagte farmakokinetiske profilen til sTNALP-FcD10 i serum. Forutsagte maksimale (C_{maks}) og minimale (C_{min}) sirkulerende stabile-tilstandsnivåer av sTNALP-FcD10 etter gjentatte (hver 24. time) subkutane injeksjoner av 10 mg/kg hos nyfødte mus;
- 20 Figur 13 viser den eksperimentelt testede farmakokinetiske profilen til sTNALP-FcD10 i serum hos nyfødte mus. Målt minimale (C_{min}) sirkulerende stabile tilstandsnivåer av sTNALP-FcD10 24 timer etter de siste subkutane injeksjonene av 10 mg/kg hos nyfødte mus. Homo: homozygot, hetero: heterozygot;
- 25 Figur 14 viser kortsiktige (15 dager), effektivitetsresultater av lav dose (1 mg/kg), i form av sTNALP-FcD10-serumkonsentrasjoner hos behandlede $\text{Akp2}^{-/-}$ -mus. sTNALP-FcD10-serumkonsentrasjoner på dag 16 hos mus behandlet i 15 dager med daglige s.c.-injeksjoner av 1 mg/kg sTNALP-FcD10;
- 30 Figur 15 viser kortvarige (15 dager), effektivitetsresultater av lav dose (1 mg/kg) i form av serum PPI-konsentrasjoner hos behandlede $\text{Akp2}^{-/-}$ -mus. Måling av serum PPI-konsentrasjoner. En lav dose på 1 mg/kg var tilstrekkelig til å normalisere PPI-nivåene hos ERT-behandlede mus;
- 35 Figur 16 viser kortsiktige (15 dager), effektivitetsresultater av lav dose (1 mg/kg) i form av vekstplatemorfologien hos behandlede $\text{Akp2}^{-/-}$ -mus. Goldners trikromfarging av vekstplatene hos WT-mus og ubehandlede og behandlede $\text{Akp2}^{-/-}$ -mus. De proksimale tibiale vekstplatene viste overdreven utvidelse av den hypertrofiske sonen hos både sTNALP-FcD10- og vehikkelinjiserte $\text{Akp2}^{-/-}$ -mus, i

samsvar med tidlig rakitt. Men vekstplatemorfologien virket mindre forstyrret hos dyrene som ble behandlet med sTNALP-FcD10;

Figur 17 viser kortsiktige (15 dager), effektivitetsresultater av lav dose (1 mg/kg), i form av vekstplatehypertrofisk arealstørrelse av behandlede Akp2^{-/-}-mus. Størrelsen på det hypertrofiske området av vekstplaten er uttrykt som en prosentandel av hele vekstplatearealet. Legg merke til normaliseringen av det hypertrofiske arealet hos de behandlede musene;

Figur 18 viser kortsiktige (15 dager), effektivitetsresultater av høy dose (8,2 mg/kg), i form av kroppsvekt i behandlede Akp2^{-/-}-mus. Effekten av sTNALP-FcD10 på kroppsvekt;

Figur 19 viser kortsiktige (15 dager), effektivitetsresultater av høy dose (8,2 mg/kg), i form av lang beinlengde hos behandlede Akp2^{-/-}-mus. Effekt av sTNALP-FcD10 på lårbein- og skinnebeinlengde (målinger gjort på dag 16);

Figur 20 viser kortsiktige (15 dager), effektivitetsresultater av høy dose (8,2 mg/kg), i form av sTNALP-FcD10-serumkonsentrasjon hos behandlede Akp2^{-/-}-mus. sTNALP-FcD10-serumkonsentrasjoner på dag 16 hos mus behandlet i 15 dager med daglige s.c.-injeksjoner på 8,2 mg/kg sTNALP-FcD10;

Figur 21 viser kortsiktige (15 dager), effektivitetsresultater av høy dose (8,2 mg/kg), i form av mineralisering av bein hos behandlede Akp2^{-/-}-mus. Røntgenanalyse av føttene, brystkasse og baklemmene av Akp2^{-/-}-mus (16 dager) og en FaxitronTM-bildefordelingstabell. Føttene og brystkassene ble klassifisert som alvorlige, moderate eller sunne med hensyn til omfanget av beinmineraliseringsdefektene. Bein ble bare klassifisert som unormale (minst én defekt) eller friske (ingen synlig defekt);

Figur 22 viser kortsiktige (15 dager), effektivitetsresultater av høy dose (8,2 mg/kg), i form av defekter i tenner hos behandlede Akp2^{-/-}-mus. Histologisk analyse av tenner hos Akp2^{-/-}-mus injisert vehikkel eller sTNALP-FcD10 og villtypemus. Tynne snitt ble utarbeidet og farget som beskrevet i Millan et al. PDL = peridontalt ligament;

Figur 23 viser langsiktige (52 dager), effektivitetsresultater av høy dose (8,2 mg/kg), i form av overlevelse hos behandlede Akp2^{-/-}-mus. Langsiktig overlevelse av

Akp2^{-/-}-mus behandlet med sTNALP-FcD10 ble sammenlignet med tidlig død hos Akp2^{-/-} som bare var behandlet med kontrollvehikkel;

Figur 24 viser langsiktige (52 dager), effektivitetsresultater av høy dose (8,2 mg/kg), i form av størrelse, mobilitet og utseende hos behandlede Akp2^{-/-}-mus. Behandlingen normaliserer størrelse, mobilitet og utseende hos behandlede Akp2^{-/-}-mus. Ubehandlete mus fra samme kull er vist for sammenligning;

Figur 25 viser langsiktige (52 dager) effektivitetsresultater av høy dose (8,2 mg/kg) i form av mineralisering og beinlengde hos behandlede Akp2^{-/-}-mus. Røntgenbilder av de metatarsale beinene hos 46 og 53 dager gamle behandlede Akp2^{-/-}-mus i sammenligning med WT-mus;

Figur 26 viser langsiktige (52 dager), effektivitetsresultater av høy dose (8,2 mg/kg), i form av sTNALP-FcD10-serumkonsentrasjon hos behandlede Akp2^{-/-}-mus, sTNALP-FcD10-serumkonsentrasjoner på dag 53 hos mus behandlet i 52 dager med daglige s.c.-injeksjoner av 8,2 mg/kg sTNALP-FcD10;

Figur 27 viser A) overlevelseskurvene for Akp2^{-/-}-mus som mottok sTNALP-FcD10 i doser på enten 4,3 mg/kg daglig (Tx-1) eller 15,2 mg/kg hver 3. dag (Tx-3) eller 15,2 mg/kg hver uke (Tx-7), og B) gj. snittlig overlevelsestid for hver av disse regimene. Overlevelse av de behandlede musene ble sammenlignet med overlevelsen av mus injisert med vehikkel;

Figur 28 viser A) overlevelseskurver for Akp2^{-/-}-mus som mottok sTNALP-FcD10 ved doser på 8,2 mg/kg daglig (RTX) med utgangspunkt i dag 15 etter fødselen og B) gjennomsnittlig overlevelse for behandlede og vehikkelinjiserte mus. Overlevelse av de behandlede musene ble sammenlignet med overlevelse av mus injisert med vehikkel (R-vehikkel);

Figur 29 viser effektene på kroppsvekt av daglige 8,2 mg/kg doser av sTNALP-FcD10 injisert til Akp2^{-/-}-mus (RTX) med start på dag 15 etter fødselen. Daglig kroppsvekt ble sammenlignet med vehikkel-injiserte Akp2^{-/-}-mus (R-vehikkel) eller villtypemusekull (WT);

Figur 30 viser en samstilling av forskjellige ALP-er etablert av CLUSTAL™ W (1,82) flersekvenssamstilling, nemlig en TNALP-storfesekvens (SEQ ID NO: 6); en TNALP-kattsekvens (SEQ ID NO: 7), en human TNALP-sekvens (SEQ ID NO: 8), en TNALP-musesekvens (SEQ ID NO: 9), en TNALP-rottesekvens (SEQ ID NO:

10), og en TNALP-delvis hundesekvens (SEQ ID NO: 11), der innholdet av de første 22 aminosyrerestene er ukjent; en human IALP (SEQ ID NO: 12) (tiltredelsesnr.: NP_001622), en human GCALP (SEQ ID NO: 13) (tiltredelsesnr.: P10696), og en human PLALP (SEQ ID NO: 14) (tiltredelsesnr.: NP_112603.). "*" betegner at restene i den kolonnen er identiske i alle sekvenser i samstillingen, ":" betegner at konserverte substitusjoner er blitt observert, og "." betegner at semi-konserverte substitusjoner er blitt observert. En konsensussekvens avledet fra denne samstillingen (SEQ ID NO: 15) er også vist, der x er en hvilken som helst aminosyre;

Figur 31 viser en samstilling av TNALP-er fra forskjellige arter som er fastsatt av CLUSTAL™ W (1.82) flersekvenssammenstilling, nemlig storfesekvensen (SEQ ID NO: 6); kattesekvensen (SEQ ID NO: 7), den humane sekvensen (SEQ ID NO: 8), musesekvensen (SEQ ID NO: 9), rottesekvensen (SEQ ID NO: 10), og en delvis hundesekvens (SEQ ID NO: 11), der innholdet i de første 22 aminosyrerestene er ukjent. "*" betegner at restene i den kolonnen er identiske i alle sekvenser av samstillingen, ":" betegner at konserverte substitusjoner er blitt observert, og "." betegner at semi-konserverte substitusjoner er blitt observert. En konsensussekvens avledet fra denne samstillingen (SEQ ID NO: 16) er også vist, der x er en hvilken som helst aminosyre; og

figur 32 viser nukleinsyresekvensen (SEQ ID NO: 17) som koder for polypeptid-sekvensen beskrevet i figur 1.

BESKRIVELSE AV ILLUSTRERENDE UTFØRELSESFORMER

[0086] Eksemplene nedenfor viser den første vellykkede behandlingen av TNALP-knockout-mus (Akp2^{-/-}) ved hjelp av subkutane injeksjoner av en rekombinant form av ALP. Akp2^{-/-}-mus rekapitulerer den alvorlige, ofte dødelige, infantile formen av hypofosfatasi.

[0087] Den godt beskrevne TNSALP-homozygote nullmusemodellen som speiler mange av de skjelett- og biokjemiske abnormitetene forbundet med infantil HPP ble anvendt. Musene ble behandlet med en ny løselig rekombinant form av human TNSALP spleiset i karboksyenden slik at den inneholdt både et avstandsstykke i form av krystallinsk fragment-området (Fc) av human IgG-1 fusjonert til en beinsøkende sekvens sammensatt av ti sekvensielle asparaginsyre-(D10)-rester. Det ble vist at i forhold til opprinnelig TNSALP rensset fra nyrene, binder den modifiserte rekombinante formen av enzymet hydroksyapatitt langt mer reaksjonsvillig og beholder samtidig sin enzymatiske aktivitet. Behandling med det rekombinante TNSALP-et ifølge foreliggende oppfinnelse normaliserte overraskende plasma-PPi-

nivåer, og forbedret mineralisering av føttene, brystet, baklemmene og tannsettene til homozygote nullmus sammenlignet med mus som mottok vehikkelen alene.

Behandlingen ble også vist å forlenge overlevelsen, med nær radiografisk normalisering av skjelettfenotypen.

5 **[0088]** I tillegg til dens fordelaktige *in vivo*-terapeutiske effekt, ble det overraskende oppdaget at den rekombinant aktive formen av det modifiserte enzymet som inneholder et avstandsstykke uttrykkes på høyere nivåer enn sitt rekombinante motstykke som mangler et slikt avstandsstykke. I tillegg ble det vist at enzymet fungerer som en tetramer.

10 **[0089]** Foreliggende oppfinnelse er vist mer detaljert i de følgende ikke-begrensende eksemplene.

EKSEMPEL 1

Uttrykking og rensing av rekombinant sTNALP-FcD10

15 **[0090]** For å lette uttrykking og rensing av rekombinant TNALP, ble den hydrofobe C-terminalsekvensen som angir GPI-ankerfeste i TNALP eliminert for å gjøre det til et løselig utskilt enzym (Di Mauro et al. 2002). Den kodende sekvensen til TNALP-ektodomenet ble også utvidet med Fc-området til humant IgG (y1 form (IgG1), Swiss-Prot P01857). Dette tillot hurtig rensing av det rekombinante enzymet på protein-A-kromatografi og overraskende, dets økte uttrykking. Videre, for å rette det rekombinante TNALP-et til beinvev, ble en deka-aspartat (D10)-sekvens festet til C-enden i Fc-området. Denne kimære formen av TNALP, betegnet sTNALP-FcD10, beholder fullstendig enzymatisk aktivitet både når den analyseres ved pH 9,8 ved hjelp av det kunstige substratet p-nitrofenylfosfat, og når den analyseres ved pH 7,4 ved
20 hjelp av uorganisk pyrofosfat (PPi), som det fysiologiske substratet. Som i den naturlige forekommende formen av TNALP spaltes signalpeptidet i N-enden av under den kotranslasjonale translokasjonen av proteinet over det granulerte endoplasmatiske retikulumet. Dens utforming og struktur er vist skjematisk i figur 1. Aminosyresekvensen til fusjonsproteinet (inkludert signalpeptidet) er vist i figur 2. Aminosyresekvensen til fusjonsproteinet som utskilles (dvs. uten signalpeptidet) er vist i figur 3.
25

30 **[0091]** Fremgangsmåten som ble anvendt til å konstruere dette fusjonsproteinet er som følger. cDNA-et som koder for fusjonsproteinet (se figur 32) ble satt inn i PIREs-vektoren (ClontechTM) i det første flerkloningssettet som er lokalisert oppstrøms for IRES-en ved hjelp av NheI- og BamHI-endonukleaserestriksjonsseter. Dihydrofolatreduktase-(DHFR)-genet ble satt inn i det andre flerkloningssettet lokalisert nedstrøms for IRES-en ved hjelp av SmaI- og XbaI-endonukleaserestriksjonssetene. Den resulterende vektoren ble transfektert inn i kinesiske hamsterovarieceller (CHO-DG44-celler) som manglet begge DHFR-genallelene (Urlaub et al. 1983, oppnådd fra Dr. Lawrence A. Chasin, Columbia University) ved hjelp av
35

Lipofectamine™-transfeksjonssettet (Invitrogen). To dager etter transfeksjon ble mediet forandret og cellene ble opprettholdt i et nukleotidfritt medium (IMDM supplert med 5 % dialysert FBS) i 15 dager for å isolere stabile transfektanter for plakkkloning.

[0092] Cellene fra de tre beste klonene eller fem opprinnelig valgte som vokser i det nukleotidfrie mediet ble samlet og dyrket videre i medium (IMDM + 5 % dialysert FBS) som inneholdt økende konsentrasjon av metotreksat (MTX). Kulturer som er resistente mot 50 nM MTX ble ytterligere ekspandert i Cellstacks™ (Corning) som inneholdt IMDM-medium supplert med 5 % FBS. Når man nådde konfluensen ble cellelaget rensert med fosfatbufret saltløsning (PBS), og cellene ble inkubert i ytterligere tre dager med IMDM som inneholdt 3,5 mM natriumbutyrat for å øke proteinuttrykking. Ved slutten av kulturen var konsentrasjonen av sTNALP-FcD10 i det anvendte mediet 3,5 mg/l, analysert ved å måle TNALP-enzymatisk aktivitet.

[0093] sALP-FcD10-nivåene i anvendt medium ble kvantifisert ved hjelp av en kolorimetrisk analyse for ALP-aktivitet der absorbansen av frigjort p-nitrofenol er proporsjonal med reaksjonsproduktene. Reaksjonen forekom i 100 µl ALP-buffer (20 mM Bis Tris propan (HCl), pH 9, 50 mM NaCl, 0,5 mM MgCl₂ og 50 µM ZnCl₂) som inneholdt 10 µl fortynnet anvendt medium, og 1 mM pNPP. Den sistnevnte forbindelsen ble tilsatt sist for å initiere reaksjonen. Absorbansen ble registrert ved 405 nm hvert 45. sekund i løpet av 20 minutter ved hjelp av en spektrofotometrisk plateleser. Katalytisk sTNALP-FcD10-aktivitet, uttrykt som utgangshastighet, ble analysert ved å tilpasse det bratteste stigningstallet for 8 sekvensielle verdier.

Standardene ble utarbeidet med varierende konsentrasjoner av sALP-FcD10, og ALP-aktivitet ble bestemt som ovenfor. Standardkurven ble generert ved å plote log for utgangshastigheten som en funksjon av log av standard konsentrasjonene. sTNALP-FcD10-konsentrasjonen i de forskjellige prøvene ble lest fra standardkurven ved hjelp av deres respektive ALP-absorbans. Aktivitetsmålinger ble omgjort til konsentrasjoner av sALP-FcD10 ved hjelp av en kalibreringskurve oppnådd ved å plote aktiviteten av kjente konsentrasjoner av rensert rekombinant enzym.

[0094] Kultursupernatanten ble så konsentrert og dialysert mot PBS ved hjelp av tangensiell strømningsfiltrering og lastet på MabSelect SuRe™-kolonne (GE Health Care) balansert med 150 mM NaCl, 10 mM natrium-PO₄. Bundne proteiner ble eluert med 50 mM Tris pH 11, pH 11,0 buffer. Oppsamlede fraksjoner ble justert til pH 8-9 med 200 mM Tris-HCl pH 5,5. Fraksjoner som inneholdt det meste av det eluerte materialet ble dialysert mot 150 mM NaCl, 25 mM natrium-PO₄ pH 7,4-buffer som inneholdt 0,1 mM MgCl₂, 20 µM ZnCl₂ og filtrert på en 0,22 µm (Millipore, Millex-GP™) membran under sterile forhold. Det totale utbyttet av renseprosedyren var 50 % med en renhet over 95 %, som bedømt ved Sypro™-rubinfarget SOS-PAGE. Renset sTNALP-FcD10-preparat ble lagret ved 4 °C og holdt seg stabil i flere måneder.

[0095] Den neste rensemetoden ble også testet med hell. Kultursupernatanten ble

konsentrert og dialysert mot PBS ved hjelp av tangentialfiltrering og eluert på Protein A-Sepharose™-kolonne (Hi-Trap™ 5 ml, GE Health Care) balansert med PBS.

Bundne proteiner ble eluert med 100 mM pH 4,0 sitratbuffer. De oppsamlede fraksjonene ble umiddelbart justert til pH 7,5 med 1 M Tris pH 9,0. Fraksjonene som inneholdt mesteparten av det eluerte materialet ble dialysert mot 150 mM NaCl, 25 mM pH 7,4 natrium PO₄-buffer som inneholdt 0,1 mM MgCl₂, 20 µM ZnCl₂ og filtrert på en 0,22 µm (Millipore, Millex-GP™) membran under sterile forhold. Det totale utbyttet av renseprosedyren var 50 % med en renhet over 95 %, som bedømt ved Sypro™ rubinfarget SDS-PAGE. Renset sTNALP-FcD10-preparat ble lagret ved 4 °C og holdt seg stabil i flere måneder.

[0096] Antall kopier av sTNALP-FcD10-genet ble økt ved å dyrke transfekterte CHO-DG44194-celler i nærvær av økende konsentrasjon av metotreksat. Kloner av celler som er resistente mot 100 nM metotreksat ble isolert og undersøkt for deres evne til å produsere sTNALP-FcD10 i et høyt utbytte. De beste produsentene ble tilpasset kulturen i suspensjon i Hyclone media™ SFM4CHO™ (kat.# SH30549) i fravær av føtalt storfeserum. Kulturer som opprettholdt et høyt produksjonsutbytte under disse forholdene ble overført til disponible Wave™-bioreaktorposere. Mediet (25 l totalvolum) ble utsådd i en tetthet på $0,4 \times 10^6$ celler per ml. Temperaturen i kulturen ble opprettholdt ved 37 °C inntil celledettheten nådde 2×10^6 celler/ml. Temperaturen ble deretter redusert til 30 °C, og kulturen ble tilsatt 125 ml CHO generisk føde (Sigma, C1615). Disse forholdene ble funnet å sinke celledelingen og øke produktutskillelsen i dyrkingsmediet. Disse forholdene ble opprettholdt i 6 dager før man høstet cellekultur-supernatanten som inneholdt utskilt sTNALP-FcD10.

EKSEMPEL 2

Sammenligning av uttrykkingen mellom sTNALP-D10 og sTNALP-FcD10

[0097] Plasmidvektorene som kodet for enten sTNALP-FcD10 eller sTNALP-D10 ble transfektert i CHO-DG44-celler ved hjelp av Lipofectamine™ og dyrket i selektivt medium (dvs. blottet for nukleotider) utformet for å fremme overlevelsen av celler som uttrykker DHFR-genet som beskrevet i eksempel 1 ovenfor. De stabile transfektantene ble isolert ved plakkkloning og rangert ifølge deres nivå av proteinuttrykking ved anvendelse av den alkaliske fosfataseenzymatiske analysen også beskrevet i eksempel 1 ovenfor. Screening tillot identifikasjon av en klon bare for sTNALP-D10 (0,120 pg/celle/dag) og fem kloner for sTNALP-FcD10 (0,377, 0,258, 0,203, 0,099 og 0,088 pg/celle/dag). Metotreksat (MTX)-genamplifisering ble utført som beskrevet i eksempel 1 ovenfor (MTX som strekker seg fra 0 til 100 mM), og tillot en 8 gangers økning i uttrykking av sTNALP-FcD10 mens ingen amplifikasjon ble observert med sTNALP-D10-kulturene (se figur 4). Ved hjelp av en lignende prosess

for cellelinjeutviklingen ble det uventet funnet at sTNALP-FcD10-proteinet var lettere å uttrykke i forhold til sTNALP-D10 (se figur 4).

EKSEMPEL 3

sTNALP-FcD10-karakterisering

[0098] sTNALP-FcD10 ble først rensset på protein-A-Sepharose™, og analysert på SDS-PAGE under reduserende og ikke-reduserende forhold.

[0099] Under reduserende forhold migrerte det som et bredt bånd med en tilsynelatende molekylvekt på - 90 000 Da (DTT+ i figur 5). Fordøyelse med peptid-N-glykosidase F (PNGase F) reduserte den tilsynelatende molekylmassen av proteinet til ca. 80 000 som tett tilnærmer den beregnede massen av 80 500 Da for den ikke-glykosylerte sTNALP-FcD10-monomeren vist i figur 1. Løselig TNALP i serum, som TNALP til stede som et GPI-forankret protein i den ytre overflaten av osteoblaster, er et sterkt glykosylert protein med karbohydrater omfattende ≤ 20 % av den totale massen av enzymet (Farley & Magnusson 2005). Selv om de spesifikke karbohydrat-strukturene på TNALP ikke er blitt identifisert, indikerer sekvensstudier at enzymet har fem antatte seter for N-bundet glykosylering, og biokjemiske studier har vist tegn på både N- og O-bundne karbohydrater (Nosjean et al. 1997). Etter avtale med disse tidligere observasjonene antyder den elektroforetiske migrasjonen av sTNALP-FcD10 og dens følsomhet for PNGase F at det også er et tungt N-glykosylert protein. Løselig TNALP i serum, som TNALP til stede som et GPI-forankret protein på den ytre overflaten av osteoblaster, er et sterkt glykosylert protein med karbohydrater omfattende ≤ 20 % av den totale massen av enzymet (Farley & Magnusson 2005).

[0100] Når SDS-PAGE ble gjentatt under ikke-reduserende betingelser viste den tilsynelatende molekylmassen av sTNALP-FcD10 seg å være 200 000 (DTT- i figur 5) konsistent med den til en homodimer som iativ uforandret TNALP (Millán 2006). Denne homodimeren er sannsynligvis resultatet av dannelsen av de to disulfidbroene mellom de to monomere Fc-områdene (den øvre høyre ruten, figur 5).

[0101] Den molekylære massen av rensset sTNALP-FcD10 under native forhold ble evaluert ved hjelp av størrelseseksklusjons-FPLC-kromatografi på en kolonne av Sephacryl™ S-300 (GE Health Care) balansert i 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5-buffer. Kolonnen var tidligere kalibrert med et standard proteinsett (HMW-kalibreringssett, GE Health care) (ruten nederst til venstre, figur 5).

[0102] De samlede kromatografiske fraksjonene ble analysert for alkalisk fosfataseenzymatisk aktivitet, og materialet i hver topp. Overraskende eluerte 78 % av materialet ved en posisjon tilsvarende proteinene av 370 kDa (nedre venstre rute, figur 5) som tyder på en tetramer form for det native sTNALP-FcD10-rekombinante enzymet som produseres i CHO-celler. Når fraksjoner fra Sephacryl S-300-kolonnen ble testet for aktivitet, ble all den enzymatiske aktiviteten knyttet til 370 kDa

fraksjonen. Det gjenværende materialet var av en mye høyere molekylvekt som indikerer dannelsen av noen sTNALP-FcD10-aggregater. Begge de tetramere formene, som kanskje ikke observeres i SDS-page, fordi den sistnevnte ødelegger den ikke-kovalente bindingen som holder tetrameren sammen, og aggregatformer ble løst som sTNALP-FcD10-monomerer med en tilsynelatende molekylvekt på 90 000 ved SDS-PAGE under reduserende forhold (DTT+, nedre, høyre rute i figur 5) og som dimerer med en tilsynelatende molekylvekt på 200 000 under ikke-reduserende forhold (DTT-, nedre, høyre rute i figur 5). Rekombinant sTNALP-FcD10 synes å bestå i det vesentlige av enzymatisk funksjonelle homotetramerer dannet av ikke-kovalent forbindelse mellom to sTNALP-FcD10-disulfid-bundede dimerer.

[0103] Den tetrameriske strukturen av sTNALP-FcD10 ble ytterligere testet ved begrenset papainfordøyelse (figur 6-8). Denne proteasen er kjent for å spalte IgG-tungkjeder nær hengselområdet og på N-endesiden av disulfidbindingene, og dermed generere hele monomere Fab-fragmenter og dimere disulfidbundne Fc-dimerer. Fordøyelse av sTNALP-FcD10 bør dermed frigjøre enzymatisk aktive sTNALP-dimerer fra de intakte Fc-domenene (se figur 6).

[0104] Porsjoner som inneholdt 400 µg sTNALP-FcD10 ble digerert med 208 mU papain-agarose (Sigma) i en 20 µM fosfatbuffer (pH 7,0) som inneholdt 250 µM ditiotreitol. Digereringen ble fortsatt ved 37 °C i 1 time under forsiktig omrøring. Reaksjonen ble stoppet ved å fjerne papain-agarosekulene ved sentrifugering. Under disse forholdene var det intet signifikant tap av sTNALP-FcD10 enzymatisk aktivitet under de første 4 timene av inkuberingen. sTNALP-FcD10 inkuberte i en time i nærvær eller fravær av papain-agarose og ble deretter analysert ved SEC-HPLC på en TSK-Gel G3000WXL (Tosoh Bioscience) i ikke-denaturerende forhold.

[0105] Figur 7 viser at hovedproduktet som eluerer med en tilsynelatende M_r på 370 kDa ikke lenger kunne observeres etter 1 times papainfordøyelse. Under disse forholdene genererer papainfordøyelsen to hovedfragmenter av henholdsvis 135 kDa og 62 kDa. En mindre topp med M_r på 35 kDa ble også observert.

[0106] Under reduserende SDS-PAGE-forhold (DTT+, figur 8) ble produktet fra den ikke papain-behandlede prøven løst i et stort bånd (102 kDa) (DTT+, papain-), som tidligere ble vist å tilsvare monomerisk sTNALP-FcD10. I Western-blott kunne dette båndet faktisk farges med antistoffer til både TNALP- og Fc-domenet av IgG₁-molekylet (ikke vist). Etter papainfordøyelse spaltes dette båndet inn i to store fragmenter: 1) 32 kDa-båndet, som binder anti-Fc-antistoffet, men ikke anti-TNALP-antistoffet og er foreslått å tilsvare FcD10-fragmentet; og 2) det brede og diffuse proteinbåndet (66 - 90 kDa), som kan farges med anti-ALP-antistoffet, men ikke med anti-Fc-antistoffet og er således antatt å tilsvare TNALP-ektodomenemonomerer. Heterogeniteten til dette materialet er antakelig på grunn av dets glykosylering siden det kan reduseres ved fordøying med peptid-N-glykosidase F, noe som også reduserer

dens tilsynelatende molekylmasse til 52 kDa (resultater ikke vist).

[0107] Under ikke-reduserende forhold (DTT-, figur 8), ble sTNALP-FcD10 uten papain funnet å migrere i SDS-Page som et 216 kDa protein (DTT-, papain-, figur 8). Western blott viser også at dette proteinet inneholder epitoper til både TNALP- og Fc-delene (resultater ikke vist). Disse molekylære artene ble tidligere foreslått å bestå av disulfidbundede sTNALP-FcD10-dimerer. Som under reduserende forhold danner papainspalting under ikke-reduserende forhold (DTT-, papain +) to hovedfragmenter. I Western-blott kan 55 kDa-fragmentet farges med anti-Fc-antistoffet, men ikke med anti-TNALP-antistoffet. Dette fragmentet er sannsynligvis identisk med 62 kDa-artene observert på SEC-HPLC under native forhold, og er foreslått å tilsvare disulfidbundne Fc-dimerer. De andre store artene komigrerer med hovedproteinbåndet (66-90 kDa) observert under reduserende forhold. Dette er forenlig med at det er sammensatt av TNALP-ektodomenemonomerene. Når de analyseres ved HPLC i ikke-denaturerende forhold er disse monomerene ikke-kovalent bundet i de enzymatisk aktive TNALP-dimerene som eluerte fra SEC-kolonnen som 135 kDa-artene.

EKSEMPEL 4

Affinitetssammenligning mellom hydroksyapatitt av sTNALP-FcD10-protein og storfenyre-sALP

[0108] Affiniteten til det rensede sTNALP-FcD10-proteinet for hydroksyapatitt ble også sammenlignet med storfenyre (vevsuspesifikk) løselig alkalisk fosfatase (Calzyme) ved hjelp av følgende prosedyre. Storfenyre-TNALP ble anvendt i stedet for humanbein-TNALP fordi det var kommersielt tilgjengelig. Hydroksyapatittkeramiske kuler (BioRad) ble først løseliggjort i 1 M HCl og mineralet ble utfelt ved å bringe løsningen tilbake til pH-verdi 7,4 med 10 N NaOH. Binding til dette rekonstituerte mineralet ble utført ved å inkubere aliquoter av mineralsuspensjonen som inneholdt 750 µg mineral med 5 µg protein i 100 µl 150 mM NaCl, 80 mM natriumfosfat pH 7,4, buffer. Prøvene ble holdt ved 21 ± 2 °C i 30 minutter på et roterende hjul. Mineral ble spunnet ned ved lavhastighetssentrifugering og total enzymatisk aktivitet gjenvunnet i både mineralpelletten og supernatanten ble målt. Figur 9 viser tydelig at sTNALP-FcD10 binder mer effektivt til rekonstituert hydroksyapatittmineral enn storfenyre-TNALP. Videre ble mesteparten av det rekombinante sTNALP-FcD10-proteinet innført i analysen utvunnet ved å summere opp den enzymatiske aktiviteten gjenvunnet i både de bundne og ikke-bundne fraksjonene. Dette viser at binding av det rekombinante proteinet til den rekonstituerte mineralfasen ikke vesentlig endrer dets enzymatiske aktivitet.

EKSEMPEL 5

Musemodell

[0109] Akp2^{-/-}-musene ble opprettet ved å sette inn Neo-kassetten i ekson VI av muse-TNALP-genet (Akp2) via homolog rekombinasjon (Narisawa et al. 1997; Fedde et al. 1999). Denne mutasjonen forårsaket den funksjonelle inaktiveringen av Akp2-genet og intet mRNA- eller TNALP-protein er påviselige i slike knockoutmus
 5 (Narisawa et al. 1997). Fenotypisk etterligner Akp2^{-/-}-musene alvorlig infantil HPP. Disse musene har ingen åpenbar hypofosfatasifenotype ved fødselen, skjelettmanglene viser seg vanligvis på eller rundt dag 6, og forverres etterpå. De har stuntet vekst med rakitt, utvikler epileptiske anfall og apné, og ble rapportert å dø mellom de 12-16 første dagene etter fødselen. Som HPP-pasienter har Akp2^{-/-}-mus hypofosfatasemi på grunn
 10 av global mangel på TNALP-aktivitet, endogen opphopning av ALP-substratene, PPI, PLP og PEA og lider av svekket skjelettmatrixmineralisering som fører til rakitt eller osteomalasi (Fedde et al. 1999.).

[0110] For å forstå hvordan defekter i alkalisk fosfatase kan føre til nevrologiske manifestasjoner av sykdommen hos både mennesker og mus, må man gjennomgå
 15 rollen og stoffskiftet av vitamin B6 i sentralnervesystemet. Vitamin B6 er et viktig næringsstoff som fungerer som en kofaktor for minst 110 enzymer, inkludert de som er involvert i biosyntesen av nevrotransmitterne γ -aminosmørsyre (GABA), dopamin og serotonin. Vitamin B6 kan finnes i tre frie former (eller vitaminer), dvs. pyridoksal (PL), pyridoksamin (PM), og pyridoksin (PN), som alle kan bli fosforlyert til de
 20 tilsvarende 5'-fosfaterte derivatene, PLP, PMP og PNP (Jansonius 1998). Fjerning av fosfatgruppen er en funksjon av ALP og primært den til TNALP-isozymer (Whyte 2001). Siden bare defosforlyerte vitamener kan transporteres inn i cellene, fører senket TNALP-aktivitet i hypofosfatasemi til markerte økninger i plasma PLP (Whyte et al. 1985; Whyte 2001) og intracellulær mangel på PLP i perifere vev og i sentralnervesystemet der det fører til reduserte hjernenivåer av GABA. Det er også blitt antatt at
 25 disse epileptiske anfallene som observeres i disse musene er resultat av glutaminsyre-dekarboksylasedysfunksjon på grunn av mangel på PLP (Waymire et al. 1995).

[0111] Pyridoksinsupplement undertrykker de epileptiske anfallene til Akp2^{-/-}-musene, men forlenger deres levetid med bare noen få dager, til de 18-22 første dagene
 30 etter (Narisawa et al. 2001.). Derfor fikk alle dyrene i denne studien (avlsmus, ammende mødre, unger og nyavvente) fri tilgang til et modifisert laboratoriumgnagerkosthold 5001 med økte nivåer (325 ppm) av pyridoksin.

[0112] Akp2^{-/-}-mus (12,5 % C57BU6 - 87,5 % 129J hybrid bakgrunn) ble opprettholdt ved heterozygot avling. Dyr, avlspar eller ammende mødre med sine
 35 unger, ble plassert i et ventilert plastbur med fast bunn utstyrt med et automatisk vanningsystem. Alle dyrene hadde fri tilgang til et modifisert laboratoriumgnagerkosthold 5001 med 325 ppm pyridoksin (#48057, TestDiet™). Maksimalt tillatte konsentrasjoner av kontaminanter i kosten (f.eks. tungmetaller, aflatoksin, organofosfat, klorerte hydrokarboner, PCB-er) ble forsikret av produsentene. Ingen

kjente kontaminanter var til stede i kostholdsmaterialet for å påvirke giftigheten av testartikkelen.

EKSEMPEL 6

Farmakokinetikk og vevsfordeling av injisert sTNALP-FcD10 hos WT-mus **Blodprøvetaking**

[0113] Blodprøver ble oppsamlet i heparinlitiumrør (VWR, #CBD365958), og satt på is i høyst 20 minutter før sentrifugering ved 2500g i 10 min ved romtemperatur. Minst 15 µl av plasmaet ble overført til 0,5 ml rør (Sarstedt, #72.699), frosset i flytende nitrogen og oppbevart ved -80 °C inntil analyser. Om tilgjengelig ble ytterligere ≤ 50 µl av plasmaet overført til 0,5 ml rør, inaktivert ved 65 °C i 10 minutter, frosset i flytende nitrogen og oppbevart ved -80 °C inntil de ble analysert. Eventuelt gjenværende plasma ble slått sammen med 15 µl alikvoten, frosset i flytende nitrogen og oppbevart ved -80 °C inntil analyse.

Bestemmelse av plasma sTNALP-FcD10

[0114] Nærvær av sTNALP-FcD10 i plasmaprøver ble analysert etter behandlingen ved hjelp av en kolorimetrisk enzymatisk analyse. Enzymatisk aktivitet ble bestemt ved hjelp av et kromogent substrat, der økningen av absorbans er proporsjonal med substratombdanning til produkter. Reaksjonen ble utført i 100 µl buffer, 50 mM NaCl, 20 mM Bis Tris propan (HCl), pH 9 buffer som inneholder 0,5 mM MgCl₂ og 50 µM ZnCl₂ og til dette ble det tilsatt 10 µl fortynnet plasmaprøve. ALP-substratet p-nitrofenyl ble tilsatt sist ved en sluttkonsentrasjon på 1 mM for å initiere reaksjonen. Absorbansen ble registrert ved 405 nm hvert 45 sekund i løpet av en tjue minutters periode ved hjelp av en Spectramax™ 190 (molekylære enheter) plateleser. sTNALP-FcD10 enzymatisk aktivitet uttrykt som en initiell reaksjonshastighet ble bestemt ved å tilpasse det bratteste stigningstallet over 8 tilstøtende leseverdier. Standarder ble fremstilt med varierende konsentrasjoner av testartikkelen, og den enzymatiske aktiviteten ble bestemt som beskrevet ovenfor i eksempel 1. Standardkurven ble generert ved å plote log av innledende hastighet som en funksjon av log for standard mengdene. sTNALP-FcD10-konsentrasjonen av de forskjellige plasmaprøvene ble avlest direkte fra standardkurven ved hjelp av deres respektive enzymatiske aktivitet.

Bestemmelse av plasma-PPi

[0115] Sirkulerende nivåer av PPi ble målt i serum oppnådd fra hjertepunktur ved hjelp av differensiell adsorpsjon på aktivt trekull av UDP-D-[6-³H]glukose (Amersham Pharmacia) fra reaksjonsproduktet av 6-fosfo[6-³H]glukonat, som tidligere beskrevet (Johnson et al. 1999).

Halveringstid og vevsfordeling av sTNALP-FcD10

[0116] I voksne WT-mus ble halveringstiden og vevsfordelingen av sTNALP-FcD10 injisert i mus bestemt. Figur 10 oppsummerer sin farmakokinetikk- og vevsfordeling etter en enkelt bolus-intravenøs injeksjon på 5 mg/kg i voksne WT-mus.

[0117] Halveringstiden var 34 timer i blod med en akkumulering av [¹²⁵I]-merket sTNALP-FcD10 i bein på opptil 1 µg/g bein (våtvekt). Denne halveringstiden er sammenlignbar med den som ble observert tidligere i mislykkede rapporterte kliniske studier. Nivåene av beinsøkende materiale virket ganske stabile, ettersom ingen signifikant reduksjon i radioaktivt merket sTNALP-FcD10 ble observert under forsøket. Ingen akkumulering av sTNALP-FcD10 ble observert i muskel, ettersom mengden radioaktivt merket enzym i vevet minket parallelt med det til sTNALP-FcD10-enzymatisk aktivitet i blodet.

[0118] I nyfødte mus. Fordi Akp2^{-/-}-mus dør mellom dagene 12-16 og i.v.-injeksjon ikke er gjennomførbart i slike små mus, ble den farmakokinetiske analysen av sTNALP-FcD10 i serum gjentatt ved hjelp av i.p.- og s.c.-veier i WT-nyfødte mus ved hjelp av en dose på 3,7 mg/kg. i.p.-veien ble funnet utilstrekkelig på grunn av det høye trykket i bukhulen som fører til uforutsigbare tap gjennom injeksjonssetet (figur 11 A). s.c.-veien var mer reproducerbar i nyfødte mus, som vist i PK-forsøket i figur 11B. De farmakokinetiske parameterne for sTNALP-FcD10 hos nyfødte og voksne mus er rapportert i tabell 2 nedenfor.

[0119]

Tabell 2: Farmakokinetiske parametere for sTNALP-FcD10 hos nyfødte WT-mus.

Parameter	Nyfødt	
	s.c.	i.p.
T1/2 (t)	31	19
Tmaks (t)	6	6
Cmaks (mg/l)	5	3
AUCinf (mg/l/t)	257	92

[0120] Disse PK-dataene, analysert av WinNonlinTM-programvaren (Pharsight Corporation, Mountain View, CA), ble anvendt til å forutsi sirkulerende blodnivåer av sTNALP-FcD10 oppnådd etter gjentatte daglige s.c.-injeksjoner. Sirkulerende sTNALP-FcD10 nådde stabile tilstandsserumkonsentrasjoner som oscillerte mellom Cmin- og Cmaks-verdier på henholdsvis 26,4 og 36,6 µg/ml (figur 12). Stabil tilstand ble oppnådd etter 5 til 6 daglige doser på 10 mg/kg.

[0121] Forutsigelsesvaliditet ble testet eksperimentelt etter 5 daglige injeksjoner på 10 mg/kg av sTNALP-FcD10. På injeksjonsdagen kunne man ikke skjelne musenes genotype. Av de testede musene ble det senere fastslått hvilke som var heterozygote eller homozygote. Det var ingen forskjell i oppførselen til alle de forskjellige genotypene. Når sirkulerende ALP-aktivitet ble målt 24 timer etter den siste injeksjonen, nemlig på dag 6, (Cmin) ble det observert god overensstemmelse mellom eksperimentelle og forutsagte konsentrasjoner (figur 13). I disse ikke-behandlede 5 dagers gamle dyrene var serum-TNALP-nivåene 0,58 µg/ml. Disse nivåene vil avta med alderen. Dermed ble det beregnet at injeksjonsregimet tillot å bygge seg opptil stabile tilstandsserumkonsentrasjoner av sTNALP-FcD10 ca. 50 ganger høyere enn normale TNALP-konsentrasjoner.

Eksempel 7

Konsentrasjon av sTNALP-FcD10 hos voksne WT-musebein etter bolus-intravenøs administrering

[0122] En 5 mg/kg sTNALP-FcD10-dose ble administrert i.v. i 129J-voksne WT-mus. sTNALP-FcD10-konsentrasjonen i bein ved t = 25 timer var som følger: 0,64 µg/g calvaria (taket i hjerneskallen); 1,33 µg/g skinnebeinene (eng.: tibias); og 1,37 µg/g lårbeinene, for en gjennomsnittlig konsentrasjon på 1,11 µg/g. Hos rotter representerer beinvev 16,3 % av den totale massen. Det er forventet at denne prosentandelen også finnes hos mus. Kroppsvekten til musene som ble anvendt i dette forsøket var 18,4 g. Den beregnede beinvevvekten til disse musene var således omtrent $18,4 \text{ g} \times 0,163 = 3,00 \text{ g}$. Beregnet mengde sTNALP-FcD10 i beinvev var på 3,33 µg. Prosentandelen av den injiserte dosen i beinvev var således på $(3,33 \text{ µg} / (5 \text{ µg/g} \times 18,4 \text{ g})) \times 100 = 4 \text{ \%}$.

[0123] sTNALP-FcD10-konsentrasjonen i bein ved t = 96 timer var som følger: 0,83 µg/g calvaria; 1,33 µg/g skinnebein og 1,63 µg/g lårbein, for en gjennomsnittlig konsentrasjon på 11,26 µg/g. Kroppsvekten til musene anvendt i dette forsøket var 17,8 g. Den beregnede beinvevvekten til disse musene var således omtrent $17,8 \text{ g} \times 0,163 = 2,90 \text{ g}$. Mengden sTNALP-FcD10 i musebeinvev var dermed omtrent 3,66 µg. Prosentandelen av den injiserte dosen i beinvev var dermed på $(3,66 \text{ µg} / (5 \text{ µg/g} \times 17,8 \text{ g})) \times 100 = 4 \text{ \%}$.

Eksempel 8

Konsentrasjon av sTNALP-FcD10 i nyfødte WT-musebein etter 15 dagers subkutan bolusinjeksjon

[0124] En 4,3 mg/kg sTNALP-FcD10 dose ble administrert subkutan i 129J nyfødte WT-mus hver dag i 15 dager i en total administrert mengde av 65 mg/kg.

sTNALP-FcD10-konsentrasjonen i bein ved $t = 24$ timer var som følger: 6,45 $\mu\text{g/g}$ calvaria; 3,05 $\mu\text{g/g}$ skinnebein; og 3,71 $\mu\text{g/g}$ lårbein, for en gjennomsnittlig konsentrasjon på 4,40 $\mu\text{g/g}$. Kroppsvekten til musene som ble anvendt i dette forsøket var 9,83 g. Den beregnede beinvevsvekten til disse musene var dermed omtrent $9,83 \text{ g} \times 0,163 = 1,60 \text{ g}$. Mengden av sTNALP-FcD10 i musebeinvev på den tiden var dermed omtrent 7,04 μg . Prosentandelen av den injiserte dosen i beinvevet var dermed på $(7,04 \mu\text{g} / (65 \mu\text{g/g} \times 9,83 \text{g})) \times 100 = 1 \%$.

[0125] sTNALP-FcD10-konsentrasjonen i bein ved $T = 168$ timer var som følger: 5,33 $\mu\text{g/g}$ calvaria; 1,37 $\mu\text{g/g}$ skinnebein; og 1,88 $\mu\text{g/g}$ lårbein, for en gjennomsnittlig konsentrasjon på 2,86 $\mu\text{g/g}$. Kroppsvekten til musene som ble anvendt i dette forsøket var 14,0 g. Den beregnede beinvevsvekten til disse musene var dermed omtrent $14,0 \text{ g} \times 0,163 = 2,28 \text{ g}$. Mengden av sTNALP-FcD10 i musebeinvev på den tiden var dermed omtrent 6,52 μg . Prosentandelen av den injiserte dosen i beinvevet var dermed på $(6,52 \mu\text{g} / (65 \mu\text{g/g} \times 14 \text{ g})) \times 100 = 0,7 \%$. Tabell 3 nedenfor oppsummerer resultatene fra eksemplene 7 og 8.

[0126]

Tabell 3: Gjennomsnittlig konsentrasjon av sTNALP-FcD10 og prosentvis injisert dose i bein

Forsøk	Injeksjonsregime	Gjennomsnittlig konsentrasjon i bein ($\mu\text{g/g}$ vått vev)		% injisert dose i bein	
IV-bolus	1 x 5 mg/kg (bolus)	$T = 25 \text{ t}^{(1)}$	$= 96 \text{ t}^{(1)}$	$T = 25 \text{ t}^{(1)}$	$T = 96 \text{ t}^{(1)}$
		1,11	1,26	4 %	4 %
SC-bolus over 15 dager	15 x 4,3 mg/kg (daglig)	$T = 24 \text{ t}^{(1)}$	$T = 168 \text{ t}^{(1)}$	$T = 24 \text{ t}^{(1)}$	$T = 168 \text{ t}^{(1)}$
		4,40	2,86	1 %	0,7 %

⁽¹⁾Indikerte tidspunkt er fra den siste injeksjonen.

EKSEMPEL 9

Korttids (15 dager) effekten av lave doser (1 mg/kg) av sTNALP-FcD10 for HPP hos AKP^{-/-}-mus

[0127] Daglig s.c.-injeksjon av sTNALP-FcD₁₀ ble utført i 15 dager i Akp2^{-/-}-mus ved anvendelse av mg/kg. Behandlingsgruppene ble konstituert fra 19 kull. Akp2^{-/-}-mus mottok vehikkel (N=13) eller sTNALP-FcD10 (N=12). Kontroller bestod av 15 WT-mus (én per kull). Kontrollmusene ble ikke injisert. Blod ble tatt 24 timer etter siste injeksjon som beskrevet i eksempel 6.

[0128] Figur 14 viser at enzymaktiviteter i serum på dag 16 var knapt over

deteksjonsgrensen. Til tross for lave serumverdier for sTNALP-FcD10, ble serum PPi-nivåene korrigert (figur 15). Ubehandlede Akp2^{-/-}-mus hadde serum-PPi-konsentrasjoner på $1,90 \pm 0,64 \mu\text{mol/ml}$, mens behandlede Akp2^{-/-}-mus hadde nivåer på $1,41 \pm 0,30 \mu\text{mol/ml}$, sammenlignet med de til WT-musene ($1,52 \pm 0,35 \mu\text{mol/ml}$).

[0129] Proksimale skinnebeinvekstplater viste en utvidelse av den hypertrofiske sonen i Akp2^{-/-}-dyr sammenlignet med WT-dyr (sammenligne vehikkel med villtype i figur 16). Den samme observasjonen gjort tidligere i denne stammen av Akp2^{-/-}-mus (Hessle et al. 2002) er konsistent med rakitt. En trend mot normalisering av vekstplate-morfologien ble observert hos dyr behandlet med sTNALP-FcD10 i 15 dager (figur 17) sammenlignet med vehikkel (ubehandlet).

EKSEMPEL 10

Korttids (15 dager) effekt av høye doser (8,2 mg/kg) av sTNALP-FcD10 for HPP i Akp2^{-/-}-mus

[0130] For å evaluere 15 dager med daglige s.c.-injeksjoner ved hjelp av en betydelig høyere dose av sTNALP-FcD10 (8,2 mg/kg) på vekst- og beinmineralisering, ble det anvendt mus fra 20 kull (141 mus totalt). De ble fordelt i to grupper:

1) Akp2^{-/-}-mus som fikk vehikkel (N = 19); 2) Akp2^{-/-}-mus behandlet med sTNALP-FcD10 (N = 20); i tillegg var det én WT-mus per kull, ikke behandlet (N = 18).

Kroppsvekt

[0131] Akp2^{-/-}-musene vokste saktere enn WT-musene. På dag 1 var ingen statistisk forskjell i kroppsvekt observert blant vehikkel-, sTNALP-FcD10- og WT-dyrene. Men daglige gjennomsnittlige kroppsvekter divergerte på dag 6 (figur 18). Forskjellen mellom WT ($4,2 \pm 0,6 \text{ g}$) og vehikkel ($3,7 \pm 0,7 \text{ g}$) oppnådde statistisk signifikans ($p=0,0217$) på dag 6; men forskjellen mellom vehikkel- ($5,9 \pm 1,0 \text{ g}$) og sTNALP-FcD10-behandlede verdier ($6,7 \pm 1,0 \text{ g}$) oppnådde statistisk signifikans på dag 11 ($p=0,04$), der behandlingsgruppen var paradoksalt tyngre enn WT-gruppen. På dag 16 var gjennomsnittlige kroppsvekter av behandlede dyr ($8,2 \pm 1,1 \text{ g}$) og WT ($8,4 \pm 0,8 \text{ g}$) ikke statistisk forskjellige. Dyr behandlet med sTNALP-FcD10 hadde kroppsvekter som var statistisk større ($p=0,026$) enn de som ble behandlet med vehikkel ($6,6 \pm 1,4 \text{ g}$). Ingen signifikant forskjell mellom ERT- og WT-gruppene ble observert for kroppsvekt på et hvilket som helst tidspunkt.

Beinlengde

[0132] Ved slutten av forsøket (dag 16) utgjorde skinnebeinlengden en ytterligere måling av skjelettfordelen for Akp2^{-/-}-mus. Skinnebeinlengden med ERT var $12,6 \pm 0,7 \text{ mm}$ og lengre ($p=0,0135$), sammenlignet med dyr som fikk vehikkel ($11,7 \pm 1,1 \text{ mm}$) (figur 19). En statistisk signifikant forskjell ($p=0,0267$) ble også oppnådd når

lårbeinlengden ble sammenlignet med sTNALP-FcD10 ($9,2 \pm 0,4$ mm) og vehikkel ($8,6 \pm 0,8$ mm) gruppene. Ingen statistisk signifikant forskjell ble observert for skinnebein- eller lårbeinslengden av ERT sammenlignet med WT-musene. En delvis bevaring (dvs. delvis forebygging av reduksjon i beinvekst som blir tydelig rundt to ukers alderen) av skinnebein- og lårbeinsveksten ble observert ved målinger av lengden ved nekropsi (figur 19).

[0133] I alle unntatt 5 dyr ble det funnet påviselige, men sterkt variable nivåer av sTNALP-FcD10 i plasmaet til behandlede Akp2^{-/-}-mus på dag 16 (figur 20).

Sirkulerende TNALP-konsentrasjoner i normale dyr er gitt for sammenligningsformål.

Beinmineralisering

[0134] Blinde evalueringer av FaxitronTM-bilder av føttene og brystkassen skjelnet to grader av alvorlighet av mineraliseringsdefekter i Akp2^{-/-}-musene (figur 21). Alvorlig rammede mus (alvorlig) hadde et fravær av digitale bein (falanger) og sekundære ossifikasjonssentre. Moderat påvirkede (moderate) mus hadde unormale sekundære ossifikasjonssentre, men alle digitale bein var til stede. WT-mus (friske) hadde alle beinstrukturer til stede med normal arkitektur. Røntgenbilder av baklemmene ble tilsvarende klassifisert som unormale hvis tegn på akutte eller kroniske brudd var til stede, eller friske i fravær av eventuelle unormale funn (figur 21). ERT minimerte mineraliseringsdefekter i føttene dokumentert med antallet Akp2^{-/-}-mus med alvorlige defekter, bestående av 5 i den ubehandlede gruppen, men 0 i ERT-gruppen (tabell i figur 21). χ^2 var signifikant ($p \leq 0,05$), noe som indikerer at ERT reduserte alvorlighetsgraden av de ervervede beindefektene. Fordi alvorlig rammede infantile HPP-pasienter ofte dør av undermineraliserte og brukne ribbein ute av stand til å støtte åndedrettet, ble brystkassene også nøye undersøkt. ERT reduserte også forekomsten av alvorlig dysmorfie brystkasser (tabell i figur 21). χ^2 -analysen var signifikant ved $p \leq 0,025$. Tilsvarende var baklemmene friske hos alle behandlede dyr (tabell i figur 21). χ^2 -analysen var signifikant ved $p \leq 0,025$.

Tannskader

[0135] Underkjevene fra 16 dager gamle mus ble nedsenket fast over natten i natriumkakodylatbufret aldehydløsning og skåret inn i segmenter som inneholdt første jeksel, underliggende fortann, og det alveolære beinet omkring dem. Prøvene ble dehydratisert gjennom en gradert etanolserie og infiltrert med enten akryl (LR hvit) eller epoksy (Epon 812) harpiks, etterfulgt av polymerisering av de vevsholdige harpiksblokkene ved 55 °C i 2 dager. Tynne snitt (1 μ m) ble kuttet på en ultramikrotom ved hjelp av en diamantkniv, og objektglassmonterte snitt ble farget for mineral ved hjelp av en % sølvnitrat (von Kossa farging, svart) og motfarget med 1 % blå toluidin. Frontalsnittene gjennom underkjevene (på samme nivå i den mest mesiale

roten til første jeksel ga i lengdesnitt av jekselen og tverrsnitt av fortannen for sammenlignende histologiske analyser.

[0136] Histologisk undersøkelse av tennene fra Akp2^{-/-}-mus viser dårlig mineralisert tannvev og svært lite sement mellom det periodontale ligamentet og tannbeinet i forhold til villtype-dyrene (figur 22, sammenlign Akp2^{-/-}, vehikkel og WT-normal). Gjenopprettet tannbenmineralisering og dannelsen av sement er også vist i figur 22 (Akp2^{-/-} behandlet vs. WT-normal).

EKSEMPEL 11

Langsiktige (52 dager) effekter av høye doser (8,2 mg/kg) av sTNALP-FcD10 for HPP i Akp2^{-/-}-mus

[0137] Til slutt, for å vurdere langsiktig overlevelse og beinmineralisering i Akp2^{-/-}-mus, ble enten sTNALP-FcD10 (8,2 mg/kg) eller vehikkel gitt daglig i 52 dager (s.c.-injeksjoner).

Museoverlevelse, aktivitet og utseende

[0138] Ubehandlete mus hadde en gjennomsnittlig overlevelsestid på 18,5 dager (figur 23), mens overlevelsen ble dramatisk økt med ERT, og denne behandlingen bevarte også den normal aktiviteten og det friske utseendet (figur 24) til de behandlede musene.

Beinmineralisering

[0139] Røntgenbilder av føttene til 16 dager gamle Akp2^{-/-}-mus viste sekundære ossifikasjonsdefekter som er et kjennetegn på sykdommen (se figur 25). Disse defektene ble forebygget i alle behandlede mus med daglige doser av sTNALP-FcD10 i 46 eller 53 dager (figur 25).

ALP-aktivitet

[0140] Plasma-ALP-aktivitetsnivåene ble målt i behandlede Akp2^{-/-}-mus etter 53 dager. Figur 26 viser at mesteparten av verdiene var mellom 1 og 4 µg/ml ALP-aktivitet. Tre dyr hadde imidlertid upåviselige ALP-nivåer.

[0141] Det er interessant at, i motsetning til WT-mus der en stabil tilstand serumkonsentrasjon på sTNALP-FcD10 var oppnåelig, ble det målt store variasjoner i serumnivåene til ALP hos den behandlede Akp2^{-/-}-musen.

EKSEMPEL 12

Langtidseffekt av forskjellige doseringsintervall av sTNALP-FcD10 i Akp2^{-/-}-mus

[0142] Nyfødte Akp2^{-/-}-mus ble injisert med 4,3 mg/kg daglig (Tx-1), 15,2 mg/kg hver 3. dag (Tx-3) eller 15,2 mg/kg hver 7. dag (Tx-7) av sTNALP-FcD10.

Behandlingen ble fortsatt i 43 dager og musene ble avlivet på dag 44, nemlig 24 timer etter siste injeksjon. De ble overvåket for å vurdere eventuelle forbedringer av deres overlevelse og skjelettmineralisering.

Museoverlevelse

[0143] Overlevelsen av behandlede mus øket sammenlignet med mus som ble injisert med vehikkel (figur 27). Denne økningen var statistisk signifikant ($p < 0,0001$). Det var ingen statistisk signifikant forskjell når overlevelseskurvene for behandlede grupper ble sammenlignet mellom seg.

Beinmineralisering

[0144] A) For hver behandling ble røntgenbildene av føttene analysert og fordelt mellom normale og unormale. Tall og prosenter (i parentes) fremgår i tabell 4 nedenfor. Beinmineraliseringsdefektene ble undersøkt på dag 23 og ved slutten av studien (dag 23-45).

Tabell 4: Fordeling av røntgenbilder av føttene

Midtstudie (D23)		
Gruppe	Unormal (%)	Normal (%)
Tx-1 (N=18)	6 (33)	12 (67)
Tx-3 (N=19)	4 (21)	15 (79)
Tx-7 (N=20)	10 (50)	10 (50)
WT (N=32)	0 (0)	32 (100)

B)

D23-45		
Gruppe	Unormal (%)	Normal (%)
Tx-1 (N=18)	3 (17)	15 (83)
Tx-3 (N=19)	0 (0)	19 (100)
Tx-7 (N=20)	3 (15)	17 (85)
WT (N=31)	0 (0)	31 (100)

[0145] Midtveis i studien normaliserte sTNALP-FcD10 administrert ved 15,2 mg/kg hver 3. dag beinmineraliseringsdefektene hos 79 % av musene. Denne normaliseringen nærmet seg statistisk signifikans når den ble sammenlignet med 50 % raten av normalisering evaluert i mus behandlet med 15,2 mg/kg hver 7. dag (χ^2 -; $p = 0,0596$). Ingen andre indre behandlingssammenligninger var statistisk signifikant eller nærmet seg signifikans.

[0146] Ved slutten av studien forbedret prosentvis normalisering seg i alle behandlede grupper sammenlignet med prosentvis normalisering evaluert på dag 23. χ^2 -testen som sammenligner fordelingen blant alle sTNALP-FcD10-behandlingene var

ikke signifikant ($p=0,1844$). 100 % normalisering observert hos mus behandlet hver 3. dag nærmet seg statistisk signifikans når den ble sammenlignet med mus behandlet daglig (83 %, $p=0,0634$), eller hver 7. dag (85 %, $p=0,0789$).

[0147] I alle behandlingsgruppene forbedret imidlertid en betydelig andel av dyrene som er klassifisert som unormale på dag 23 seg og ble normale ved slutten av studien. I den daglige behandlingsgruppen normaliserte 3 av 6 dyr seg; av musene som ble behandlet hver 3. dag forbedret 4 av 4 seg, og til slutt, i den ukentlige behandlingsgruppen, ble 7 av 10 dyr normale. Selv om doseringsintervallene gir tilfredsstillende resultater, ble de beste resultatene oppnådd når den resulterende daglig administrerte mengden var høyest.

EKSEMPEL 13

Langtidseffekt av høye doser (8,2 mg/kg) av sTNALP-FcD10 hos 15 dager gamle Akp2^{-/-}-mus

[0148] Effektstudier som beskrevet i eksempel 11 ble utført i 15 dager gamle mus som har begynt å manifestere skjelettdefekter som observert på røntgenbilder av føttene (se eksempel 11, figur 25). sTNALP-FcD10 ble administrert til slutten av studien. Dyrene ble overvåket for å evaluere eventuell forbedring av deres overlevelse, kroppsvekt og skjelettmineralisering.

Museoverlevelse

[0149] Daglige injeksjoner, med start på dag 15, av 8,2 mg/kg sTNALP-FcD10 til Akp2^{-/-}-mus økte deres overlevelse sammenlignet med mus som ble injisert med vehikkel (figur 28). Økningen var statistisk signifikant ($p<0,05$).

Kroppsvekt

[0150] Ved begynnelsen av studien ble det ikke observert noen signifikant forskjell i kroppsvekt mellom gruppene (figur 29). Ved begynnelsen av behandlingen (dag 15), var kroppsvekten til Akp2^{-/-}-musene lavere enn kroppsvekten til villtype-dyrene. Mens kroppsvekten til dyr injisert med vehikkel fortsatte å synke, begynte Akp2^{-/-}-mus behandlet med sTNALP-FcD10 å legge på seg 4 til 5 dager etter behandlingsstarten og fortsatte å legge på seg helt til slutten av studien, imidlertid uten å nå verdiene til vill-typedyrene. Denne vektøkningen antyder forbedring i velværet til dyrene som ble behandlet med sTNALP-FcD10.

Beinmineralisering

[0151] For hver behandling ble røntgenbildene av føttene analysert og fordelt mellom normale eller unormale. Tall og prosenter (i parentes) vises i tabell 5. Røntgenbildene ble tatt ved nekroskopi.

[0152] Behandling av $Akp2^{-/-}$ -mus med 8,2 mg/kg sTNALP-FcD10 daglig, med start på dag 15 etter fødselen forbedret mineralisering sett fra røntgenbildene av føttene tatt ved nekroskopi. Den sTNALP-FcD10-behandlede gruppen viste 41 % normale dyr sammenlignet med 12 % i den vehikkel-injiserte gruppen av $Akp2^{-/-}$ -mus. Denne forskjellen nådde nesten statistisk signifikans ($p = 0,0645$ i χ^2 -kvadrattesten).

Tabell 5: Fordeling av røntgenbilder av føttene

Gruppe	Unormal	Normal
R-vehikkel (N=16)	14 (88)	2 (12)
RTx-1 (N=17)	10 (59)	7 (41)
WT (N=30)	0 (0)	30 (100)

EKSEMPEL 14

Langtidseffekten av forskjellige doseringsintervaller av sTNALP-FcD10 på redningen av $Akp2^{-/-}$ -mus

[0153] Musene startet behandlingen på dag 12 og ble injisert s.c. med vehikkel (RV), 8.2 mg/kg daglig i dagene 46/47 (RTx-1) eller injisert med 8,2 mg/kg daglig i 7 dager etterfulgt av 24,6 mg/kg hver 3. dag (RTx-3) eller etterfulgt av 57,4 mg/kg hver 7. dag (RTx-7). Den gjennomsnittlige overlevelsen var 19,5 dager for RV-musene, 21,0 dager for RTx-7-musene, 30,5 dager for RTx-3-musene og 37,5 dager for RTx-1-musene. I alle tilfellene ble overlevelsen statistisk øket når den ble sammenlignet med den til den vehikkel-behandlede gruppen. Det er en klar fordel av ERT hos $Akp2^{-/-}$ -mus med veletablert hypofosfatasi. Dosering sjeldnere enn daglig synes også å statistisk øke overlevelsen.

EKSEMPEL 15

En giftighetsstudie over høyeste tolererte dose med intravenøs injeksjon på unge Sprague-Dawley-rotter

[0154] Hensikten med studien var å bestemme den maksimalt tolererte dosen (MTD) og giftigheten for testartikkelen, sTNALP-FcD10, etter gjentatt administrering til unge Sprague-Dawley-rotter med intravenøs injeksjon. I eksemplene 15 til 18 er den anvendte sALP-FcD10 den som er spesifikt beskrevet i figur 3.

[0155] sTNALP-FcD10 ble administrert til unge Sprague-Dawley-rotter (alderen ved starten var mellom 22 og 24 dager) én gang hver uke i fire uker med intravenøs injeksjon som beskrevet i tabell 6 nedenfor:

[0156]**Tabell 6: Studieutforming**

Gruppenummer	Behandling	Dosenivå (mg/kg/gang)	Dosekonsentrasjon (mg/ml)	Antall dyr	
				Hann	Hunn
1	Dose 1	10	2,0	3	3
2	Dose 2	30	6,0	3	3
3	Dose 3	90	18,0	3	3
4	Dose 4	180	36,0	3	3

5 **[0157]** Gjennom hele studien ble dyrene overvåket med hensyn til dødelighet, kroppsvekt og klinisk tilstand. Hematologi-, koagulasjons- og kliniske kjemianalyser ble utført på alle dyrene. Til slutt ble rottene avlivet og utsatt for nekropsi. For hvert dyr ble prøver av utvalgte vev beholdt, og utsatt for histologisk bearbeiding og mikroskopisk undersøkelse.

10 **[0158]** Det var ingen dødelighet i denne studien, og det var ingen testartikkel-relaterte endringer i koaguleringsparametre eller organvekt. Særlig kroppsvekten til hannene med høy vekt var omtrent 10 % under den lave dosen som antyder en behandlingsrelatert effekt.

15 **[0159]** Det ble ikke observert noen kliniske tegn i gruppe 1- og 2-dyrene ved den første doseringsanledningen. I dyregruppene 3 og 4 fremstod dyrene svake umiddelbart etter doseringen og noen dyr i gruppe 4 viste svak til moderat nedgang i aktivitet. Det ble også observert en liten hevelse av lemmene, ørebladet og snuten med hudmisfarging (rød eller blå av utseende) på ekstremitetene i de to gruppene. Andre kliniske tegn observert hos dyrene i gruppe 4 inkluderte overdreven skraping, bustepels og hyperpné.

20 **[0160]** Kliniske tegn registrert hos dyrene i gruppe 1 og 2 under den andre doseringsanledningen (dag 8), var hovne lemmene, ørebladet og snuten med hudmisfarging (rød eller blå i utseende) på ekstremitetene. Lignende kliniske tegn på hudhevelse ble også registrert på de tredje og fjerde doseringsanledningene (dag 15 og 25 22) for de samme dyregruppene. Under den fjerde doseringsanledningen (dag 22) ble svak hyperaktivitet observert hos hunnene i gruppe 1 mens hypoaktivitet ble observert hos hannene i gruppe 2. For dyrene i gruppe 3 og 4 ble de kliniske tegnene på redusert motorisk aktivitet, bustepels, hyperpné og hevelse i lemmene, ørebladet og snuten med hudfarge mer tydelig etter hvert som doseringen utviklet seg fra den første doseringsanledningen til den fjerde. Det ble også vurdert at disse kliniske tegnene var 30 behandlingsrelaterte. På dagene 16 til 19 og på dag 23 ble det observert en liten hevelse og hudfarge på ørebladet (rød i utseende) hos ett dyr (gruppe 1). Lignende kliniske tegn

ble observert hos et annet dyr (gruppe 2) på dag 23.

[0161] De kliniske tegnene var akutte og alvorlighetsgraden økte etter hvert som doseringen fremskred, men de var forbigående. Alle kliniske tegn viste seg innen 50 minutter etter administrering av testartikkelen, sTNALP-FcD10, der noen dyr kom seg
5 innen omtrent tretti minutter til 2 timer. For andre dyr var bedringen fullstendig neste morgen (neste planlagte observasjonstid).

[0162] Det var en behandlingsrelatert nedgang i antallet blodplater (PLT) for hanner og hunner fra alle behandlingsgruppene, målt etter siste dose, sammenlignet med bakgrunnverdiene. Det ble hovedsakelig sett økning i prosentandelen, men også i
10 absolutt antall retikulocytter hos dyr som ble behandlet med de tre høyeste dose-nivåene.

[0163] Nivåene av alkalisk fosfatase i serum var høyere enn det som kunne kvantifiseres av det analytiske instrumentet selv etter fortykning. Resultatene som var tilgjengelige hunnene med den lave dosen var dramatisk høyere enn bakgrunn-
15 området. Dette var forventet ettersom testartikkelen er en aktiv modifisert ALP.

[0164] Makroskopisk ble det sett mørkt fokus/areal og/eller nedsenket areal i kjertelmagen observert hos 3 av de 6 gruppe 3-dyrene (2 hanner/1 hunn) og 4 av de 6 gruppe 4-dyrene (2 hanner/2 hunner).

[0165] Mikroskopisk ble det sett minimal til mild erosjon/sår i kjertelmagen, iblant forbundet med ødem i submukosa hos 3 av de 6 gruppe 3-dyrene (2 hanner/1
20 hunn) og 4 av de 6 gruppe 4-dyrene (2 hanner/2 hunner), som korrelerer med de generelle funnene.

[0166] Som konklusjonen forårsaket ikke intravenøs injeksjon av sTNALP-FcD10 til unge Sprague-Dawley-rotter én gang i uken i 4 uker død ved noen av de
25 testede dosenivåene, men forårsaket uønskede kliniske tegn, mindre hematologiske endringer og erosjon/sårdannelse i kjertelmagen, iblant forbundet med ødem i submukosa ved dosenivåer på 90 og 180 mg/kg.

[0167] Endringer i forbindelse med administrering av testartikkelen på de to laveste doseringsnivåene som ble testet (10 og 30 mg/kg) ble begrenset til forbigående
30 kliniske tegn som kun var synlige på doseringsdagen. De kliniske tegnene var mer alvorlige ved 90 mg/kg dosenivået, men de var også forbigående. De kliniske tegnene som ble lagt merke til hos dyrene som ble behandlet med 180 mg/kg var så alvorlige at man må unngå å anvende dette doseringsnivået i fremtidige studier. Følgelig er høyeste anbefalte dosenivå for påfølgende langsiktige studier 90 mg/kg.

EKSEMPEL 16

En giftighetsstudie over høyeste tolererte dose med intravenøs injeksjon og infusjon på unge krabbemakakaper

[0168] Hensikten med denne studien var å bestemme den maksimalt tolererte

dosen for sTNALP-FcD10, når den ble administrert én gang ved intravenøs injeksjon eller infusjon til unge krabbemakakaper. Testartikkeldoseringsformuleringene ble administrert én gang på en trinnvis måte, som angitt i tabell 7 nedenfor.

Tabell 7: Studieutforming									
Studie- dag	Behand- ling	Dose- nivåer (mg/kg)	Dose- volum (ml/kg)	Dose- mengde (ml/kg/t)	Dosekons. (mg/ml)	Antall dyr			
						Hovedstudie		Toksikokinetisk	
						Hannkjønn	Hunnkjønn	Hannkjønn	Hunnkjønn
1	IV- injeksjon	5	4	N/A	1,25	2	2	1	1
8	IV- injeksjon	15	4	N/A	3,75				
15	IV- infusjon	45	4	80	11,25				
22	IV- infusjon	90	4	40	22,5				
29	IV- infusjon	180	4	20	45				
46	IV- injeksjon	45	4	N/A	11,25				
* Bare dyrene i hovedstudien ble dosert på dag 46.									

5

[0169] Etter siste behandling ble dyrene frigitt fra studien. Parameterne som ble overvåket under studien var dødelighet, kliniske observasjoner, kroppsvekt, appetens, toksikokinetikk, hematologi og klinisk kjemi.

[0170] Ingen dødelighet, uønskede kliniske tegn eller effekt på kroppsvekter ble observert i løpet av studien.

[0171] En markert doseproporsjonal økning i alkalisk fosfatase ble observert i alle dyrene gjennom hele studien. Siden testartikkelen var en syntetisk alkalisk fosfatase, var denne økningen hovedsakelig på grunn av nærværet av medikamentet i blodstrømmen til dyrene etter hver dosering.

[0172] Økninger i alaninaminotransferase og aspartataminotransferase ble observert hos tre dyr under studien, men i fravær av en nekropsi er den toksikologiske signifikansen av dette funnet uvisst.

[0173] Farmakokinetikken til sTNALP-FcD10 ble godt karakterisert etter en enkelt intravenøs administrering av 5, 15, 45, 90 og 180 mg/kg til aper. For IV-injeksjonene varierte de gjennomsnittlige AUC_∞-verdiene fra 797 til 2950 mg•t/l og de gjennomsnittlige C_{maks}-verdiene varierte fra 65 til 396 mg/l i det studerte doseområdet. For infusjonene varierte de gjennomsnittlige AUC_∞-verdiene fra 9410 til 48400 mg•t/l og C_{maks} varierte fra 1230 til 7720 mg/l i det studerte doseområdet.

[0174] Gjennomsnittlige t_{1/2}-verdier av sTNALP-FcD10 syntes å avta med

økende dosenivåer av sTNALP-FcD10. Selv om den systemiske utskillingen av sTNALP-FcD10 var relativt konsistent på tvers av dosenivåene, viste gruppen på 90 mg/kg dose seg å være et farmakokinetisk avvik med en vesentlig lavere utskilling sammenlignet med de andre dosenivåene (omtrent fem ganger). Ingen åpenbare kjønnsrelaterte trender ble lagt merke til.

[0175] Oppsummert, selv om det ble observert noen reversible blodkjemi-endringer i løpet av studien, ble den intravenøse injeksjonen/infusjonen av sTNALP-FcD10 på opptil 180 mg/kg godt tolerert av de unge krabbemakakapene. Derfor, ifølge forholdene i denne studien, ble den maksimalt tolererte dosen ansett å være minst 180 mg/kg.

EKSEMPEL 17

En 4-ukers (én gang i uken) intravenøs injeksjonsgiftighetsstudie av sTNALP-FcD10 på unge albinorotter etterfulgt av en 28-dagers restitusjonsperiode

[0176] Hensikten med denne studien var å undersøke den potensielle giftigheten av sTNALP-FcD10 gitt én gang per uke ved intravenøs injeksjon til den unge rotten i minimum 4 sammenhengende uker (totalt 4 doser) etterfulgt av 28 dagers restitusjon. Dyrene ble dosert på studiedag 1, 8, 15 og 22 og restitusjonsperioden begynte på studiedag 29. Studieutformingen er detaljert i tabell 8 nedenfor.

Tabell 8: Studieutforming								
					Hoved-studie		Restitusjons-studie	
Grupper	Måldose -nivå (mg/kg/ dose)	Faktisk dosenivå (mg/kg/dose)	Mål- konsentra sjon (mg/ml)	Faktisk konsentrasjo n (mg/ml)	Ha nn	Hunn	Hann	Hunn
1- Vehikke lkontrol l	0	0	0	0	10	10	5	5
2- Lav dose	3	2,5	0,6	0,5	10	10	5	5
3- Mid. dose	30	26	6	5,1	10	10	5	5
4- Høy dose	90	77	18	15,3	10	10	5	5

[0177] Følgende ble evaluert: kliniske tegn (to ganger daglig), kroppsvekt (én

gang i løpet av akklimatiseringsperioden og ukentlig med start på dag 21 etter *partum*),
 matinntak (ukentlig), oftalmologi (ved slutten av behandlingen og slutten av hvile-
 perioden), hematologi (ved nekropsi), serumkjemi (ved nekropsi), urinalyse (dag 29
 og på slutten av restitusjonsperioden), biokjemiske markører for beinomforming:

5 osteokalsin (beindannelsesmarkør) og C-telopeptid (beinresorpsjonsmarkør) (morgen
 før den planlagte nekropsien), antistoffanalyse (dag -1 og ved nekropsi), testartikkel-
 blodkonsentrasjonsevaluering (dag 16 og dag 23), beindensitometri (ved DXA *in*
vivo dag -1, 28-hoved- og restitusjonsstudiedyr og dag 14 og 56-restitusjonsstudiedyr
 og pQCT *ex vivo*), røntgen og makroskopiske observasjoner ved nekropsi, organvekt
 10 og histopatologi.

[0178] En hann som fikk 90 mg/kg/dose ble funnet død på studiedag 25.
 Ettersom ingen konsekvenshistologiske observasjoner (pulmonære og tymiske
 blødninger gradert henholdsvis svak og minimal) ble gjort for denne rotten, ble dens
 dødsårsak ubestemt basert på patologiske undersøkelser. På dag 23 ble det tatt blod fra
 15 dette dyret for å evaluere blodkonsentrasjonen av testartikkelen, og denne prosedyren
 kan ha bidratt til dens død siden det var ikke var noen tegn på giftighet på dag 22. Det
 var ingen sTNALP-FcD10-relatert dødelighet eller effekter på oftalmologi, urin-
 analyse, beindannelsesmarkør (osteokalsin), organvekt, total patologi, radiologi eller
 mikroskopiundersøkelse.

20 **[0179]** sTNALP-FcD10-relaterte kliniske tegn som ble observert i 3, 30 og/eller
 90 mg/kg/dosegruppene anses å være en akutt infusjonsreaksjon. Disse inkluderte
 delvis doserte øyne, nedsatt muskeltonus, liggende på siden, krum holdning, kalde å ta
 på, ukoordinerte bevegelser, redusert aktivitet, unormal gange og/eller blå, røde
 og/eller faste hovne baklabber og/eller framlabber under bur-sideobservasjoner ved 5,
 25 15, 30 og/eller 60 minutter etter dosering. Disse observasjonene var forbigående og
 forekom ikke på ikke-doserende dager eller under restitusjonsperioden.

[0180] Generelt ble det sett en trend med svakt redusert kroppsvekt og kropps-
 vektøkning for hanner i gruppene på 3, 30 og/eller 90 mg/kg/dose under restitusjons-
 perioden. Effekten på beinstørrelse på to bein av appendikulært skjelett (lårbein og på
 30 skinnebeinet) korrelert med nedsatt kroppsvekt. Reduksjoner i matinntaket var generelt
 konsistent med nedsatt kroppsvekt. Kroppsvekter var sammenlignbare med kontroller
 for sTNALP-FcD10-behandlede hunner.

[0181] sTNALP-FcD10 administrert ved 90 mg/kg/dose ble generelt forbundet
 med en liten reduksjon i absolutte nøytrofiler, monocytter og/eller eosinofiler sammen-
 35 lignet med kontrollgruppen. I tillegg ble en lett økning i lymfocytter, blodplater og
 absolutte retikulocytter observert sammenlignet med kontrollgruppen. Ved slutten av
 restitusjonsperioden var disse små endringene fremdeles tydelige i dyrene som ble
 behandlet med 90 mg/kg.

[0182] sTNALP-FcD10 ble generelt forbundet med statistisk signifikante

doserelaterte økninger i alkalisk fosfatase i alle behandlede grupper sammenlignet med kontrollene. Tatt i betraktning innholdet i testartikkelen (alkalisk fosfatase), fraværet av eventuelle endringer i andre leverenzymmer og fraværet av histopatologiske korrelasjoner, er disse økningene sannsynligvis tilskrevet sirkulerende nivåer av sTNALP-FcD10. Lett statistisk signifikante økninger i fosfor ble observert hos hanner behandlet med sTNALP-FcD10 ved 90 mg/kg/dose i løpet av uke 4, forbundet med en ikke-signifikant økning i totalt serumkalsium. Ved slutten av restitusjonen vendte disse endringene, inkludert de som er statistisk signifikante, tilbake til kontrollverdiene.

[0183] Det var ingen organvekt, radiologiske, makroskopiske eller mikroskopiske endringer som var relatert til sTNALP-FcD10 hos unge rotter behandlet intravenøst én gang ukentlig ved opptil 90 mg/kg/dose i 4 sammenhengende uker. Det ble ikke identifisert forsinkede effekter i en undergruppe av disse dyrene som fikk 28 dagers restitusjon etter fullføring av behandlingen.

[0184] Litt lavere gjennomsnittlige CTx-verdier ble observert for behandlede hunner sammenlignet med kontroller (oppnår statistisk signifikans ved 90 mg/kg/dose). Disse lavere verdiene var ikke konsistente med beintetthetsanalysen eller med resultatene oppnådd for hannene, derfor kan ikke den tilfeldige naturen for disse reduksjonene ekskluderes.

[0185] Stor variasjon i beindensitometri- og beingeometriparametere observert mellom gruppene ble tilskrevet den raske vekstfasen. Ved slutten av restitusjonen var generelt areal og BMC (analysert ved DXA og pQCT) lavere for behandlede hanner, noe som tyder på at disse dyrene har mindre bein. Effekten på beinstørrelsen ble sett på to bein i det appendikulære skjelettet (lårbein og ved skinnebeinet) ved to forskjellige metoder, men det ble ikke sett noen entydig effekt på det aksiale skjelettet (noe som tyder på ingen effekt på kronen til bakkellengden) (eng.: suggesting no effect on crown to rump length). Selv om arealet og BMC var redusert, var de gjennomsnittlige BMD-verdiene generelt sammenlignbare med kontroller, noe som tyder på at effekten på BMC og arealet var sekundært i forhold til effekten på veksten. Lavere kroppsvekt og lavere matinntak for behandlede hanner i forhold til kontrollene er forenlig med disse dataene. Imidlertid var disse resultatene svekket av den lille gruppestørrelsen ved restitusjon, den manglende entydigheten med hensyn til kjønn, samt variasjonen, derfor kan det ikke utelukkes fullstendig at disse reduksjonene var tilfeldige.

[0186] Endelig ga ukentlige intravenøse injeksjoner av den unge rotten i minst 4 påfølgende uker, med påfølgende 28 dagers restitusjon i doser på 3, 30 og 90 mg/kg/dose, kliniske tegn forbundet med forbigående injeksjonsrelaterte effekter, inkludert ukoordinert og redusert aktivitet og hevelser i labbene sett opptil 60 minutter etter doseringen. Hanner behandlet ved 90 mg/kg/dose viste en liten reduksjon i kroppsvekt og matinntak som korrelerte med litt mindre skinnebein og lårbein analysert ved densitometrimetoder. For hunner ble noe lavere gjennomsnittsverdier

oppnådd for C-telopeptidnivåer sammenlignet med kontroller. Fosforkonsentrasjonen i serum ble svakt, men signifikant økt i gruppen på 90 mg/kg/dose. Forhøyede serumalkaliske fosfatasenivåer ble trolig tilskrevet sirkulerende nivåer av sTNALP-FcD10. sTNALP-FcD10 hadde ingen meningsfulle eller konsistente effekter på beindensitometri og beingeometri for hunner under behandlings- og restitusjonsperioden. For hanner ble ingen biologisk signifikante effekter notert på beindensitometri eller beingeometri under behandlingsperioden. Generelt ble en liten reduksjon i beindensitometri- (beinmineralinnhold og/eller areal analysert av DXA og pQCT) og beingeometriparametere med en tilsvarende lavere gjennomsnittlig kroppsvekt registrert for hanner i forhold til kontroller ved slutten av restitusjonsperioden. Alle funnene ble restituert etter en 28-dagers behandlingsfri periode med unntak av effekten på kroppsvekt og beinstørrelse, som vedvarte for hanner med høy dose. Det var ingen tegn på ektopisk forkalkning ved slutten av behandlings- eller slutten av restitusjonsperioden. Det var ingen radiologiske, makroskopiske eller mikroskopiske funn samt eventuelle organvektendringer forbundet med sTNALP-FcD10-behandling på noe dosenivå. Ettersom injeksjonsreaksjonen var forbigående, og ikke førte til noen effekt på parametere som ble anvendt til å analysere giftigheten i gruppene på 3 og 30 mg/kg/dose, ble den ikke ansett for å være skadelig. I gruppen på 90 mg/kg/dose, var denne reaksjonen mer alvorlig og ledsaget av nedganger i kroppsvektøkning, redusert matinntak, og potensiell reduksjon i beinvekst og derfor ble effektene i denne gruppen ansett for å være negative. Følgelig ble den høyeste konsentrasjonen uten observerte bivirkninger (NOAEL) ansett å være 30 mg/kg/dose i denne studien.

EKSEMPEL 18

En 4-ukers intravenøs injeksjonsgiftighetsstudie hos unge krabbemakakaper etterfulgt av en 28-dagers restitusjonsperiode

[0187] Hensikten med denne studien var å bestemme giftigheten og toksikokinetikken av sTNALP-FcD10 i unge krabbemakakaper, når det gis én gang i uken ved langsom bolusintravenøs injeksjon i 4 uker og til å analysere reversibilitet av eventuelle endringer etter en 28-dagers restitusjonsperiode.

[0188] Kontroll- og testartikkeldoseringsformuleringene ble administrert til unge krabbemakakaper ved langsom intravenøs bolusinjeksjon én gang i uken i 4 uker etterfulgt av en 28-dagers restitusjonsperiode, som vist i tabell 9 nedenfor:

Tabell 9: Studieutforming

Gruppe	Dosenivå (mg/kg)	Dosevolum (ml/kg)	Dosekons. (mg/ml)	Antall dyr			
				Hovedstudie		Restitusjon	
				Hannkjønn	Hunnkjønn	Hannkjønn	Hunnkjønn
1 kontroll *	0	4	0	3	3	2	2
2 lav dose	5	4	1,25	3	3	2	2
3 Mid. dose	15	4	3,75	3	3	2	2
4 Stor dose	45	4	11,25	3	3	2	2
* Dyrene i gruppe 1 mottok vehikkel/kontrollartikkelen, 25 mM natriumfosfat pH 7,4, 150 mM NaCl.							

[0189] Etter siste behandling (dag 22), ble dyrene i hovedstudien avlivet på dag 29, mens de resterende restitusjonsdyrene ble observert i ytterligere 28 dager, og etter dette ble de avlivet på dag 57. Alle dyrene i hovedstudien og restitusjonsstudien ble utsatt for en nekropsundersøkelse.

[0190] Evalueringer gjennomført i løpet av studien eller ved slutten av denne inkluderte dødelighet, klinisk tilstand, kroppsvekt, appetence, kroppsmålinger, røntgenanalyser av beinutvikling, oftalmologi, elektrokardiografi, toksikokinetikk, immunogenisitet, hematologi, koagulering, klinisk kjemi, urinanalyse, biomarkører av beinomforming, organvekter, *ex-vivo*-beinmineraltetthetsanalyser, og total patologi og histopatologi.

[0191] Ingen dødelighet eller ugunstige behandlingsrelaterte kliniske observasjoner ble notert i løpet av studien.

[0192] Basert på kroppsmålingene registrert ved slutten av behandlings- og restitusjonsperioden, var det ingen nevneverdige inter-gruppeforskjeller for kranieomkrets, eller overarmsbeinet, underarmen, skinnebeinet eller pelviske lemlengder.

[0193] Det var ingen kroppsvekt- eller matinntaksendringer knyttet til behandling med testartikkelen på et hvilket som helst dosenivå. Det var ingen oftalmologiske eller elektrokardografiske funn relatert til testartikkelen på noe dosenivå. Det var ingen forandringer i hematologien, morfologien til de røde blodcellene, koaguleringen eller urinanalysen knyttet til behandling med testartikkelen på noe dosenivå. Det var ingen signifikante toksikologiske endringer blant kliniske biokjemiparametre under behandlings- eller restitusjonsperiodene. En svak til markert doserelatert økning i alkalisk fosfatase ble observert i alle de testartikkelbehandlede dyrene ved de fleste analyseanledningene gjennom hele behandlingsperioden. Alkaliske fosfatasenivåer var generelt mer sammenlignbare til å kontrollere verdier ved slutten av restitusjonsperioden. Siden testartikkelen er en syntetisk alkalisk fosfatase, var denne økningen hovedsakelig på grunn av nærværet av medikamentet i blod-

strømmen til dyrene etter hver dose, og dermed ble økningene ansett å være ikke ugunstige.

[0194] Ved slutten av behandlings- og restitusjonsperiodene var det ingen nevneverdige inter-gruppeforskjeller i absolutte eller relative organvekter, og det var heller ingen testartikkel-relaterte makroskopiske eller mikroskopiske funn. Noterte histologiske endringer ble ansett for å være enten tilfeldige funn, funn med felles bakgrunn i denne arten, eller funn knyttet til noen aspekter av eksperimentell manipulering. Kjønnorganene var generelt umodne, men ansett normale for aper i denne alderen.

[0195] Som konklusjon var ukentlig intravenøs injeksjon av sTNALP-FcD10, til krabbemakakaper av begge kjønn i 4 uker, ved dosenivåer på 0, 5, 15 og 45 mg/kg, og etterfulgt av en 4-ukers periode, uten tegn på giftighet ved et hvilket som helst dosenivå. Derfor ble det høye dosenivået, 45 mg/kg, ansett å være den høyeste konsentrasjon uten observerte bivirkninger (NOAEL) i denne studien.

EKSEMPEL 19

Bestemmelse av maksimal anbefalt startdose for mennesker

[0196] Den maksimalt anbefalte startdosen (MRSD) for mennesket beregnes ved å etablere den høyeste konsentrasjonen uten observerte bivirkninger (NOAEL, se Guidance for Industry and Reviewers, desember 2002). Forskjellige konsentrasjoner av formuleringen beskrevet ovenfor er testet på mus, rotter og aper, inkludert 1 mg/kg, 5 mg/kg og 8,2 mg/kg daglig subkutan; 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg, 45 mg/kg, 90 mg/kg og 180 mg/kg. NOAEL for de mest følsomme artene, nemlig for rotte, var 30 mg/kg.

[0197] Denne dosen ble skalert opp til en human ekvivalent dose (HED) ved anvendelse av publiserte konverteringstabeller som gir en omregningsfaktor fra rotte til menneske på 6. En NOAEL på 30 mg/kg for den arten er ekvivalent med 5 mg/kg hos mennesket.

[0198] Denne verdien (5 mg/kg) ble dividert med en sikkerhetsfaktor på ti. Den beregnede MRSD-en er dermed 0,5 mg/kg. For et gjennomsnittlig menneske som veier 60 kg, kan en ukentlig dose på 30 mg eller daglig dose på 4,28 mg dermed injiseres for å starte kliniske studier.

[0199] Selv om foreliggende oppfinnelse er blitt beskrevet ovenfor i form av spesifikke utførelsesformer av denne kan den modifiseres, uten å avvike fra foreliggende oppfinnelse slik den er definert i de vedlagte kravene.

REFERANSER**[0200]**

1. Ali, S.Y., Sajdera, S.W. & Anderson, H.C. Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. Proc Natl Acad Sci U S A 67, 1513-20 (1970).
2. Anderson, HC, Hsu, H.H., Morris, D.C., Fedde, K.N. & Whyte, M.P. 1997 Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals. Am J Pathol 151 1555-61.
3. Anderson HC, Garimella R & Tague SE 2005a The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. Frontiers in Bioscience 10 822-837.
4. Anderson HC, Harmey D, Camacho NP, Garimella R, Sipe JB, Tague S, Bi XH, Johnson K, Terkeltaub R & Millan JL 2005b Sustained osteomalacia of long bones despite major improvement in other hypophosphatasia-related mineral deficits in tissue nonspecific alkaline phosphatase/nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 double-deficient mice. American Journal of Pathology 166 1711-1720.
5. Anderson HC & Reynolds JJ 1973 Pyrophosphate stimulation of calcium uptake into cultured embryonic bones. Fine structure of matrix vesicles and their role in calcification. Developmental Biology 34 211-227.
6. Anderson HC, Sipe JB, Hessle L, Dhamyramraju R, Atti E, Camacho NP & Millan JL 2004 Impaired Calcification Around Matrix Vesicles of Growth Plate and Bone in Alkaline Phosphatase-Deficient Mice. American Journal of Pathology 164 841-847.
7. Bernard, G.W. 1978 Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in initial intramembranous osteogenesis. Clin Orthop, 218-25.
8. Di Mauro S, Manes T, Hessle L, Kozlenkov A, Pizauro JM, Hoylaerts MF & Millan JL 2002 Kinetic characterization of hypophosphatasia mutations with physiological substrates. Journal of Bone and Mineral Research 17 1383-1391.

9. Farley JR & Magnusson P 2005 Effects of Tunicamycin, Mannosamine, and Other Inhibitors of Glycoprotein Processing on Skeletal Alkaline Phosphatase in Human Osteoblast-Like Cells. *Calcified Tissue International* 76 63-74.

10. Fedde KN, Blair L, Silverstein J, Coburn SP, Ryan LM, Weinstein RS, Waymire K, Narisawa S, Millan JL, MacGregor GR & Whyte MP 1999 Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. *Journal of Bone and Mineral Research* 14 2015-2026.

11. Greenberg, C.R. et al. 1993 A homoallelic Gly317-->Asp mutation in ALPL causes the perinatal (lethal) form of hypophosphatasia in Canadian mennonites. *Genomics* 17, 215-7.

12. Harmey D, Johnson KA, Zelken J, Camacho NP, Hoylaerts MF, Noda M, Terkeltaub R & Millan JL 2006 Elevated skeletal osteopontin levels contribute to the hypophosphatasia phenotype in *Akp2*(-/-) mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 21 1377-1386.

13. Harmey D, Hessle L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R & Millan JL 2004 Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by *Akp2*, *Enpp1*, and *Ank*: An Integrated Model of the Pathogenesis of Mineralization Disorders. *American Journal of Pathology* 164 1199-1209.

14. Hawrylak K & Stinson RA 1988 The solubilization of tetrameric alkaline phosphatase from human liver and its conversion into various forms by phosphatidylinositol phospholipase C or proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 263 14368-14373.

15. Henthorn, P.S., Raducha, M., Fedde, K.N., Lafferty, M.A. & Whyte, M.P. 1992a Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9924-8.

16. Henthorn, P.S. & Whyte, M.P. 1992b Missense mutations of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in hypophosphatasia. *Clin Chem* 38, 2501-5.

17. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, Terkeltaub R & Millan JL 2002 Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone

mineralization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99 9445-9449.

18. Ikezawa H 2002 Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored Proteins. Biol Pharm. Bull. 25(4) 409-417.

5 19. Jansonius JN 1998 Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. Current Opinion in Structural Biology 8 759-769.

20. Johnson K, Moffa A, Chen Y, Pritzker K, Goding J & Terkeltaub R 1999 Matrix vesicle plasma cell membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells. Journal of Bone and Mineral Research 14
10 883-892.

21. Mahmood I, Green MD, & Fisher JE 2003 Selection of the First-Time Dose in Humans: Comparison of Different Approaches Based on Interspecies Scaling of Clearance. J. Clin. Pharmacol., 43 (7), 692-7.

15 22. Meyer, J.L. 1984 Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? Arch Biochem Biophys 231 1-8.

23. Milidn, J.L. 2006 Mammalian Alkaline Phosphatases. From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany 1-322.

20 24. Morris, D.C., Masuhara, K., Takaoka, K., Ono, K. & Anderson, H.C. 1992 Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone. Bone Miner 19 287-98.

25 25. Murshed M, Harmey D, Millan JL, McKee MD & Karsenty G 2005 Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. Genes and Development 19 1093-1104.

26. Nasu M, Ito M, Ishida Y, Numa N, Komaru K, Nomura S and Oda K 2006 Aberrant interchain disulfide bridge of tissue-nonspecific alkalinephosphatase with an Arg433 . Cys substitution associated with severe hypophosphatasia FEBS Journal 273 5612-5624.

27. Narisawa S, Frohlander N & Millan JL 1997 Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Developmental Dynamics* 208 432-446.

28. Narisawa S, Wennberg C & Millan JL 2001 Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *Journal of Pathology* 193 125-133.

29. Nishioka T, Tomatsu S, Gutierrez MA, Miyamoto K, Trandafirescu GG, Lopez PLC, Grubb JH, Kanai R, Kobayashi H, Yamaguchi S, Gottesman GS, Cahill R, Noguchi A & Sly WS 2006 Enhancement of drug delivery to bone: Characterization of human tissue-non specific alkaline phosphatase tagged with an acidic oligopeptide. *Molecular Genetics and Metabolism* 88 244-255.

30. Nosjean O, Koyama I, Goseki M, Roux B & Komoda T 1997 Human tissue non-specific alkaline phosphatases: Sugar-moiety-induced enzymic and antigenic modulations and genetic aspects. *Biochemical Journal* 321 297-303.

31. Oda et al. 1999 *J. Biochem* 126: 694-699.

32. Rezende LA, Ciancaglini P, Pizauro JM & Leone FA 1998 Inorganic pyrophosphate-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. *Cellular and Molecular Biology* 44 293-302.

33. Urlaub G, Kas E, Carothers AM & Chasin LA 1983 Deletion of the Diploid Dihydrofolate-Reductase Locus from Cultured Mammalian-Cells. *Cell* 33 405-412.

34. Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP & MacGregor GR 1995 Mice Lacking Tissue Nonspecific Alkaline-Phosphatase Die from Seizures Due to Defective Metabolism of Vitamin-B-6. *Nature Genetics* 11 45-51.

35. Weiss, M.J. et al. 1988 A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7666-9.

36. Weninger M, Stinson RA, Plenk H, Bock P & Pollak A 1989 Biochemical and Morphological Effects of Human Hepatic Alkaline-Phosphatase in A Neonate with Hypophosphatasia. *Acta Paediatrica Scandinavica* 154-160.

37. Whyte MP 1994 Hypophosphatasia and the Role of Alkaline-Phosphatase in Skeletal Mineralization. *Endocrine Reviews* 15 439-461.

38. Whyte M.P. 1995 Alkaline Phosphatase: Placental and Tissue-nonspecific Isoenzymes hydrolyze Phosphoethanolamine, Inorganic Pyrophosphate, and Pyridoxal 5'-phosphate *J. Clin. Invest.* 95:1440-1445.

39. Whyte MP 2001 Hypophosphatasia. In *The Metabolic and Molecular Bases of Disease*, edn 8th, pp 5313-5329. Eds CL Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle & B Vogelstein. New York: McGraw-Hill Book Company.

40. Whyte MP 2002 Hypophosphatasia. Nature's window on alkaline phosphatase function in man. In *Principle of Bone Biology*, edn Second, pp 1229-1248. Eds JP Bilezikian, LG Raisz & GA Rodan. London: Academic Press.

41. Whyte MP, Kurtzberg J, McAlister WH, Mumm S, Podgornik MN, Coburn SP, Ryan LM, Miller CR, Gottesman GS, Smith AK, Douville J, Waters P, Armstrong RD & Martin PL 2003 Marrow cell transplantation for infantile hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* 18 624-636.

42. Whyte MP, Mahuren JD, Vrabel LA & Coburn SP 1985 Markedly Increased Circulating Pyridoxal-5'-Phosphate Levels in Hypophosphatasia - Alkaline-Phosphatase Acts in Vitamin-B6 Metabolism. *Journal of Clinical Investigation* 76 752-756.

43. Whyte MP, McAlister WH, Patton LS, Magill HL, Fallon MD, Lorentz WB & Herrod HG 1984 Enzyme replacement therapy for infantile hypophosphatasia attempted by intravenous infusions of alkaline phosphatase-rich Paget plasma: results in three additional patients. *J Pediatr* 105 926-933.

44. Whyte MP, Valdes R, Ryan LM & McAlister WH 1982 Infantile hypophosphatasia: enzyme replacement therapy by intravenous infusion of alkaline phosphatase-rich plasma from patients with Paget bone disease. *J Pediatr* 101 379-386.

45. Zurutuza L, Muller F, Gibrat JF, Taillandier A, Simon-Bouy B, Serre JL & Momet E 1999 Correlations of genotype and phenotype in hypophosphatasia. *Human Molecular Genetics* 8 1039-1046.

46. Beertsen W., Van den Bos T, Everts V, 1999, Root development in mice lacking functional tissue non-specific Alkaline phosphatase gene: Inhibition of a cellular cementum formation. J. Dent. Res. 78:1221-1229.

SEKVENSLISTE**[0201]**

<110> Alexion Pharma International SARL

5 <120> BEINSØKENDE ALKALISK FOSFATASE, SETT OG
FREMGANGSMÅTER FOR ANVENDELSE AV DETTE

<130> G66918PCEPT1

<140> EP 11004496.3

<141> 2008-05-12

<150> US 60/917,589

10 <151> 2007-05-11

<160> 19

<170> PatentIn versjon 3.3

<210> 1

<211> 743

15 <212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> hTNALP-FC-d10 med peptidsignal

<400> 1

Met Ile Ser Pro Phe Leu Val Leu Ala Ile Gly Thr Cys Leu Thr Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Lys Tyr Trp Arg Asp Gln
 20 25 30
 Ala Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Glu Leu Gln Lys Leu Asn Thr
 35 40 45
 Asn Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val
 50 55 60
 Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn
 65 70 75 80
 Pro Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Phe Val Ala
 85 90 95
 Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly
 100 105 110
 Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val
 115 120 125
 Gly Val Ser Ala Ala Thr Glu Arg Ser Arg Cys Asn Thr Thr Gln Gly
 130 135 140
 Asn Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser
 145 150 155 160

Val Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala
 165 170 175
 Ala Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met
 180 185 190
 Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu
 195 200 205
 Met His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
 210 215 220
 Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu
 225 230 235 240
 Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp
 245 250 255
 Lys Ser Phe Lys Pro Arg Tyr Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg
 260 265 270
 Thr Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val Asp Tyr Leu Leu Gly
 275 280 285
 Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val
 290 295 300
 Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val Ala Ile Gln Ile Leu
 305 310 315 320
 Arg Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile
 325 330 335
 Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala
 340 345 350
 Val Glu Met Asp Arg Ala Ile Gly Gln Ala Gly Ser Leu Thr Ser Ser
 355 360 365
 Glu Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr
 370 375 380
 Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro
 385 390 395 400
 Met Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly
 405 410 415
 Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser
 420 425 430
 Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro

435 440 445
 Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ser Lys
 450 455 460
 Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Val
 465 470 475 480
 Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Leu Gly His
 485 490 495
 Cys Ala Pro Ala Ser Ser Leu Lys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 500 505 510
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 515 520 525
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 530 535 540
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 545 550 555 560
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 565 570 575
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 580 585 590
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 595 600 605
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 610 615 620
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 625 630 635 640
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 645 650 655
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 660 665 670
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 675 680 685
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 690 695 700
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 705 710 715 720
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asp Ile Asp Asp Asp
 725 730 735
 Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
 740

<210> 2

<211> 502

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> hTNALP 1-502

<400> 2

```

Met Ile Ser Pro Phe Leu Val Leu Ala Ile Gly Thr Cys Leu Thr Asn
1      5      10     15
Ser Leu Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Lys Tyr Trp Arg Asp Gln
20     25     30
Ala Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Glu Leu Gln Lys Leu Asn Thr
35     40     45
Asn Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val
50     55     60
Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn
65     70     75     80
Pro Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Phe Val Ala
85     90     95
Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly
100    105    110
Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val
115    120    125
Gly Val Ser Ala Ala Thr Glu Arg Ser Arg Cys Asn Thr Thr Gln Gly
130    135    140
Asn Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser
145    150    155    160
Val Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala
165    170    175
Ala Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met
180    185    190
Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu

```

195	200	205
Met His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys 210 215 220		
Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu 225 230 235 240		
Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp 245 250 255		
Lys Ser Phe Lys Pro Arg Tyr Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg 260 265 270		
Thr Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val Asp Tyr Leu Leu Gly 275 280 285		
Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val 290 295 300		
Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val Ala Ile Gln Ile Leu 305 310 315 320		
Arg Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile 325 330 335		
Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala 340 345 350		
Val Glu Met Asp Arg Ala Ile Gly Gln Ala Gly Ser Leu Thr Ser Ser 355 360 365		
Glu Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr 370 375 380		
Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro 385 390 395 400		
Met Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly 405 410 415		
Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser 420 425 430		
Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro 435 440 445		
Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ser Lys 450 455 460		
Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Val 465 470 475 480		
Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Leu Gly His 485 490 495		
Cys Ala Pro Ala Ser Ser 500		

<210> 3

<211> 227

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> IgG-1 FC-fragment

<400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

5 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195

200

205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 4

<211> 726

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> hSTNALP-FC-d10 uten signalpeptid

<400> 4

Leu Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Lys Tyr Trp Arg Asp Gln Ala
 1 5 10 15
 Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Glu Leu Gln Lys Leu Asn Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser
 35 40 45
 Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn Pro
 50 55 60
 Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Phe Val Ala Leu
 65 70 75 80
 Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly Thr
 85 90 95
 Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val Gly
 100 105 110
 Val Ser Ala Ala Thr Glu Arg Ser Arg Cys Asn Thr Thr Gln Gly Asn
 115 120 125
 Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser Val
 130 135 140
 Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala Ala
 145 150 155 160
 Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met Pro
 165 170 175
 Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu Met
 180 185 190

His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys Tyr
 195 200 205
 Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu Lys
 210 215 220
 Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Phe Lys Pro Arg Tyr Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg Thr
 245 250 255
 Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val Asp Tyr Leu Leu Gly Leu
 260 265 270
 Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val Thr
 275 280 285
 Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val Ala Ile Gln Ile Leu Arg
 290 295 300
 Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp
 305 310 315 320
 His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala Val
 325 330 335
 Glu Met Asp Arg Ala Ile Gly Gln Ala Gly Ser Leu Thr Ser Ser Glu
 340 345 350
 Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr Phe
 355 360 365
 Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Met
 370 375 380
 Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly Asn
 385 390 395 400
 Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser Met
 405 410 415
 Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro Leu
 420 425 430
 Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ser Lys Gly
 435 440 445
 Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Val Pro
 450 455 460
 His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Leu Gly His Cys

465 470 475 480
 Ala Pro Ala Ser Ser Leu Lys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys .
 485 490 495
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 500 505 510
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 515 520 525
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 530 535 540
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 545 550 555 560
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 565 570 575
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 580 585 590
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 595 600 605
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 610 615 620
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 625 630 635 640
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 645 650 655
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 660 665 670
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 675 680 685
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 690 695 700
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asp Ile Asp Asp Asp Asp
 705 710 715 720
 Asp Asp Asp Asp Asp Asp
 725

<210> 5

<211> 485

<212> PRT

5 <213> Kunstig

<220>

<223> hsTNALP (18-502)

<400> 5

Leu Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Lys Tyr Trp Arg Asp Gln Ala
 1 5 10 15
 Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Glu Leu Gln Lys Leu Asn Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser
 35 40 45
 Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn Pro
 50 55 60
 Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Phe Val Ala Leu
 65 70 75 80
 Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly Thr
 85 90 95
 Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val Gly
 100 105 110
 Val Ser Ala Ala Thr Glu Arg Ser Arg Cys Asn Thr Thr Gln Gly Asn
 115 120 125
 Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser Val
 130 135 140
 Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala Ala
 145 150 155 160
 Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met Pro
 165 170 175
 Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu Met
 180 185 190
 His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys Tyr
 195 200 205
 Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu Lys
 210 215 220
 Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Phe Lys Pro Arg Tyr Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg Thr

245 250 255
 Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val Asp Tyr Leu Leu Gly Leu
 260 265 270
 Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val Thr
 275 280 285
 Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val Ala Ile Gln Ile Leu Arg
 290 295 300
 Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp
 305 310 315 320
 His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala Val
 325 330 335
 Glu Met Asp Arg Ala Ile Gly Gln Ala Gly Ser Leu Thr Ser Ser Glu
 340 345 350
 Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr Phe
 355 360 365
 Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Met
 370 375 380
 Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly Asn
 385 390 395 400
 Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser Met
 405 410 415
 Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro Leu
 420 425 430
 Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ser Lys Gly
 435 440 445
 Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Val Pro
 450 455 460
 His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Leu Gly His Cys
 465 470 475 480
 Ala Pro Ala Ser Ser
 485

<210> 6

<211> 524

5 <212> PRT

<213> bos taurus

<400> 6

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

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

Ala Gln Gln Thr Leu Lys Asn Ala Leu Arg Leu Gln Thr Leu Asn Thr
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu
 195 200 205

Met Tyr Asn Ile Lys Asp Ile Glu Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
 210 215 220

Tyr Met Phe Pro Lys Asn Arg Thr Asp Val Glu Tyr Glu Leu Asp Glu
 225 230 235 240

Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asn Leu Ile Asp Ile Trp
 245 250 255

Lys Ser Phe Lys Pro Lys His Lys His Ser His Tyr Val Trp Asn Arg
 260 265 270

Thr Asp Leu Leu Ala Leu Asp Pro His Ser Val Asp Tyr Leu Leu Gly
275 280 285

Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Ala
290 295 300

Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Glu Met Ala Ile Arg Ile Leu
305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Ala Ser Ala Ser Ser Ser Gly Ser Pro Ser Pro Gly Pro Leu Leu
500 505 510

Leu Leu Leu Ala Leu Leu Pro Leu Gly Ser Leu Phe
515 520

<210> 7

<211> 524

5 <212> PRT

<213> felis catus

<400> 7

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

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

Ala Gln Gln Thr Leu Lys Asn Ala Leu Arg Leu Gln Lys Leu Asn Thr
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu
195 200 205

Met His Asn Val Arg Asp Ile Glu Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
210 215 220

Tyr Met Phe Pro Lys Asn Arg Thr Asp Val Glu Tyr Glu Met Asp Glu
225 230 235 240

Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asn Leu Val Asp Ile Trp
245 250 255

Lys Ser Phe Lys Pro Arg His Lys His Ser His Tyr Val Trp Asn Arg
260 265 270

Thr Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro Tyr Gly Val Asp Tyr Leu Leu Gly
 275 280 285
 Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Ser Thr
 290 295 300
 Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Glu Ile Ala Ile Lys Ile Leu
 305 310 315 320
 Ser Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile
 325 330 335
 Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala
 340 345 350
 Val Glu Met Asp Gln Ala Ile Gly Arg Ala Gly Ala Met Thr Ser Val
 355 360 365
 Glu Asp Thr Leu Thr Ile Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr
 370 375 380
 Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro
 385 390 395 400
 Met Val Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ser Ile Leu Tyr Gly
 405 410 415
 Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser
 420 425 430
 Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro
 435 440 445
 Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Lys
 450 455 460
 Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Ile
 465 470 475 480
 Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Leu Asp His
 485 490 495
 Cys Ala Ser Ala Ser Ser Ala Gly Gly Pro Ser Pro Gly Pro Leu Phe
 500 505 510
 Leu Leu Leu Ala Leu Pro Ser Leu Gly Ile Leu Phe
 515 520

<210> 8

<211> 524

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu
195 200 205

Met His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
210 215 220

Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu
225 230 235 240

Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp
245 250 255

Lys Ser Phe Lys Pro Arg Tyr Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg
260 265 270

Thr Glu Leu₂₇₅ Leu Thr Leu Asp Pro₂₈₀ His Asn Val Asp Tyr₂₈₅ Leu Leu Gly

Leu Phe₂₉₀ Glu Pro Gly Asp Met₂₉₅ Gln Tyr Glu Leu Asn₃₀₀ Arg Asn Asn Val

Thr Asp Pro Ser Leu Ser₃₁₀ Glu Met Val Val Val₃₁₅ Ala Ile Gln Ile Leu₃₂₀

Arg Lys Asn Pro Lys₃₂₅ Gly Phe Phe Leu Leu₃₃₀ Val Glu Gly Gly Arg Ile₃₃₅

Asp His Gly His₃₄₀ His Glu Gly Lys Ala₃₄₅ Lys Gln Ala Leu His₃₅₀ Glu Ala

Val Glu Met₃₅₅ Asp Arg Ala Ile Gly₃₆₀ Gln Ala Gly Ser Leu Thr Ser Ser₃₆₅

Glu Asp Thr Leu Thr Val Val₃₇₅ Thr Ala Asp His Ser₃₈₀ His Val Phe Thr

Phe Gly Gly Tyr Thr Pro₃₉₀ Arg Gly Asn Ser Ile₃₉₅ Phe Gly Leu Ala Pro₄₀₀

Met Leu Ser Asp Thr₄₀₅ Asp Lys Lys Pro Phe₄₁₀ Thr Ala Ile Leu Tyr Gly₄₁₅

Asn Gly Pro Gly₄₂₀ Tyr Lys Val Val Gly₄₂₅ Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser₄₃₀

Met Val Asp₄₃₅ Tyr Ala His Asn Asn₄₄₀ Tyr Gln Ala Gln Ser₄₄₅ Ala Val Pro

Leu Arg His Glu Thr His Gly₄₅₅ Gly Glu Asp Val Ala₄₆₀ Val Phe Ser Lys

Gly Pro Met Ala His Leu₄₇₀ Leu His Gly Val His₄₇₅ Glu Gln Asn Tyr Val₄₈₀

Pro His Val Met Ala₄₈₅ Tyr Ala Ala Cys Ile₄₉₀ Gly Ala Asn Leu Gly₄₉₅ His

Cys Ala Pro Ala₅₀₀ Ser Ser Ala Gly Ser₅₀₅ Leu Ala Ala Gly Pro₅₁₀ Leu Leu

Leu Ala Leu Ala Leu Tyr Pro Leu₅₂₀ Ser Val Leu Phe

<210> 9

<211> 524

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu
 195 200 205

Met His Asn Ile Lys Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
 210 215 220

Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Arg Thr Asp Val Glu Tyr Glu Leu Asp Glu
 225 230 235 240

Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Ile Ser Ile Trp
 245 250 255

Lys Ser Phe Lys Pro Arg His Lys His Ser His Tyr Val Trp Asn Arg

260 265 270
 Thr Glu Leu Leu Ala Leu Asp Pro Ser Arg Val Asp Tyr Leu Leu Gly
 275 280 285
 Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Leu
 290 295 300
 Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Glu Val Ala Leu Arg Ile Leu
 305 310 315 320
 Thr Lys Asn Leu Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile
 325 330 335
 Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala
 340 345 350
 Val Glu Met Asp Gln Ala Ile Gly Lys Ala Gly Ala Met Thr Ser Gln
 355 360 365
 Lys Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr
 370 375 380
 Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro
 385 390 395 400
 Met Val Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly
 405 410 415
 Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Asp Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser
 420 425 430
 Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro
 435 440 445
 Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Lys
 450 455 460
 Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Ile
 465 470 475 480
 Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ser Cys Ile Gly Ala Asn Leu Asp His
 485 490 495
 Cys Ala Trp Ala Gly Ser Gly Ser Ala Pro Ser Pro Gly Ala Leu Leu
 500 505 510
 Leu Pro Leu Ala Val Leu Ser Leu Pro Thr Leu Phe
 515 520

<210> 10

<211> 524

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus/brunrotte

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu
 195 200 205

Met His Asn Ile Lys Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
 210 215 220

Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Arg Thr Asp Val Glu Tyr Glu Leu Asp Glu
 225 230 235 240

Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Ile Ser Ile Trp
 245 250 255

Lys Ser Phe Lys Pro Arg His Lys His Ser His Tyr Val Trp Asn Arg
 260 265 270
 Thr Glu Leu Leu Ala Leu Asp Pro Ser Arg Val Asp Tyr Leu Leu Gly
 275 280 285
 Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Leu
 290 295 300
 Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Glu Val Ala Leu Arg Ile Leu
 305 310 315 320
 Thr Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile
 325 330 335
 Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala
 340 345 350
 Val Glu Met Asp Glu Ala Ile Gly Lys Ala Gly Thr Met Thr Ser Gln
 355 360 365
 Lys Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr
 370 375 380
 Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro
 385 390 395 400
 Met Val Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly
 405 410 415
 Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Asp Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser
 420 425 430
 Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro
 435 440 445
 Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Lys
 450 455 460
 Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Ile
 465 470 475 480
 Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ser Cys Ile Gly Ala Asn Leu Asp His
 485 490 495
 Cys Ala Trp Ala Ser Ser Ala Ser Ser Pro Ser Pro Gly Ala Leu Leu
 500 505 510
 Leu Pro Leu Ala Leu Phe Pro Leu Arg Thr Leu Phe
 515 520

<210> 11

<211> 502

5 <212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 11

Glu Lys Asp Pro Lys Tyr Trp Arg Asp Gln Ala Gln Gln Thr Leu Lys
 1 5 10 15

Tyr Ala Leu Arg Leu Gln Asn Leu Asn Thr Asn Val Ala Lys Asn Val
 20 25 30

Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser Thr Val Thr Ala Thr
 35 40 45

Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn Pro Gly Glu Glu Thr Arg
 50 55 60

Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Asn
 65 70 75 80

Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly Thr Ala Thr Ala Tyr Leu
 85 90 95

Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val Gly Val Ser Ala Ala Thr
 100 105 110

Gln Arg Thr His Cys Asn Thr Thr Gln Gly Asn Glu Val Thr Ser Ile
 115 120 125

Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser Val Gly Ile Val Thr Thr
 130 135 140

Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala Ala Tyr Ala His Ser Ala
 145 150 155 160

Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met Pro Pro Glu Ala Leu Ser
 165 170 175

Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu Met His Asn Val Lys Asp
 180 185 190

Ile Glu Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met Phe Pro Lys Asn
 195 200 205

Arg Thr Asp Val Glu Tyr Glu Met Asp Glu Lys Ser Thr Gly Ala Arg
 210 215 220

Leu Asp Gly Leu Asn Leu Ile Asp Ile Trp Lys Asn Phe Lys Pro Arg
 225 230 235 240

His Lys His Ser His Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Leu Ala Leu
 245 250 255

100

Asp Pro Tyr Thr Val Asp Tyr Leu Leu Gly Leu Phe Asp Pro Gly Asp
 260 265 270
 Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val Thr Asp Pro Ser Leu Ser
 275 280 285
 Glu Met Val Glu Ile Ala Ile Lys Ile Leu Ser Lys Lys Pro Arg Gly
 290 295 300
 Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His Glu
 305 310 315 320
 Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala Val Glu Met Asp Arg Ala
 325 330 335
 Ile Gly Lys Ala Gly Val Met Thr Ser Leu Glu Asp Thr Leu Thr Val
 340 345 350
 Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr Phe Gly Gly Tyr Thr Pro
 355 360 365
 Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Met Val Ser Asp Thr Asp
 370 375 380
 Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Lys
 385 390 395 400
 Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser Met Val Asp Tyr Ala His
 405 410 415
 Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro Leu Arg His Glu Thr His
 420 425 430
 Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Lys Gly Pro Met Ala His Leu
 435 440 445
 Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Ile Pro His Val Met Ala Tyr
 450 455 460
 Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Gln Asp His Cys Ala Ser Ala Ser Ser
 465 470 475 480
 Ala Gly Gly Pro Ser Pro Gly Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 485 490 495
 Pro Val Gly Ile Leu Phe
 500

<210> 12

<211> 528

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Gln Gly Pro Trp Val Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Gly Val Ile Pro Ala Glu Glu Glu Asn Pro Ala Phe Trp Asn
 20 25 30
 Arg Gln Ala Ala Glu Ala Leu Asp Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ile
 35 40 45
 Gln Lys Val Ala Lys Asn Leu Ile Leu Phe Leu Gly Asp Gly Leu Gly
 50 55 60
 Val Pro Thr Val Thr Ala Thr Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Asn Gly
 65 70 75 80
 Lys Leu Gly Pro Glu Thr Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Leu
 85 90 95
 Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Arg Gln Val Pro Asp Ser Ala
 100 105 110
 Ala Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Phe Gln Thr
 115 120 125
 Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg
 130 135 140
 Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Gln Ala Gly Lys
 145 150 155 160
 Ser Val Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala
 165 170 175
 Gly Thr Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp
 180 185 190
 Met Pro Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln
 195 200 205
 Leu Ile Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys
 210 215 220
 Tyr Met Phe Pro Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Ala Asp Ala
 225 230 235 240
 Ser Gln Asn Gly Ile Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp
 245 250 255
 Leu Ala Lys His Gln Gly Ala Trp Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu
 260 265 270

Met Gln Ala Ser Leu Asp Gln Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe
275 280 285

Glu Pro Gly Asp Thr Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Pro Thr Leu Asp
290 295 300

Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg
305 310 315 320

Asn Pro Arg Gly Phe Tyr Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His
325 330 335

Gly His His Glu Gly Val Ala Tyr Gln Ala Leu Thr Glu Ala Val Met
340 345 350

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

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

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

Ala Gln Asp Ser Lys Ala Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro
405 410 415

Gly Tyr Val Phe Asn Ser Gly Val Arg Pro Asp Val Asn Glu Ser Glu
420 425 430

Ser Gly Ser Pro Asp Tyr Gln Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ser Ser
435 440 445

Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln
450 455 460

Ala His Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Ser Phe Val Ala His Val
465 470 475 480

Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala
485 490 495

Pro Pro Ala Cys Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Val Ala Ala Ser Leu
500 505 510

Pro Leu Leu Ala Gly Thr Leu Leu Leu Gly Ala Ser Ala Ala Pro
515 520 525

<210> 13

<211> 532

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Gln Gly Pro Trp Val Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn
 20 25 30
 Arg Gln Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala
 35 40 45
 Gln Thr Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly
 50 55 60
 Val Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp
 65 70 75 80
 Lys Leu Gly Pro Glu Thr Phe Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val
 85 90 95
 Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Ser Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly
 100 105 110
 Ala Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr
 115 120 125
 Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg
 130 135 140
 Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys
 145 150 155 160
 Ser Val Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala
 165 170 175
 Gly Ala Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp
 180 185 190
 Val Pro Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln
 195 200 205
 Leu Ile Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys
 210 215 220
 Tyr Met Phe Pro Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr
 225 230 235 240
 Ser Gln Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp
 245 250 255
 Leu Ala Lys His Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu

<210> 14

<211> 535

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Leu Gly Pro Cys Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg
 1 5 10 15
 Leu Gln Leu Ser Leu Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp
 20 25 30
 Phe Trp Asn Arg Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu
 35 40 45
 Gln Pro Ala Gln Thr Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp
 50 55 60
 Gly Met Gly Val Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln
 65 70 75 80
 Lys Lys Asp Lys Leu Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe
 85 90 95
 Pro Tyr Val Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro
 100 105 110
 Asp Ser Gly Ala Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn
 115 120 125
 Phe Gln Thr Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn
 130 135 140
 Thr Thr Arg Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys
 145 150 155 160
 Ala Gly Lys Ser Val Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala
 165 170 175
 Ser Pro Ala Gly Thr Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser
 180 185 190
 Asp Ala Asp Val Pro Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile
 195 200 205
 Ala Thr Gln Leu Ile Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly
 210 215 220
 Gly Arg Lys Tyr Met Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro
 225 230 235 240

Asp Asp Tyr Ser Gln Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val
 245 250 255
 Gln Glu Trp Leu Ala Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg
 260 265 270
 Thr Glu Leu Met Gln Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met
 275 280 285
 Gly Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser
 290 295 300
 Thr Leu Asp Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu
 305 310 315 320
 Leu Ser Arg Asn Pro Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg
 325 330 335
 Ile Asp His Gly His His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu
 340 345 350
 Thr Ile Met Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser
 355 360 365
 Glu Glu Asp Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe
 370 375 380
 Ser Phe Gly Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala
 385 390 395 400
 Pro Gly Lys Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly
 405 410 415
 Asn Gly Pro Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr
 420 425 430
 Glu Ser Glu Ser Gly Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro
 435 440 445
 Leu Asp Glu Glu Thr His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg
 450 455 460
 Gly Pro Gln Ala His Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile
 465 470 475 480
 Ala His Val Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys
 485 490 495
 Asp Leu Ala Pro Pro Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Arg
 500 505 510
 Ser Val Val Pro Ala Leu Leu Pro Leu Leu Ala Gly Thr Leu Leu Leu
 515 520 525
 Leu Glu Thr Ala Thr Ala Pro
 530 535

<210> 15

5 <211> 541

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> Konsensus-ALP: TNALP fra forskjellige pattedyrarter og de humane ALP-isozymerne PLAP, GCALP, IALP (med signalpeptid- og GPI-ankerdomene)

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> Xaa kan være en hvilken som helst naturlig forekommende aminosyre

<220>

<221> VARIANT

10 <222> (5)..(9)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(21)

15 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (22)..(22)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt fenylalanin

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(27)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (29)..(30)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (32)..(32)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (33)..(33)

35 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt cystein

<220>

<221> misc_feature

<222> (35)..(37)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(41)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(44)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(47)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(53)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

20 <220>
<221> VARIANT
<222> (54)..(54)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(55)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> VARIANT
<222> (56)..(56)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt serin eller valin

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(59)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT

<222> (67)..(67)

<223> xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt leucin, isoleucin eller valin

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (70)..(70)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (75)..(75)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (82)..(86)

15 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (88)..(88)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (90)..(91)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (93)..(93)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (96)..(96)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (99)..(100)

35 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (107)..(111)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
<222> (116)..(116)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt treonin

5 <220>
<221> VARIANT
<222> (117)..(117)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt serin

10 <220>
<221> VARIANT
<222> (128)..(128)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt aspartat

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (130)..(131)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

20 <220>
<221> VARIANT
<222> (133)..(133)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt metionin

<220>
<221> misc_feature
<222> (135)..(135)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> VARIANT
<222> (139)..(139)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt histidin eller asparagin

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (140)..(140)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>
<221> VARIANT
<222> (141)..(141)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt histidin

<220>
<221> misc_feature

<222> (142)..(143)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (148)..(148)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (153)..(153)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt alanin eller isoleucin

<220>

<221> misc_feature

<222> (155)..(158)

15 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (161)..(162)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (168)..(168)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

25 <221> VARIANT

<222> (175)..(175)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt aspartat

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (178)..(178)

<223> xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (180)..(180)

35 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (181)..(181)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt treonin

<220>
<221> VARIANT
<222> (182)..(182)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt treonin

5 <220>
<221> VARIANT
<222> (186)..(186)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt leucin

<220>
10 <221> misc_feature
<222> (187)..(188)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (190)..(190)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (195)..(195)
20 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
<222> (196)..(196)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt lysin eller
25 glysin

<220>
<221> VARIANT
<222> (197)..(197)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt treonin

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (199)..(200)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
35 <221> misc_feature
<222> (202)..(204)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature

<222> (207)..(207)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (211)..(211)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (214)..(215)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (217)..(217)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt fenylalanin

15 <220>

<221> VARIANT

<222> (218)..(218)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (221)..(221)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (224)..(224)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (232)..(237)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (239)..(239)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (242)..(243)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (245)..(248)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (250)..(250)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (255)..(256)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (258)..(260)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (262)..(262)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
<222> (263)..(265)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (266)..(268)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

30 <220>
<221> VARIANT
<222> (269)..(269)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt arginin

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (270)..(274)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature

<222> (279)..(279)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (281)..(286)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (287)..(287)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

<220>

<221> misc_feature

<222> (288)..(288)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (290)..(291)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (293)..(293)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

25 <222> (297)..(297)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt lysin

<220>

<221> VARIANT

<222> (301)..(301)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt valin, treonin eller isoleucin

<220>

<221> misc_feature

<222> (302)..(302)

35 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (305)..(305)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt prolin

<220>
<221> misc_feature
<222> (306)..(306)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (308)..(311)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (316)..(316)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (319)..(321)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (323)..(325)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (327)..(331)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> VARIANT
<222> (334)..(334)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt leucin

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (336)..(336)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (349)..(350)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature

<222> (352)..(353)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (356)..(356)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (358)..(359)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (360)..(360)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt aspartat

15 <220>

<221> VARIANT

<222> (361)..(361)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt treonin eller isoleucin

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (363)..(363)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (366)..(367)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (370)..(371)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (374)..(375)

35 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (379)..(379)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
<222> (380)..(380)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt metionin

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (390)..(390)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
10 <221> VARIANT
<222> (395)..(395)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt leucin

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (396)..(396)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (399)..(399)
20 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (407)..(410)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> VARIANT
<222> (411)..(411)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (413)..(413)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
35 <222> (415)..(415)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT

<222> (416)..(416)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt leucin

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (418)..(419)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (428)..(428)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (429)..(429)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt alanin

15 <220>

<221> VARIANT

<222> (430)..(430)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt metionin

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (431)..(431)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (433)..(433)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (435)..(435)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt lysin

<220>

<221> misc_feature

<222> (436)..(436)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (438)..(441)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
<222> (442)..(442)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt histidin

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (443)..(446)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
10 <221> misc_feature
<222> (448)..(449)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
15 <222> (451)..(451)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt prolin

<220>
<221> VARIANT
<222> (456)..(456)
20 <223> xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt histidin eller
cystein

<220>
<221> misc_feature
<222> (457)..(457)
25 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
<222> (461)..(461)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt serin eller
30 aspartat

<220>
<221> misc_feature
<222> (469)..(470)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>
<221> VARIANT
<222> (473)..(473)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt treonin

<220>
<221> misc_feature
<222> (477)..(477)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (481)..(481)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
10 <221> VARIANT
<222> (484)..(484)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt leucin

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (485)..(487)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (492)..(492)
20 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (494)..(494)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> VARIANT
<222> (496)..(496)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt fenylalanin

<220>
30 <221> VARIANT
<222> (497)..(497)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt arginin

<220>
<221> VARIANT
35 <222> (498)..(501)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

<220>
<221> misc_feature

<222> (502)..(507)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (509)..(516)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (517)..(520)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

<220>

<221> misc_feature

<222> (521)..(524)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (526)..(532)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (534)..(534)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

25 <222> (535)..(541)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

<400> 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Pro Xaa
 20 25 30

Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Leu
 35 40 45

Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Asn Xaa Ile Xaa Phe Leu Gly
 50 55 60

Asp Gly Xaa Gly Val Xaa Thr Val Thr Ala Xaa Arg Ile Leu Lys Gly
 65 70 75 80

Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Glu Xaa Xaa Leu Xaa Met Asp Xaa
 85 90 95

Phe Pro Xaa Xaa Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val
 100 105 110

Pro Asp Ser Xaa Xaa Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Xaa
 115 120 125

Asn Xaa Xaa Thr Xaa Gly Xaa Ser Ala Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 130 135 140

Asn Thr Thr Xaa Gly Asn Glu Val Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Lys
 145 150 155 160

Xaa Xaa Gly Lys Ser Val Gly Xaa Val Thr Thr Thr Arg Val Xaa His
 165 170 175

Ala Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Tyr Ala His Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Trp Tyr
 180 185 190

Ser Asp Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Gly Cys Xaa Asp
 195 200 205

Ile Ala Xaa Gln Leu Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Asp Ile Xaa Val Ile Xaa
 210 215 220

124

Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Glu
 225 230 235 240
 Tyr Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Arg Leu Asp Gly Xaa Xaa
 245 250 255
 Leu Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 260 265 270
 Xaa Xaa Trp Asn Arg Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285
 Val Xaa Xaa Leu Xaa Gly Leu Phe Xaa Pro Gly Asp Xaa Xaa Tyr Glu
 290 295 300
 Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Pro Ser Leu Xaa Glu Met Xaa Xaa
 305 310 315 320
 Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Phe Xaa Leu Xaa
 325 330 335
 Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His Glu Xaa Xaa Ala xaa
 340 345 350
 Xaa Ala Leu Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ala Ile Xaa Xaa Ala
 355 360 365
 Gly Xaa Xaa Thr Ser Xaa Xaa Asp Thr Leu Xaa Xaa Val Thr Ala Asp
 370 375 380
 His Ser His Val Phe Xaa Phe Gly Gly Tyr Xaa Xaa Arg Gly Xaa Ser
 385 390 395 400
 Ile Phe Gly Leu Ala Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Lys Xaa Xaa
 405 410 415
 Thr Xaa Xaa Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Gly
 420 425 430
 Xaa Arg Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa
 435 440 445
 Xaa Gln Xaa Ala Val Pro Leu Xaa Xaa Glu Thr His Xaa Gly Glu Asp
 450 455 460
 Val Ala Val Phe Xaa Xaa Gly Pro Xaa Ala His Leu Xaa His Gly Val
 465 470 475 480
 Xaa Glu Gln Xaa Xaa Xaa Xaa His Val Met Ala Xaa Ala Xaa Cys Xaa
 485 490 495
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa
 500 505 510
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 515 520 525
 Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 530 535 540

<210> 16

5 <211> 524

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

5 <223> Konsensus-TNALP fra forskjellige pattedyrarter (med signalpeptid- og GPI-ankerdomene)

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

20 <222> (18)..(18)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

25 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

35 <221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(42)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>
<221> VARIANT
<222> (51)..(51)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt serin eller valin

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(54)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (70)..(70)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (80)..(81)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (86)..(86)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (94)..(94)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature

<222> (135)..(135)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (137)..(138)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (157)..(157)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (177)..(177)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt treonin

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (210)..(210)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

20 <221> VARIANT

<222> (212)..(212)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt fenylalanin

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (213)..(213)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (216)..(216)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (227)..(227)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (231)..(231)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (238)..(238)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (242)..(243)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (245)..(245)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (251)..(251)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (253)..(255)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (258)..(258)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (262)..(263)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(269)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (274)..(274)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature

<222> (277)..(277)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (281)..(282)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (291)..(291)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt lysin

<220>

<221> misc_feature

<222> (303)..(304)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (314)..(315)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (317)..(318)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (321)..(321)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (323)..(325)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (357)..(357)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (361)..(361)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (364)..(365)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (368)..(369)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
10 <221> VARIANT
<222> (374)..(374)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen unntatt metionin

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (402)..(402)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (412)..(412)
20 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (425)..(425)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (463)..(463)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (475)..(475)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
35 <222> (480)..(480)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature

<222> (488)..(488)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (494)..(495)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (499)..(499)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (501)..(501)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (503)..(508)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (510)..(510)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (512)..(512)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (514)..(514)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (517)..(522)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<400> 16

Met Ile Xaa Pro Phe Leu Xaa Leu Ala Ile Gly Thr Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

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

Ala Gln Xaa Thr Leu Lys Xaa Ala Leu Xaa Leu Gln Xaa Leu Asn Thr
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu
 195 200 205

Met Xaa Asn Xaa Xaa Asp Ile Xaa Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
 210 215 220

Tyr Met Xaa Pro Lys Asn Xaa Thr Asp Val Glu Tyr Glu Xaa Asp Glu
 225 230 235 240

Lys Xaa Xaa Gly Xaa Arg Leu Asp Gly Leu Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Trp
 245 250 255

Lys Xaa Phe Lys Pro Xaa Xaa Lys His Ser His Xaa Xaa Trp Asn Arg
 260 265 270

Thr Xaa Leu Leu Xaa Leu Asp Pro Xaa Xaa Val Asp Tyr Leu Leu Gly

275 280 285
 Leu Phe Xaa Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Xaa Xaa
 290 295 300
 Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Ile Leu
 305 310 315 320
 Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile
 325 330 335
 Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala
 340 345 350
 Val Glu Met Asp Xaa Ala Ile Gly Xaa Ala Gly Xaa Xaa Thr Ser Xaa
 355 360 365
 Xaa Asp Thr Leu Thr Xaa Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr
 370 375 380
 Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro
 385 390 395 400
 Met Xaa Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Xaa Ile Leu Tyr Gly
 405 410 415
 Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Xaa Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser
 420 425 430
 Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro
 435 440 445
 Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Xaa Lys
 450 455 460
 Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val Xaa Glu Gln Asn Tyr Xaa
 465 470 475 480
 Pro His Val Met Ala Tyr Ala Xaa Cys Ile Gly Ala Asn Xaa Xaa His
 485 490 495
 Cys Ala Xaa Ala Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Leu Xaa
 500 505 510
 Leu Xaa Leu Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Phe
 515 520

<210> 17

<211> 2232

5 <212> DNA

<213> Kunstig

<220>

<223> hsTNALP-FcD10

<400> 17

atggtttcac cattcttagt actggccatt ggcacctgcc ttactaactc cttagtgcc	60
gagaaagaga aagaccccaa gtactggcga gaccaagcgc aagagacact gaaatatgcc	120
ctggagcttc agaagctcaa caccaacgtg gctaagaatg tcatcatgtt cctgggagat	180
gggatgggtg tctccacagt gacggctgcc cgcctcctca agggtcagct ccaccacaac	240
cctggggagg agaccaggct ggagatggac aagttccctc tcgtggccct ctccaagacg	300
tacaacacca atgccaggct ccctgacagc gccggcaccg ccaccgccta cctgtgtggg	360
gtgaaggcca atgagggcac cgtgggggta agcgcagcca ctgagcgttc ccggtgcaac	420
accaccaggg ggaacgagggt cacctccatc ctgcgctggg ccaaggacgc tgggaaatct	480
gtgggcattg tgaccaccac gagagtgaac catgccaccc ccagcgcgcg ctacgcccac	540
tcggctgacc gggactggta ctcagacaac gagatgcccc ctgaggcctt gagccagggc	600
tgtaaggaca tcgctacca gctcatgcat aacatcaggg acattgacgt gatcatggg	660
ggtggccgga aatacatgta cccaagaat aaaactgatg tggagtatga gagtgcagag	720
aaagccaggg gcacgaggct ggacggcctg gacctcgtg acacctggaa gagcttcaaa	780
ccgagataca agcactccca cttcatctgg aaccgcacgg aactcctgac ccttgacccc	840
cacaatgtgg actacctatt gggctctctc gagccagggg acatgcagta cgagctgaac	900
aggaacaacg tgacggaccc gtcactctcc gagatgggtg tgggtggccat ccagatcctg	960
cgaagaacc ccaaggcctt cttcttgctg gtggaaggag gcagaattga ccacgggcac	1020
catgaaggaa aagccaagca ggcctgcat gaggcgggtg agatggaccg ggccatcggg	1080
caggcaggca gcttgacctc ctggaagac actctgaccg tggctactgc ggaccattcc	1140
cacgtcttca catttggtgg atacaccccc cgtggcaact ctatctttgg tctggccccc	1200
atgctgagtg acacagacaa gaagcccttc actgccatcc tgtatggcaa tgggcctggc	1260
tacaagggtg tgggcgggtg acgagagaat gtctccatgg tggactatgc tcacaacaac	1320
taccaggcgc agtctgctgt gccctgcgc cagcagaccc acggcgggga ggacgtggcc	1380
gtcttctcca agggcccat ggcgacctg ctgcacggcg tccacgagca gaactacgtc	1440
ccccacgtga tggcgtatgc agcctgcac ggggcccaacc tcggccactg tgctcctgcc	1500
agctcgttta aggacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg	1560
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc	1620
cctgagggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	1680
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac	1740
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	1800
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc	1860
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca cagggtgtaca ccctgcccc atcccgggag	1920
gagatgacca agaaccagggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac	1980
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	2040
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	2100
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac	2160
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaagatatcg atgacgatga cgatgacgat	2220
gacgatgact ag	2232

<210> 18
 <211> 541
 <212> PRT
 <213> Kunstig

5 <220>
 <223> Konsensus-ALP/ALP: TNALP fra forskjellige pattedyrarter og de humane ALP-isozymene PLAP, GCALP, IALP (med signalpeptid- og GPI-ankerdomene)

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(4)
 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(9)
 15 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(21)
 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

20 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa er et serin eller et glysin

<220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (29)..(30)
 <223> xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 35 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa er et tyrosin eller et fenylalanin

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(37)
<223> xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(41)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(44)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(47)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(53)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
<222> (54)..(54)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(55)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(59)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature

<222> (70)..(70)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (75)..(75)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (82)..(86)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (88)..(88)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (90)..(91)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (93)..(93)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (96)..(96)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (99)..(100)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (107)..(111)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>

<221> VARIANT

<222> (116)..(117)

<223> Xaa er et alanin eller et glysin

<220>
<221> VARIANT
<222> (128)..(128)
<223> Xaa er et alanin eller et glysin

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (130)..(131)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
10 <221> VARIANT
<222> (133)..(133)
<223> Xaa er et valin eller et isoleucin

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (135)..(135)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
<222> (139)..(139)
20 <223> Xaa er et treonin eller et alanin

<220>
<221> misc_feature
<222> (140)..(140)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> VARIANT
<222> (141)..(141)
<223> Xaa er et arginin eller et fenylalanin

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (142)..(143)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
35 <222> (148)..(148)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature

<222> (155)..(158)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (161)..(162)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (168)..(168)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (175)..(175)

<223> Xaa er et asparagin eller et glutamin

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (178)..(178)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (180)..(180)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

25 <222> (181)..(181)

<223> Xaa er et alanin eller et glysin

<220>

<221> VARIANT

<222> (182)..(182)

30 <223> Xaa er et alanin, et serin eller et treonin

<220>

<221> VARIANT

<222> (186)..(186)

<223> Xaa er et serin eller et treonin

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (187)..(188)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (190)..(190)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (195)..(195)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
10 <221> VARIANT
<222> (196)..(196)
<223> Xaa er et glutamat eller et aspartat

<220>
<221> VARIANT
15 <222> (197)..(197)
<223> Xaa er et metionin eller et valin

<220>
<221> misc_feature
<222> (199)..(200)
20 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (202)..(204)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (207)..(207)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (211)..(211)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
35 <222> (214)..(215)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT

<222> (217)..(217)

<223> Xaa er et isoleucin, et valin eller et metionin

<220>

<221> VARIANT

5 <222> (218)..(218)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

<220>

<221> misc_feature

<222> (221)..(221)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (224)..(224)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (232)..(237)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (239)..(239)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (242)..(243)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (245)..(248)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (250)..(250)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (255)..(256)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (258)..(260)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (262)..(262)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
10 <221> VARIANT
<222> (263)..(265)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (266)..(268)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
<222> (269)..(269)
20 <223> Xaa er et lysin eller et glutamin

<220>
<221> misc_feature
<222> (270)..(274)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (279)..(279)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (281)..(286)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
35 <222> (287)..(287)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

<220>
<221> misc_feature

<222> (288)..(288)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (290)..(291)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (293)..(293)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (297)..(297)

<223> Xaa er et glutamat eller et aspartat

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (302)..(302)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

20 <221> VARIANT

<222> (305)..(305)

<223> Xaa er et leucin eller et isoleucin

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (306)..(306)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (308)..(311)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (316)..(316)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (319)..(321)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (323)..(325)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (327)..(331)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
10 <221> VARIANT
<222> (334)..(334)
<223> Xaa er et fenylalanin eller et tyrosin

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (336)..(336)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (349)..(350)
20 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (352)..(353)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (356)..(356)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (358)..(359)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
35 <222> (360)..(360)
<223> Xaa er et glutamat eller et metionin

<220>
<221> VARIANT

<222> (361)..(361)

<223> Xaa er et metionin eller et fenylalanin

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (363)..(363)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (366)..(367)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (370)..(371)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (374)..(375)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (379)..(379)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

25 <222> (380)..(380)

<223> Xaa er et valin, et isoleucin eller et leucin

<220>

<221> misc_feature

<222> (390)..(390)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (395)..(395)

<223> Xaa er et treonin eller et prolin

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (396)..(396)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (399)..(399)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (407)..(410)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
10 <221> VARIANT
<222> (411)..(411)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (413)..(413)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (415)..(415)
20 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
<222> (416)..(416)
<223> Xaa er et fenylalanin eller et tyrosin

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (418)..(419)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (428)..(428)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
35 <222> (429)..(429)
<223> Xaa er et valin, et leucin eller et fenylalanin

<220>
<221> VARIANT

<222> (430)..(430)

<223> Xaa er et valin, et lysin eller et asparagin

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (431)..(431)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (433)..(433)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (435)..(435)

<223> Xaa er et glutamat eller et prolin

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (436)..(436)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (438)..(441)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

25 <222> (442)..(442)

<223> Xaa er et tyrosin eller et serin

<220>

<221> misc_feature

<222> (443)..(446)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (448)..(449)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>

<221> VARIANT

<222> (451)..(451)

<223> Xaa er et serin eller et alanin

<220>
<221> VARIANT
<222> (456)..(456)
<223> Xaa er et arginin, et aspartat eller et serin

5 <220>
<221> VARIANT
<222> (456)..(456)
<223> xaa er et arginin, et aspartat eller et serin

<220>
10 <221> misc_feature
<222> (457)..(457)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
15 <222> (461)..(461)
<223> Xaa er et glysin eller et alanin

<220>
<221> misc_feature
<222> (469)..(470)
20 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
<222> (473)..(473)
<223> Xaa er et metionin eller et glutamin

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (477)..(477)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (481)..(481)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
35 <222> (484)..(484)
<223> Xaa er et asparagin, et treonin eller et serin

<220>
<221> misc_feature

<222> (485)..(487)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (492)..(492)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (494)..(494)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (496)..(496)

<223> Xaa er et isoleucin eller et leucin

15 <220>

<221> VARIANT

<222> (497)..(497)

<223> Xaa er et glysin eller et glutamat

<220>

20 <221> VARIANT

<222> (498)..(501)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (502)..(507)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (509)..(516)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (517)..(520)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (521)..(524)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (526)..(532)
 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (534)..(534)
 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

10 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (535)..(540)
 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen eller fraværende

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (541)..(541)
 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<400> 18

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Pro Xaa
 20 25 30

Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Leu
 35 40 45

Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Lys Asn Xaa Ile Xaa Phe Leu Gly
 50 55 60
 Asp Gly Met Gly Val Xaa Thr Val Thr Ala Xaa Arg Ile Leu Lys Gly
 65 70 75 80
 Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Glu Xaa Xaa Leu Xaa Met Asp Xaa
 85 90 95
 Phe Pro Xaa Xaa Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val
 100 105 110
 Pro Asp Ser Xaa Xaa Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Xaa
 115 120 125
 Asn Xaa Xaa Thr Xaa Gly Xaa Ser Ala Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 130 135 140
 Asn Thr Thr Xaa Gly Asn Glu Val Thr Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Lys
 145 150 155 160
 Xaa Xaa Gly Lys Ser Val Gly Xaa Val Thr Thr Thr Arg Val Xaa His
 165 170 175
 Ala Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Tyr Ala His Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Trp Tyr
 180 185 190
 Ser Asp Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Gly Cys Xaa Asp
 195 200 205
 Ile Ala Xaa Gln Leu Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Asp Ile Xaa Val Ile Xaa
 210 215 220
 Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Glu
 225 230 235 240
 Tyr Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Arg Leu Asp Gly Xaa Xaa
 245 250 255
 Leu Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 260 265 270
 Xaa Xaa Trp Asn Arg Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285
 Val Xaa Xaa Leu Xaa Gly Leu Phe Xaa Pro Gly Asp Met Xaa Tyr Glu
 290 295 300
 Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Pro Ser Leu Xaa Glu Met Xaa Xaa
 305 310 315 320

Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Phe Xaa Leu Xaa
325 330 335

Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His Glu Xaa Xaa Ala Xaa
340 345 350

Xaa Ala Leu Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ala Ile Xaa Xaa Ala
355 360 365

Gly Xaa Xaa Thr Ser Xaa Xaa Asp Thr Leu Xaa Xaa Val Thr Ala Asp
370 375 380

His Ser His Val Phe Xaa Phe Gly Gly Tyr Xaa Xaa Arg Gly Xaa Ser
385 390 395 400

Ile Phe Gly Leu Ala Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Lys Xaa Xaa
405 410 415

Thr Xaa Xaa Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Gly
420 425 430

Xaa Arg Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa
435 440 445

Xaa Gln Xaa Ala Val Pro Leu Xaa Xaa Glu Thr His Xaa Gly Glu Asp
450 455 460

Val Ala Val Phe Xaa Xaa Gly Pro Xaa Ala His Leu Xaa His Gly Val
465 470 475 480

Xaa Glu Gln Xaa Xaa Xaa Xaa His Val Met Ala Xaa Ala Xaa Cys Xaa
485 490 495

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa
500 505 510

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
515 520 525

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
530 535 540

<210> 19

<211> 524

<212> PRT

5 <213> Kunstig

<220>

<223> Konsensus-TNALP fra forskjellige pattedyrarter (med signalpeptid- og GPI-ankerdomene)

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(16)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(42)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature

<222> (45)..(45)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (54)..(54)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (70)..(70)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (80)..(81)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (86)..(86)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (94)..(94)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (135)..(135)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (137)..(138)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (157)..(157)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>

<221> VARIANT

<222> (177)..(177)

<223> Xaa kan være et serin eller et alanin

<220>
<221> misc_feature
<222> (210)..(210)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> VARIANT
<222> (212)..(212)
<223> Xaa kan være isoleucin eller valin

<220>
10 <221> misc_feature
<222> (213)..(213)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (216)..(216)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (227)..(227)
20 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (231)..(231)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (238)..(238)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (242)..(243)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
35 <222> (245)..(245)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature

<222> (251)..(251)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (253)..(255)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (258)..(258)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (262)..(263)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (268)..(269)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (274)..(274)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (277)..(277)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (281)..(282)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> VARIANT

<222> (291)..(291)

<223> Xaa kan være et glutamat eller et aspartat

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (303)..(304)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (314)..(315)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (317)..(318)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
10 <221> misc_feature
<222> (321)..(321)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (323)..(325)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (357)..(357)
20 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> misc_feature
<222> (361)..(361)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (364)..(365)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (368)..(369)
<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
<221> VARIANT
35 <222> (374)..(374)
<223> Xaa kan være et valin eller et isoleucin

<220>
<221> misc_feature

<222> (402)..(402)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (412)..(412)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (425)..(425)

10 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (463)..(463)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (475)..(475)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (480)..(480)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (488)..(488)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (494)..(495)

30 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>

<221> misc_feature

<222> (499)..(499)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (501)..(501)

<223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (503)..(508)
 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (510)..(510)
 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (512)..(512)
 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (514)..(514)
 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (517)..(522)
 <223> Xaa kan være enhver aminosyre som forekommer i naturen

<400> 19

Met Ile Xaa Pro Phe Leu Xaa Leu Ala Ile Gly Thr Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

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

Ala Gln Xaa Thr Leu Lys Xaa Ala Leu Xaa Leu Gln Xaa Leu Asn Thr
 35 40 45

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

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

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

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

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

Gly Val Ser Ala Ala Thr Xaa Arg Xaa Xaa Cys Asn Thr Thr Gln Gly
 130 135 140
 Asn Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Xaa Gly Lys Ser
 145 150 155 160
 Val Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala
 165 170 175
 Xaa Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met
 180 185 190
 Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu
 195 200 205
 Met Xaa Asn Xaa Xaa Asp Ile Xaa Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
 210 215 220
 Tyr Met Xaa Pro Lys Asn Xaa Thr Asp Val Glu Tyr Glu Xaa Asp Glu
 225 230 235 240
 Lys Xaa Xaa Gly Xaa Arg Leu Asp Gly Leu Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Trp
 245 250 255
 Lys Xaa Phe Lys Pro Xaa Xaa Lys His Ser His Xaa Xaa Trp Asn Arg
 260 265 270
 Thr Xaa Leu Leu Xaa Leu Asp Pro Xaa Xaa Val Asp Tyr Leu Leu Gly
 275 280 285
 Leu Phe Xaa Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Xaa Xaa
 290 295 300
 Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Ile Leu
 305 310 315 320
 Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile
 325 330 335
 Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala
 340 345 350
 Val Glu Met Asp Xaa Ala Ile Gly Xaa Ala Gly Xaa Xaa Thr Ser Xaa
 355 360 365
 Xaa Asp Thr Leu Thr Xaa Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr
 370 375 380
 Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro
 385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

Cys Ala Xaa Ala Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Leu Xaa
 500 505 510

Leu Xaa Leu Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Phe
 515 520

P a t e n t k r a v

1. Beinsøkende alkalisk fosfatase omfattende et polypeptid med følgende struktur:

Z-sALP- Y-avstandsstykke-X-W_n- V,

der sALP er det ekstracellulære domenet til alkalisk fosfatase;

der V er fraværende eller er en aminosyresekvens av minst én aminosyre;

X er fraværende eller er en aminosyresekvens av minst én aminosyre;

Y er fraværende eller er en aminosyresekvens av minst én aminosyre;

Z er fraværende eller er en aminosyresekvens av minst én aminosyre;

W_n er et polyaspartat eller et polyglutamat der n = 10 til 16; og

avstandsstykket omfatter en fragmentkrystalliserbar region (Fc),

der sALP er fysiologisk aktivt mot fosfoetanolamin (PEA), uorganisk pyrofosfat (PPi) og pyridoksalt 5'-fosfat (PLP).

2. Den alkaliske fosfatasen ifølge krav 1, der Fc omfatter et CH₂-domene, et CH₃-domene og et hengselområde, eller der Fc er et konstant domene av et immunglobulin valgt fra gruppen som består av IgG-1, IgG-2, IgG-3 og IgG-4, og fortrinnsvis der Fc er et konstant domene av et immunglobulin IgG-1.

3. Den alkaliske fosfatasen ifølge krav 2, der Fc er som fremsatt i SEQ ID NO: 3.

4. Den alkaliske fosfatase ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, der

a) sALP omfatter aminosyrerestene 23-508 av SEQ ID NO: 15, fortrinnsvis der sALP består av aminosyrerestene 23-512 i SEQ ID NO: 15, eller

b) sALP omfatter aminosyrerestene 23-508 i SEQ ID NO: 18, fortrinnsvis der sALP består av aminosyrerestene 23-512 i SEQ ID NO: 18, eller

c) sALP omfatter aminosyrerestene 18-498 i SEQ ID NO: 16, fortrinnsvis der sALP består av aminosyrerestene 18-502 i SEQ ID NO: 16, eller

d) sALP omfatter aminosyrerestene 18-498 i SEQ ID NO: 19, fortrinnsvis der sALP består av aminosyrerestene 18-502 i SEQ ID NO: 19.

5. Den alkaliske fosfatasen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, der sALP er det ekstracellulære domenet til en vevs-ikke-spesifikk alkalisk fosfatase.

6. Den alkaliske fosfatasen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, der W_n er et polyaspartat, fortrinnsvis der n = 10.

7. Den alkaliske fosfatasen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, der Z er fraværende og/eller der V er fraværende.

8. Den alkaliske fosfatasen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, der

- 5 a) Y er to aminosyrerester, fortrinnsvis der Y er leucin-lysin; og/eller
b) X er to aminosyrerester, fortrinnsvis der X er aspartat-isoleucin.

9. Den alkaliske fosfatasen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8, omfattende polypeptidet i en form omfattende en dimer.

10

10. Den alkaliske fosfatasen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, der den alkaliske fosfatasen består av polypeptidet, og der Z og V er fraværende.

11. Farmasøytisk sammensetning omfattende den alkaliske fosfatasen ifølge et
15 hvilket som helst av kravene 1 til 10 og en farmasøytisk akseptabel bærer, fortrinnsvis der den farmasøytisk akseptable bæreren er en saltløsning, mer foretrukket der den alkaliske fosfatasen er i en lyofilisert form.

12. Den alkaliske fosfatasen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, eller den
20 farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 11, for anvendelse som et medikament, fortrinnsvis der den alkaliske fosfatasen er i en daglig dose på omtrent 0,2 til omtrent 20 mg/kg, eller en ukentlig dose på omtrent 1,4 til omtrent 140 mg/kg.

13. Isolert nukleinsyre omfattende eller bestående av en sekvens som koder for
25 polypeptidet definert i et hvilket som helst av kravene 1 til 8.

14. Rekombinant uttrykingsvektor omfattende nukleinsyren ifølge krav 13.

15. Rekombinant adeno-assosiert virusvektor omfattende nukleinsyren ifølge krav
30 13.

16. Isolert rekombinant vertscelle omgjort eller transfektert med vektoren ifølge krav 14 eller 15.

17. Fremgangsmåte for å produsere den alkaliske fosfatasen i et hvilket som helst av
35 kravene 1 til 10, omfattende dyrkning av vertscellen ifølge krav 16, under forhold som egner seg for å bevirke uttrykking av den alkaliske fosfatasen, og restituere den alkaliske fosfatasen fra dyrkningsmediet, fortrinnsvis der vertscellen er en L-celle, C127-celle, 3T3-celle, BHK-celle, COS-7-celle, eller kinesisk hamsterovariecelle

(CHO-celle), mer fortrinnsvis der vertscellen er en kinesisk hamsterovariecelle (CHO-celle), mer fortrinnsvis der vertscellen er en CHO-DG44-celle.

18. Sett omfattende den alkaliske fosfatasen som angitt i et hvilket som helst av kravene 1 til 10, og instruksjoner for anvendelse i en fremgangsmåte for å korrigere eller forebygge en hypofosfatase (HPP) fenotype.

19. Alkalisk fosfatase som angitt i et hvilket som helst av kravene 1 til 10 for anvendelse i en fremgangsmåte for å korrigere eller forebygge minst én hypofosfatase (HPP) fenotype hos et individ med behov for dette.

20. Den alkaliske fosfatasen for anvendelse ifølge krav 19, der

a) individet har minst én HPP-fenotype, fortrinnsvis der

i) den minst ene HPP-fenotypen omfatter HPP-relaterte anfall, eller

ii) den minst ene HPP-fenotypen omfatter for tidlig tap av melketenner, eller

iii) den minst ene HPP-fenotypen omfatter ufullstendig beinmineralisering, fortrinnsvis der ufullstendig beinmineralisering er ufullstendig lårbensbeinmineralisering eller ufullstendig skinnebeinsmineralisering, eller ufullstendig metatarsal

beinmineralisering, eller ufullstendig ribbeinmineralisering, eller

iv) den minst ene HPP-fenotypen omfatter forhøyede blod- og/eller urinnivåer av uorganisk pyrofosfat (PPi), eller

v) den minst ene HPP-fenotypen omfatter forhøyede blod- og/eller urinnivåer av fosfoetanolamin (PEA), eller

vi) den minst ene HPP-fenotypen omfatter forhøyede blod- og/eller urinnivåer av pyridoksal-5'-fosfat (PLP), eller

vii) den minst ene HPP-fenotypen omfatter utilstrekkelig vektøkning, eller

viii) den minst ene HPP-fenotypen omfatter rakitt, eller

ix) den minst ene HPP-fenotypen omfatter beinsmerte, eller

x) den minst ene HPP-fenotypen omfatter kalsiumpyrofosfatdihydratkrySTALLAVSETNING, eller

xi) den minst ene HPP-fenotypen omfatter aplasi, hypoplasi eller dysplasi av dental cementum

21. Den alkaliske fosfatasen for anvendelse ifølge krav 19 eller 20, der individet som trenger det har

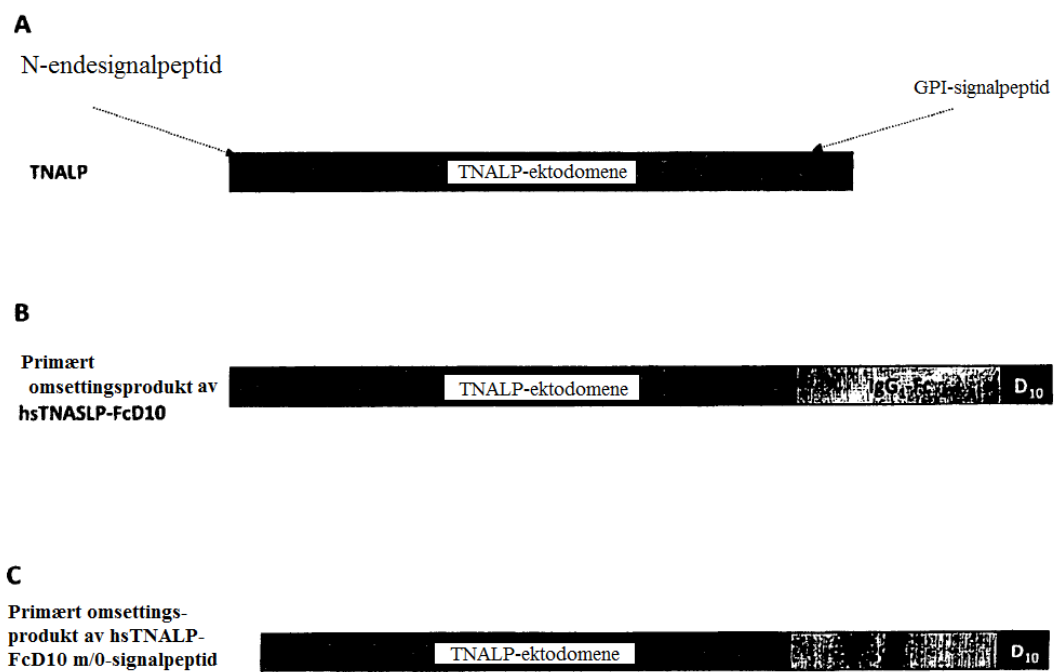
a) infantil HPP; eller

b) barndoms HPP; eller

c) perinatal HPP; eller

- d) voksen HPP; eller
- e) odontohypofosfatasi HPP.

- 5 **22.** Den alkaliske fosfatasen for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 19 til 21, der anvendelsen omfatter å transfektere en celle i individet med en nukleinsyre som koder for den alkaliske fosfatasen, særlig der transfeksjonen av cellen utføres *in vitro*, slik at den alkaliske fosfatasen uttrykkes og utskilles i en aktiv form, og administreres til individet med cellen.
- 10 **23.** Den alkaliske fosfatasen for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 19 til 21, der anvendelsen omfatter subkutan eller intravenøs administrering av den alkaliske fosfatasen til individet.



Figur 1

Proteinsekvens for sTNALP-FcD₁₀ med peptidsignalet.

MISPFLVLAIGTCLTNSLVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTV
TAARILKGQLHHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAAT
ERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC
KDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKNKTDVEYESDEKARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYKSHSF
IWNRTELLTLDPHNVLDYLLGLFEPGDMQYELNRNNVTDPSSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGR
IDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSSSEDTLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPML
SDTDKKPFTAILYGNPGYKVVGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMAH
LLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSLKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGKDI DDDD
 DDDDDD

10	20	30	40	50	60
MIS	PFLVLA	I	GTCLTNSL	VP	EKEKDPKYWR
70	80	90	100	110	120
GMGVSTV	TAA	RILKGQLHHN	PGEETRLEMD	KFPFVALSKT	YNTNAQVPDS
130	140	150	160	170	180
VKANEGTVGV	SAATERSRCN	TTQGNEVTSI	LRWAKDAGKS	VGIVTTTRVN	HATPSAAYAH
190	200	210	220	230	240
SADRDWYSDN	EMPPEALSQG	CKDIAYQLMH	NIRDIDVIMG	GGRKYMYPKN	KTDVEYESDE
250	260	270	280	290	300
KARGTRLDGL	DLVDTWKSFK	PRYKSHSHFIW	NRTELLTLDP	HNVDYLLGLF	EPGDMQYELN
310	320	330	340	350	360
RNNVTDPSSL	EMVVVAIQIL	RKNPKGFFLL	VEGGRIDHGH	HEGKAKQALH	EAVEMDRAIG
370	380	390	400	410	420
QAGSLTSSSED	TLTVVTADHS	HVFTFGGYTP	RGNSIFGLAP	MLSDTDKPPF	TAILYGNPGP
430	440	450	460	470	480
YKVVGGEREN	VSMVDYAHNN	YQAQSAVPLR	HETHGGEDVA	VFSKGPMAHL	LHGVHEQNYV
490	500	510	520	530	540
PHVMAYAACI	GANLGHCAPA	SSLKDKTHTC	PPCPAPELLG	GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT
550	560	570	580	590	600
PEVTCVVVDV	SHEDPEVKFN	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQY	NSTYRVVSVL	TVLHQDWLNG
610	620	630	640	650	660
KEYKCKVSNK	ALPAPIEKT	ISKAKGQPREP	QVYTLPPSR	EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD
670	680	690	700	710	720
IAVEWESNGQ	PENNYKTTTP	VLDSDGSFFL	YSKLTVDKSR	WQQGNVFSCS	VMHEALHNNHY
730	740				
TQKSLSLSPG	KDIDDDDDDD	DDD			

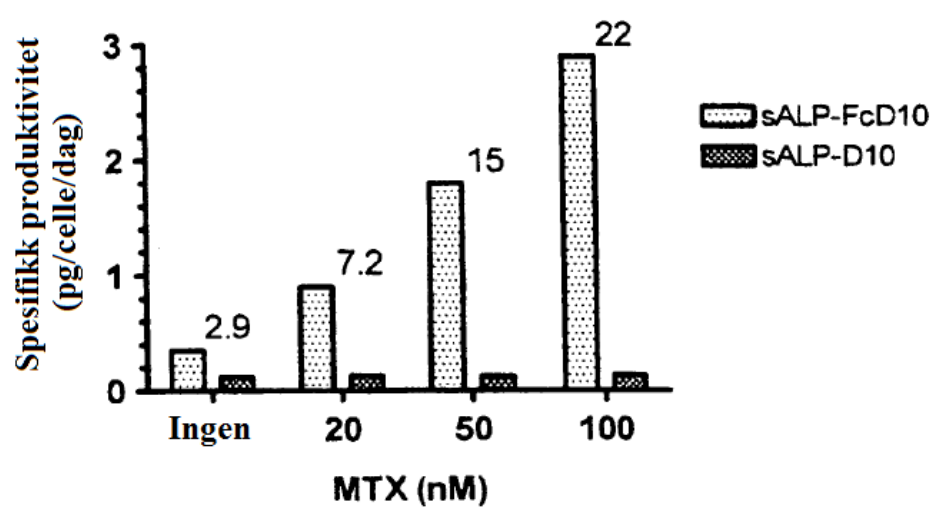
Figur 2

Proteinsekvens for sTNALP-FcD₁₀ uten peptidsignalet.

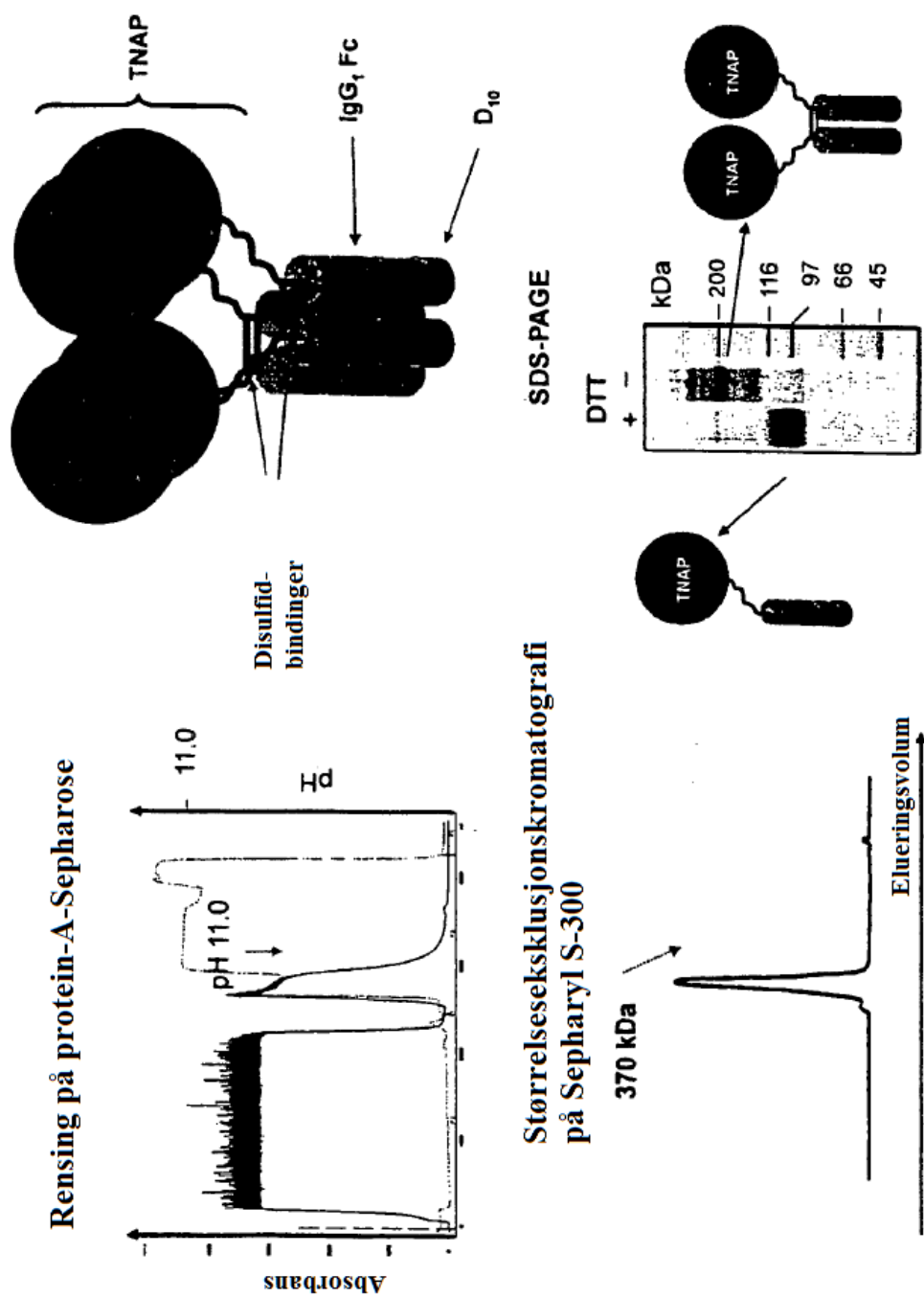
LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYLELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTAARILKGQLHNP
 GEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAATERSRCNTTQGN
 EVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSAARDWYSDNEMPPEALSQGCKDIAYQLM
 HNIRDIDVIMGGGRKYMYPKPKNTDVEYESDEKARGTRL DGLDLVDTWKSFKPRYKSHFIWNR
 ELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRNNVTDP SLSEM VVAIQILRKNPKGFFLLVEGGRID
 HGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSS EDTLT VVTADHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPM
 LSDTDK KPFTAILYGNPGYKVVGGEREN VSMVDYAHNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKG
 PMAHLLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSLKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPGKDIDDDDDDDDDDD

10	20	30	40	50	60
LVPEKEKDPK	YWRDQAQETL	KYALELQKLN	TNVAKNVIMF	LGDGMGVSTV	TAARILKGQL
70	80	90	100	110	120
HNHPGEETRL	EMDKFPFVAL	SKTYNTNAQV	PDSAGTATAY	LCGVKANEGT	VGVSATERS
130	140	150	160	170	180
RCNTTQGNEV	TSILRWAKDA	GKSVGIVTTT	RVNHATPSAA	YAHSAARDWY	SDNEMPPEAL
190	200	210	220	230	240
SQGCKDIAYQ	LMHNIRDIDV	IMGGGRKYM	PKPKTDVEYE	SDEKARGTRL	DGLDLVDTWK
250	260	270	280	290	300
SFKPRYKSH	FIWNRTELLT	LDPHNVDYLL	GLFEPGDMQY	ELNRNNVTDP	SLSEM VVAI
310	320	330	340	350	360
QILRKNPKGF	FLLVEGGRID	HGHHEGKAKQ	ALHEAVEMDR	AIGQAGSLTS	SEDTLT VVT
370	380	390	400	410	420
DHSHVFTFGG	YTPRGNSIFG	LAPMLSDTDK	KPFTAILYGN	GPGYKVVGG	RENVSMVDYA
430	440	450	460	470	480
HNHYQAQSAV	PLRHETHGGE	DVAVFSKGPM	AHLLHGVHEQ	NYVPHVMAYA	ACIGANLGH
490	500	510	520	530	540
APASSLKDKT	HTCPPCPAPE	LLGGPSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV
550	560	570	580	590	600
KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE
610	620	630	640	650	660
KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	SREEMTKNQV	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT
670	680	690	700	710	720
TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD	KSRWQQGNV	SCSVMEALH	NHYTQKSLSL	SPGKDIDDD

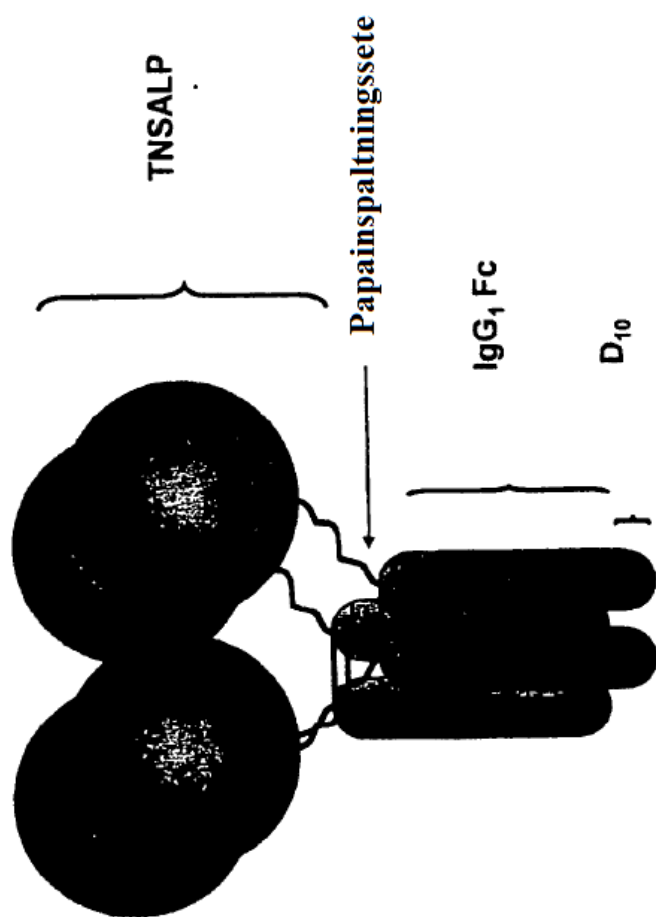
DDDDDD



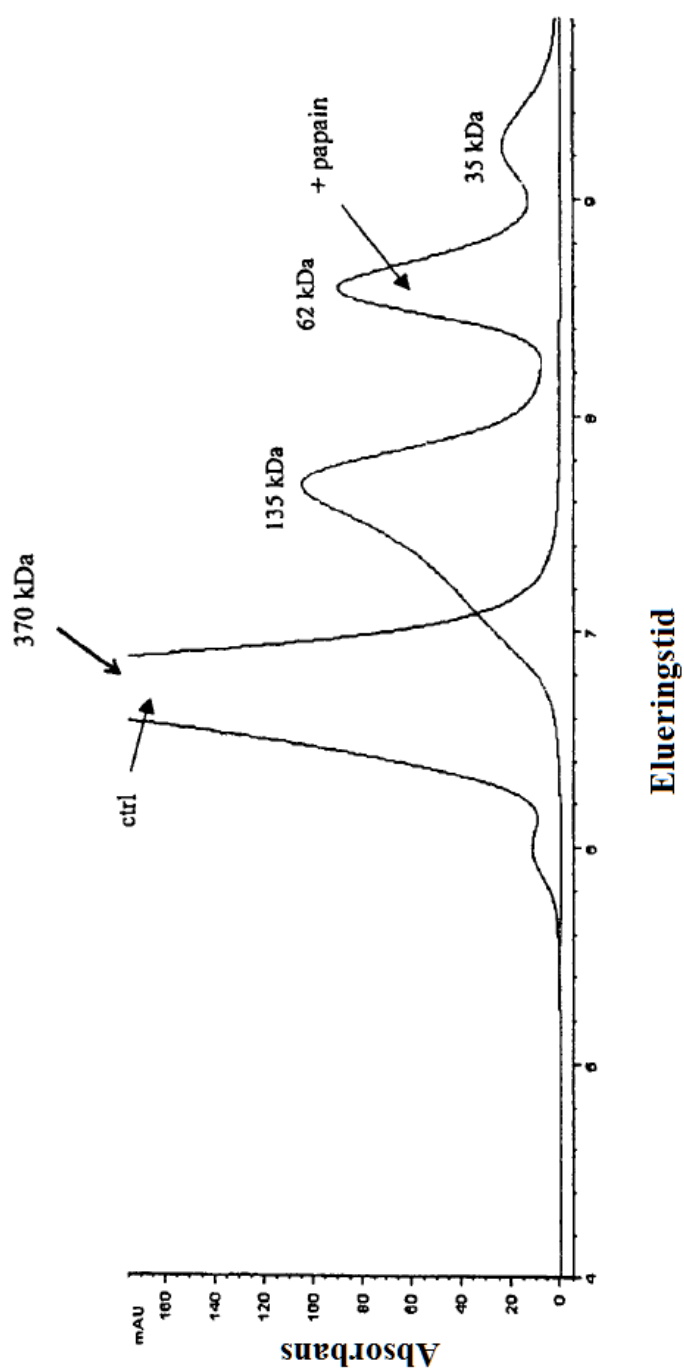
Figur 4



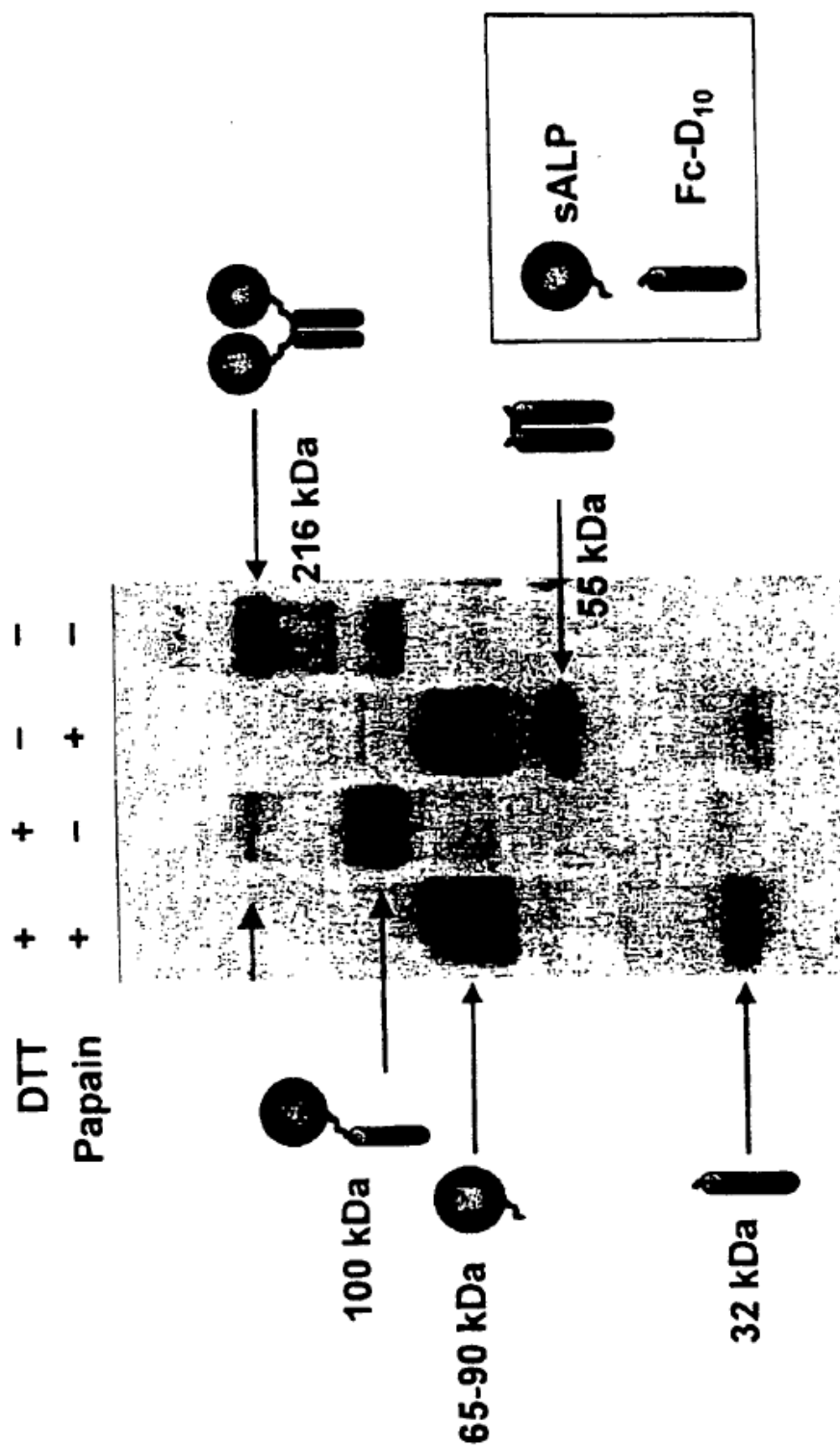
Figur 5



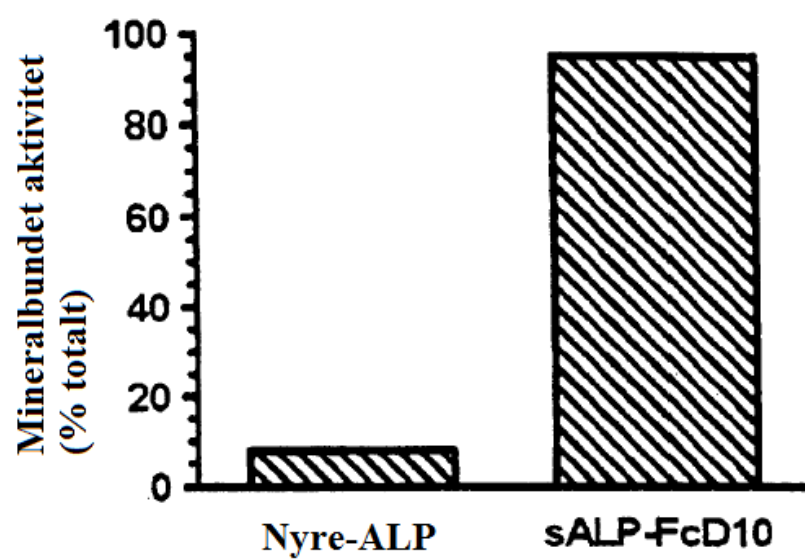
Figur 6



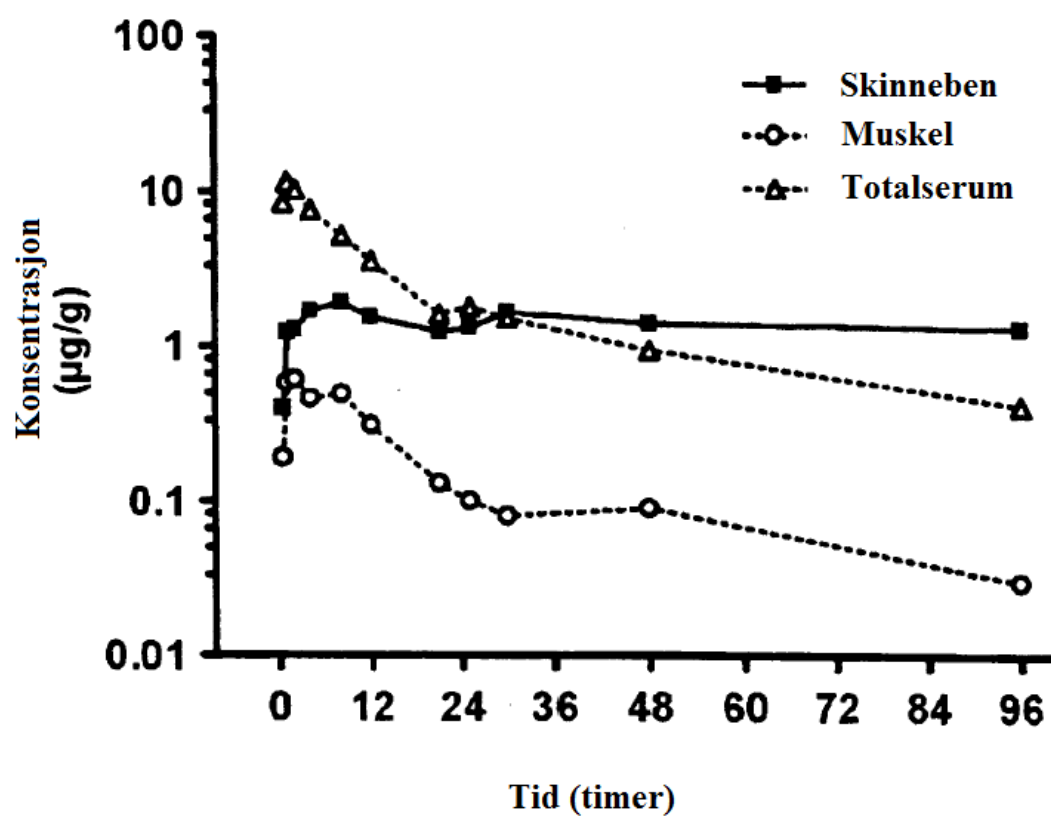
Figur 7



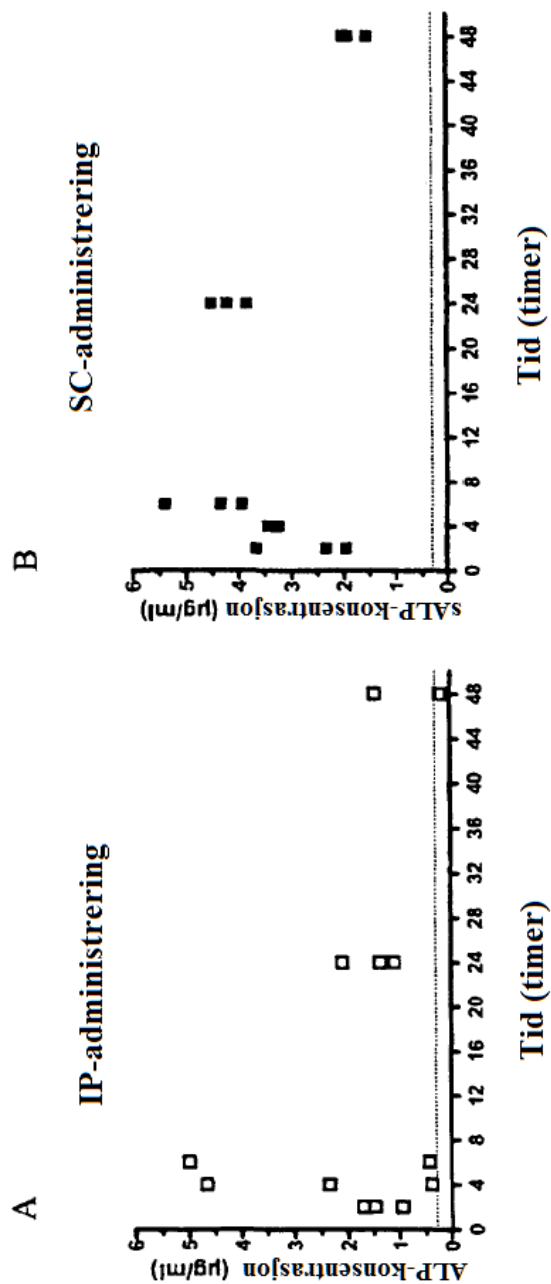
Figur 8



Figur 9

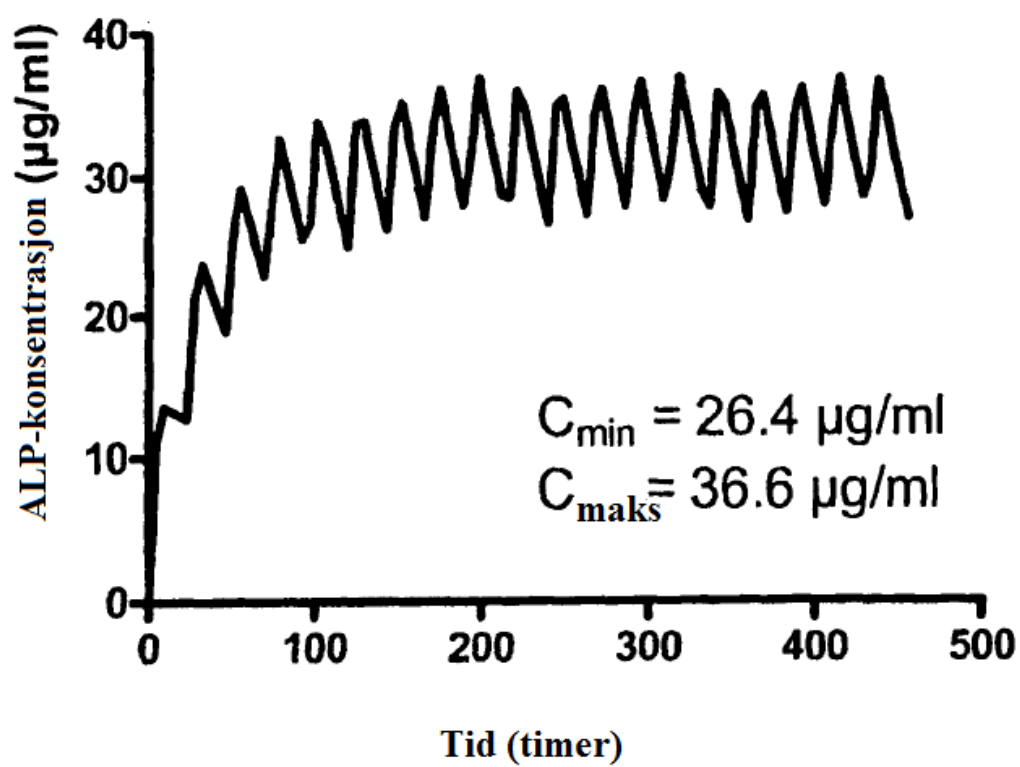


Figur 10

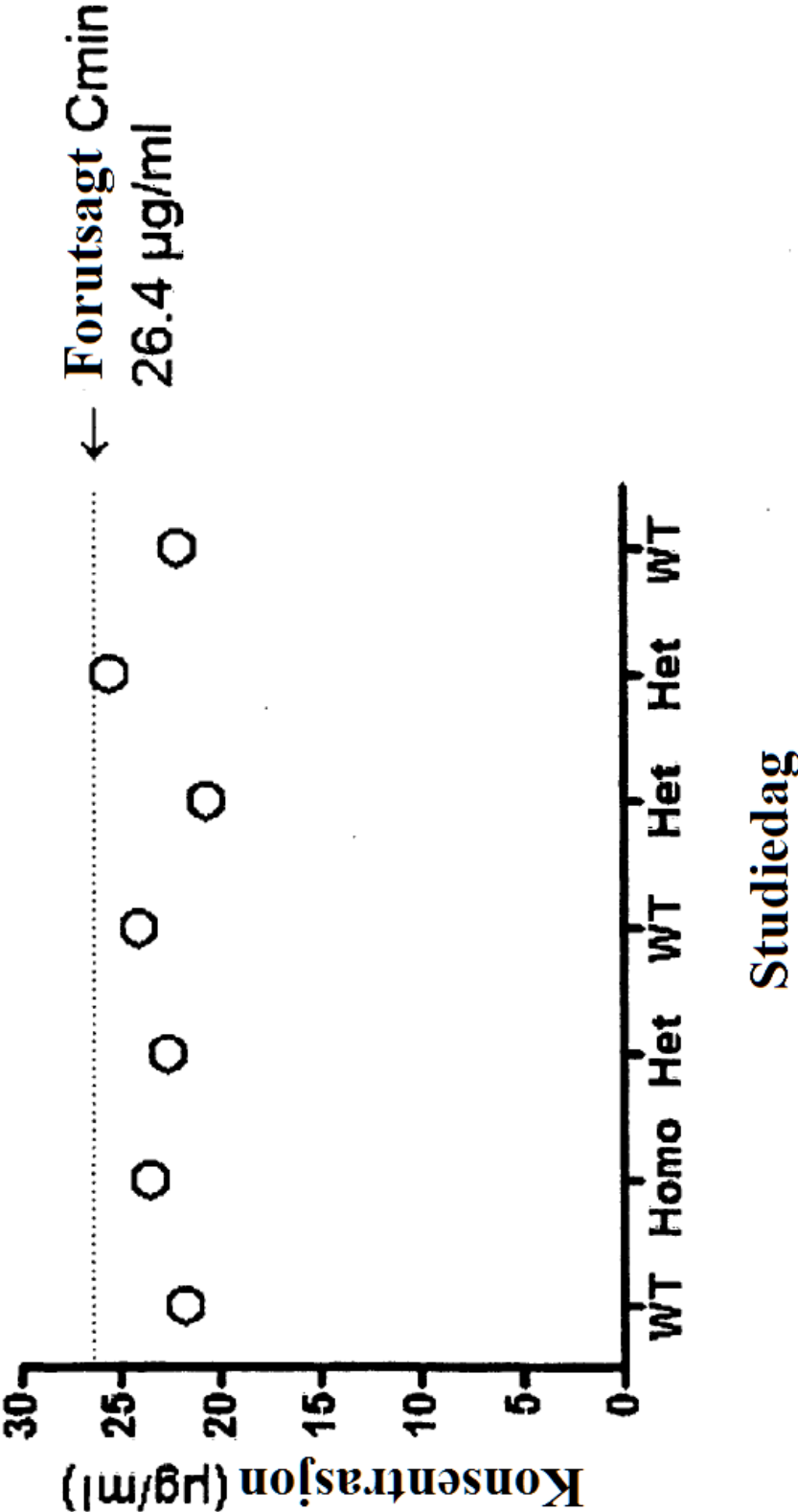


Figur 11

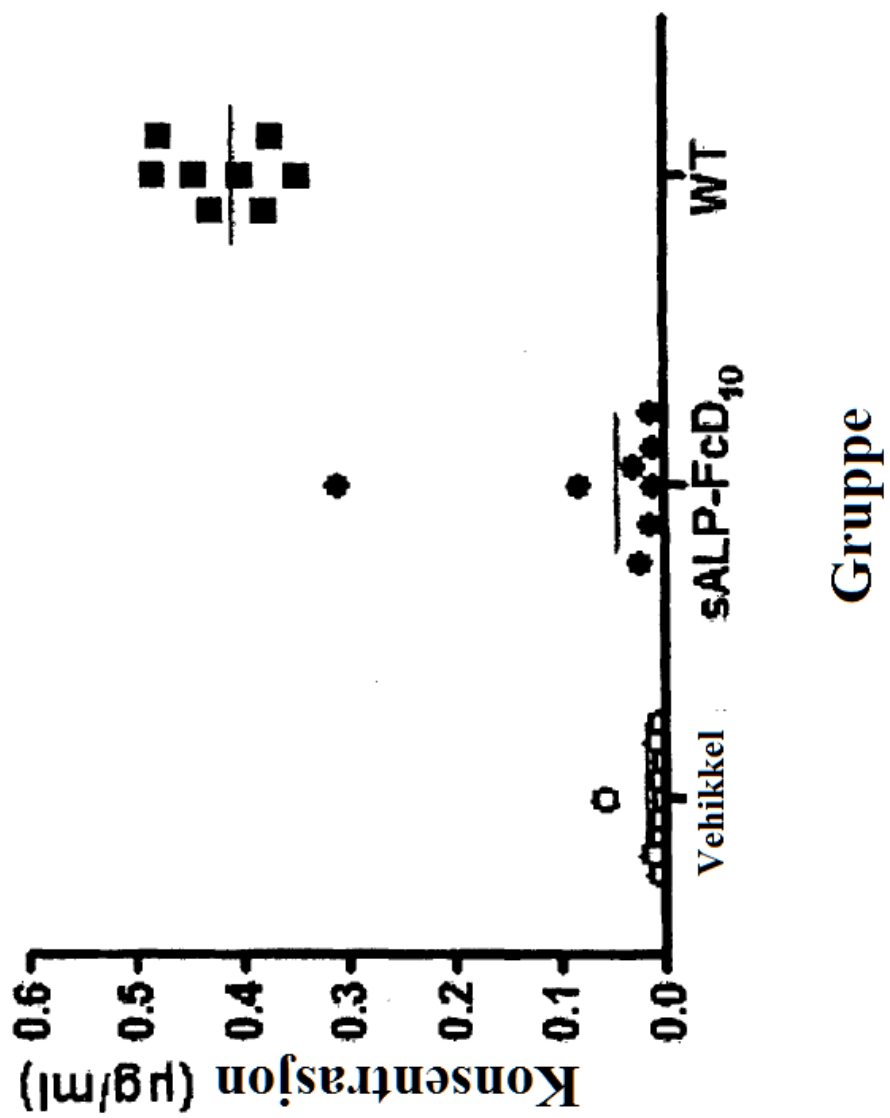
Flerdoseringssimulering
(SC, 10 mg/kg hver 24. time)



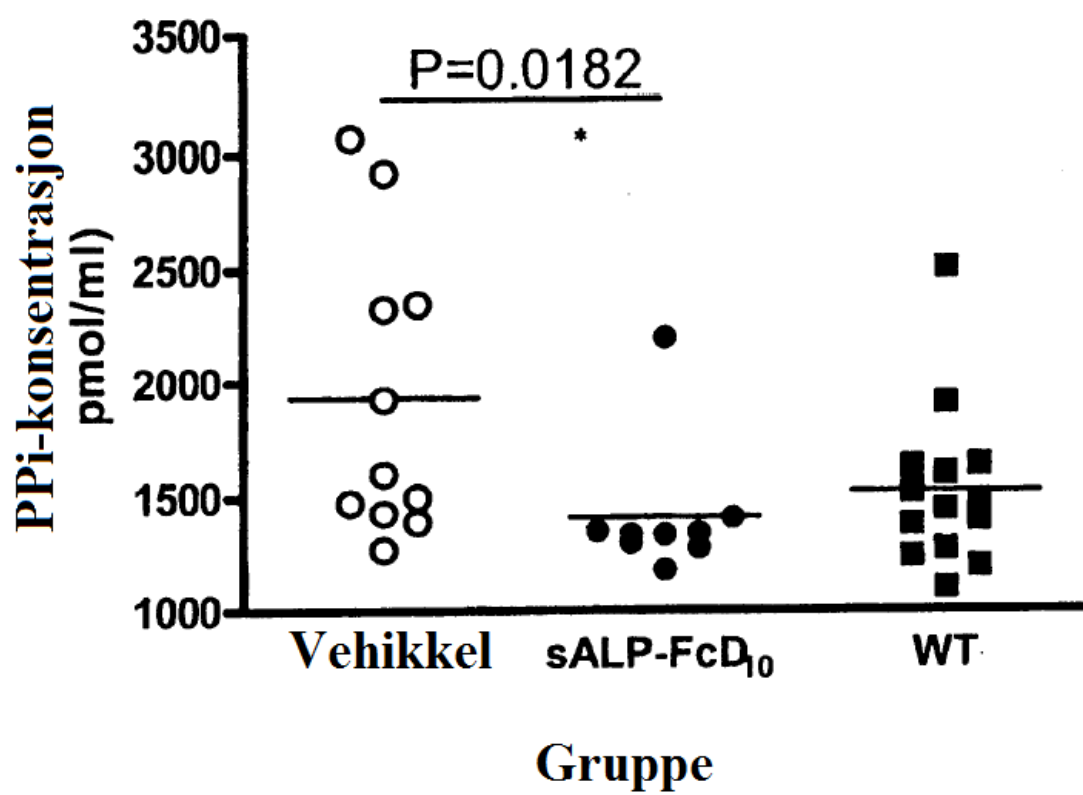
Figur 12



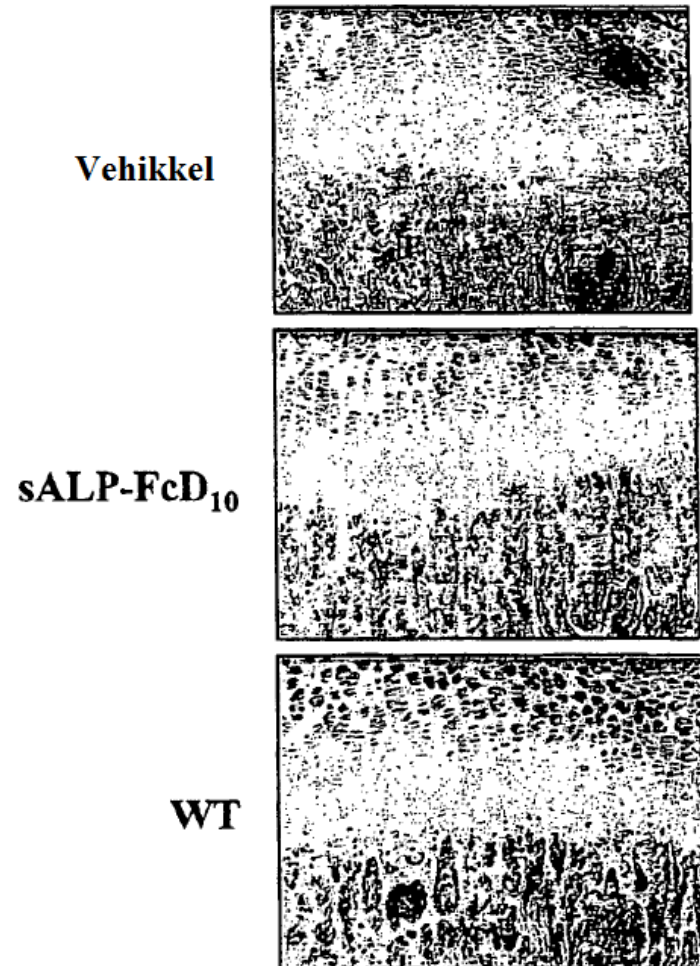
Figur 13



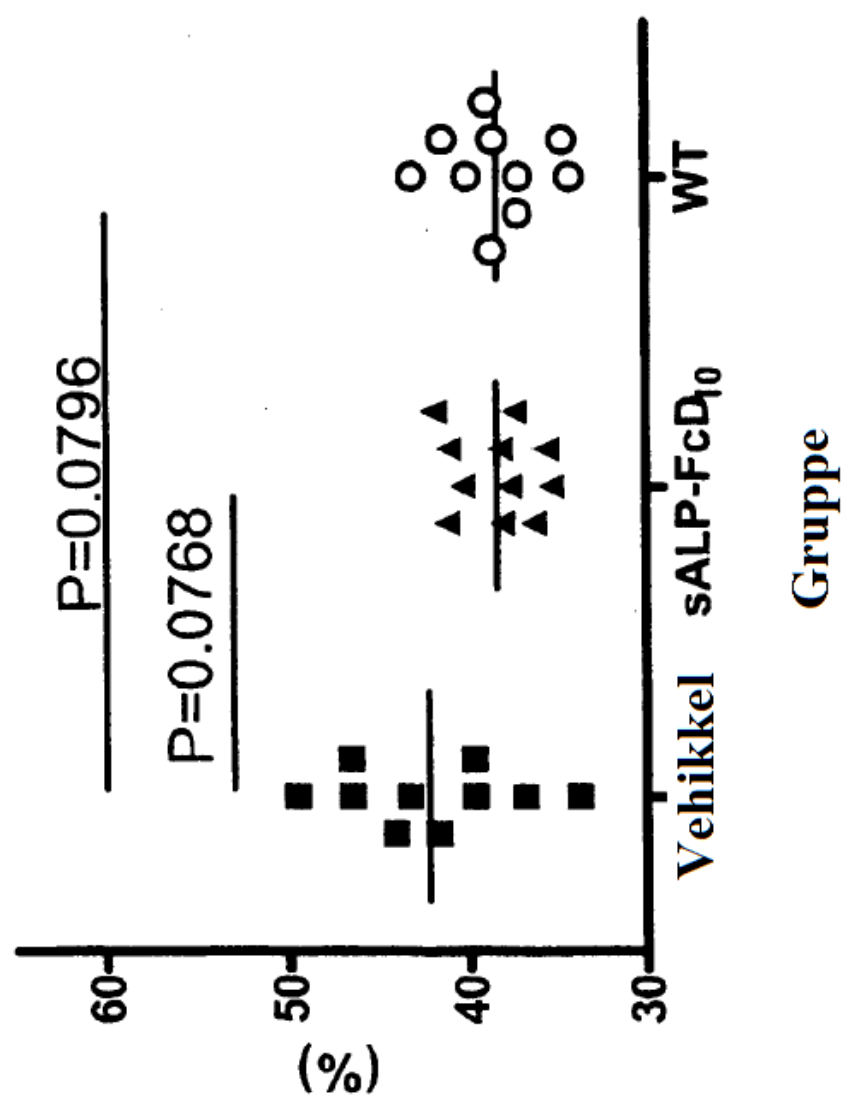
Figur 14



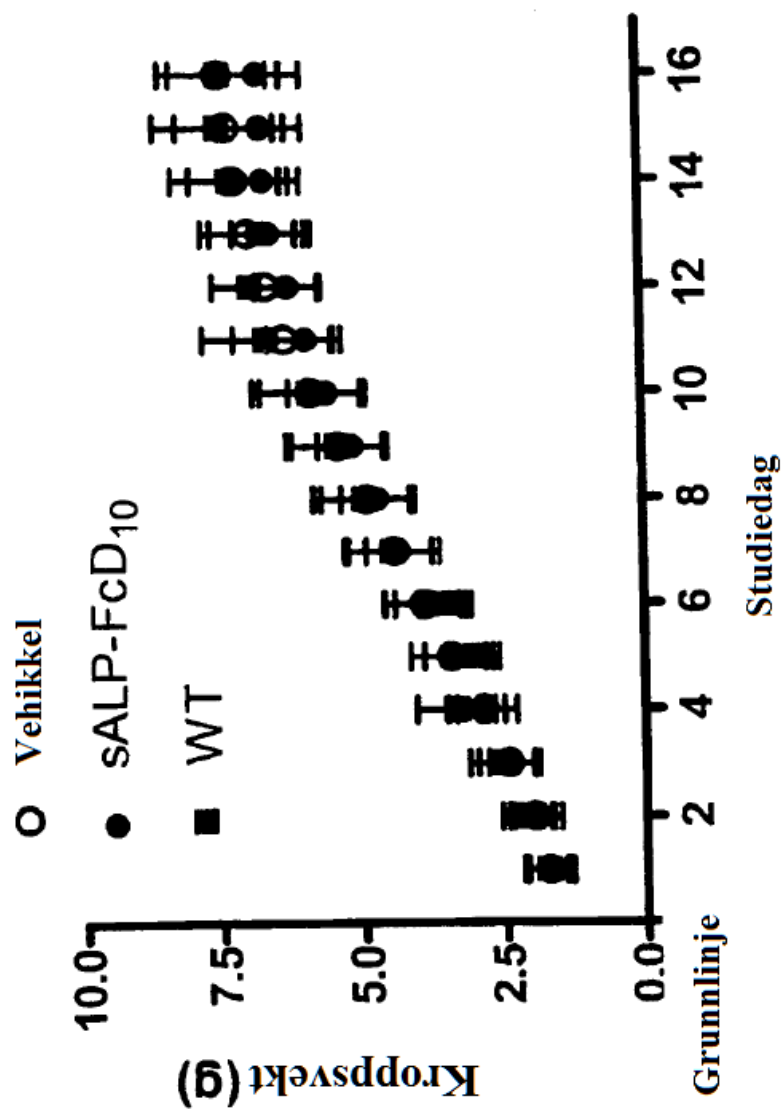
Figur 15



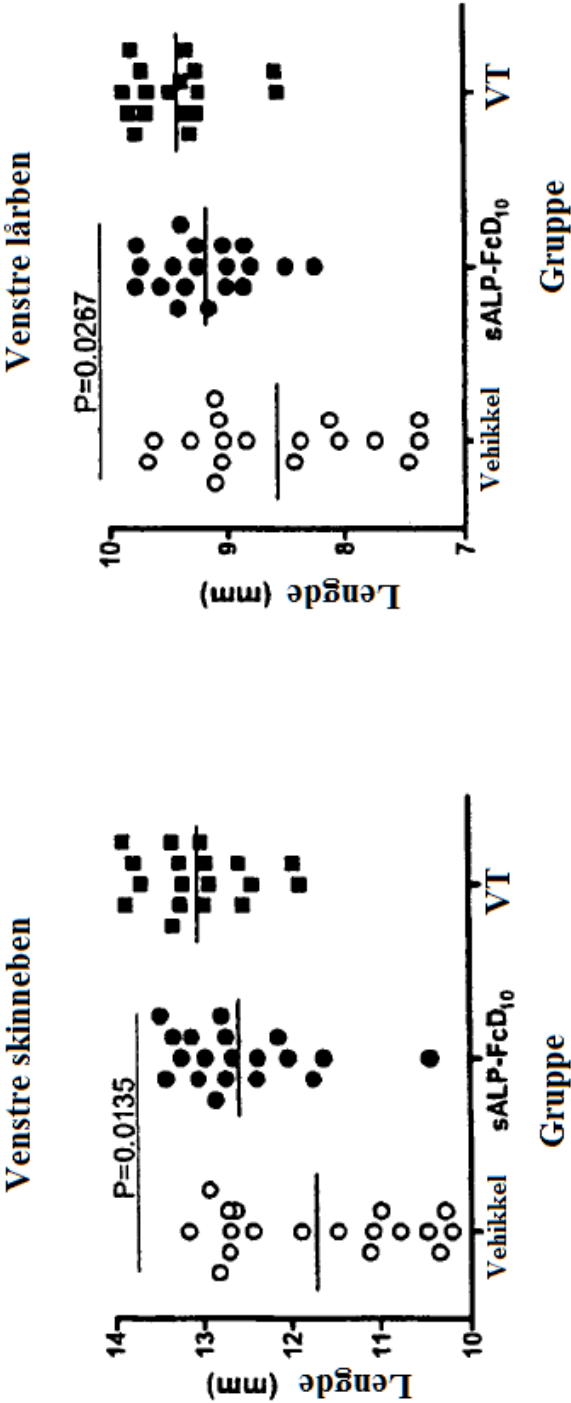
Figur 16



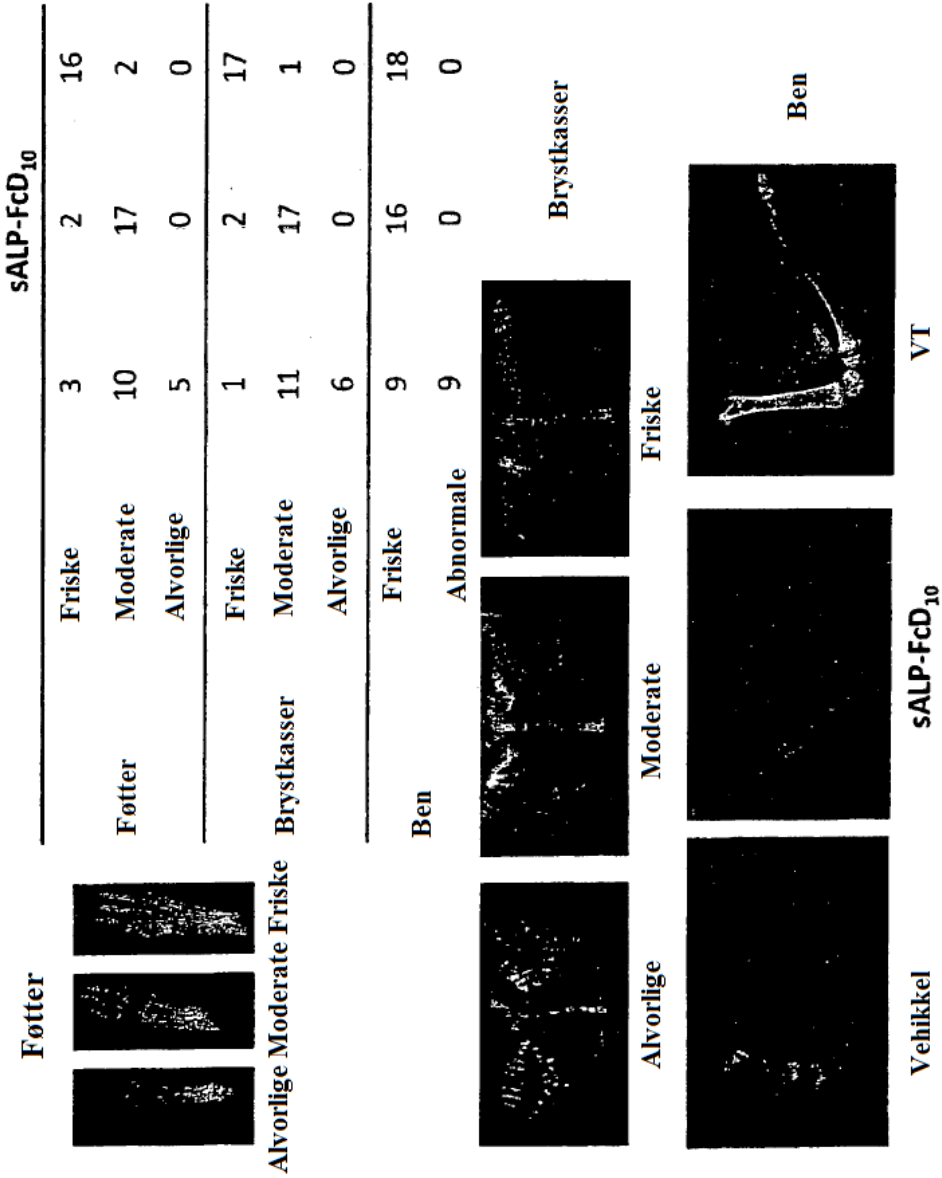
Figur 17



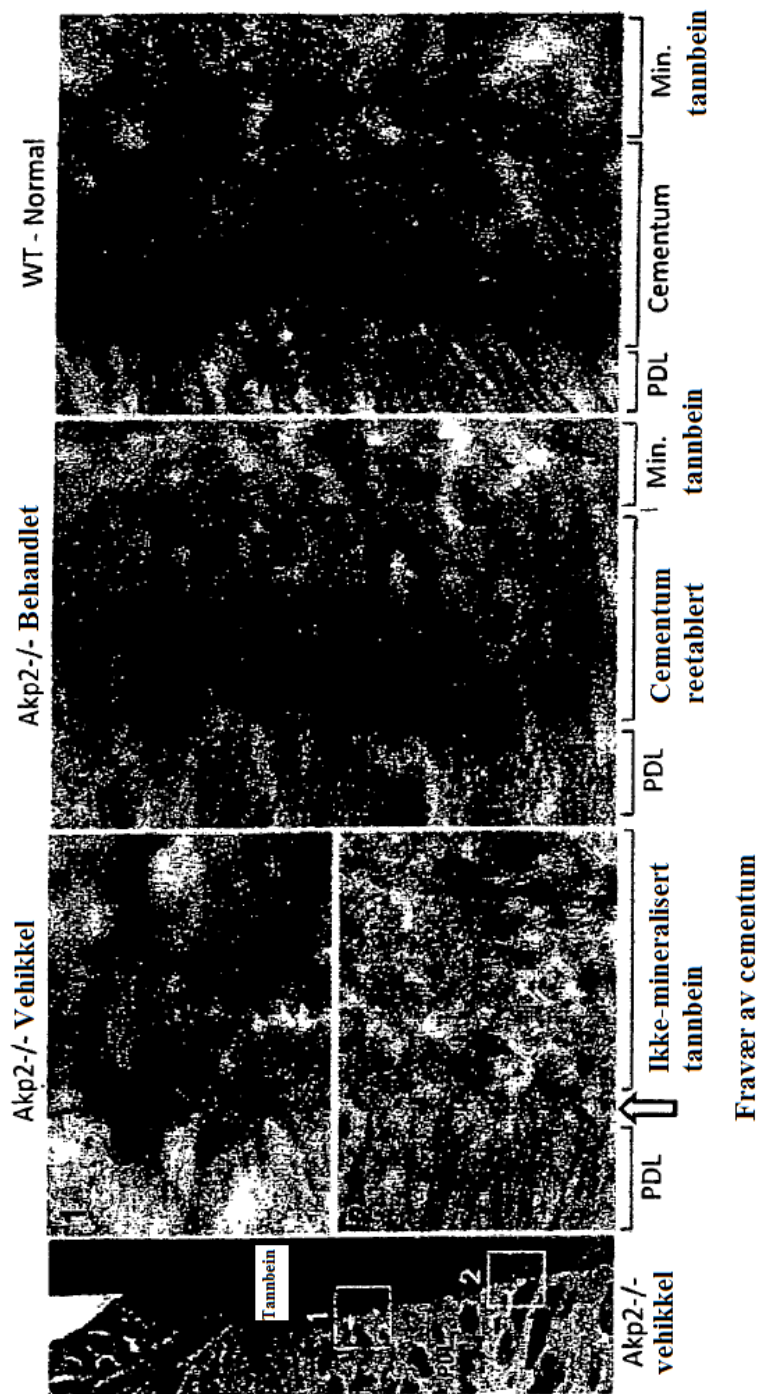
Figur 18



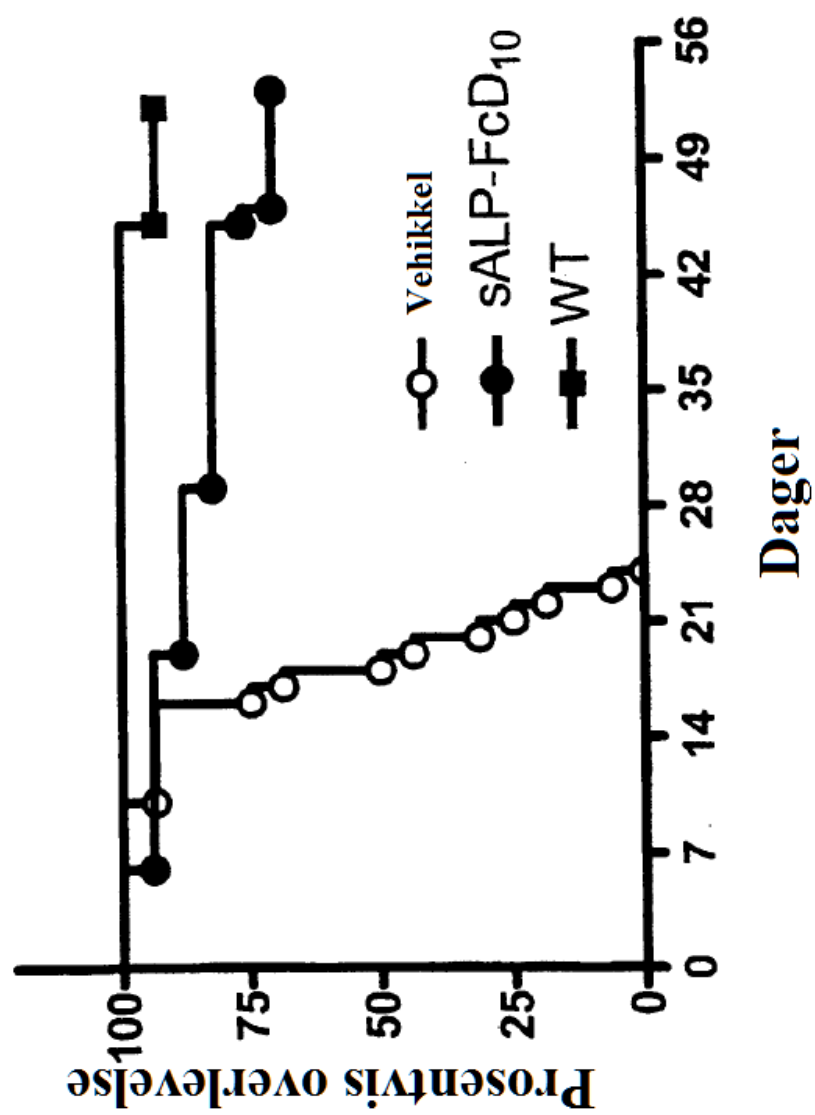
Figur 19



Figur 21



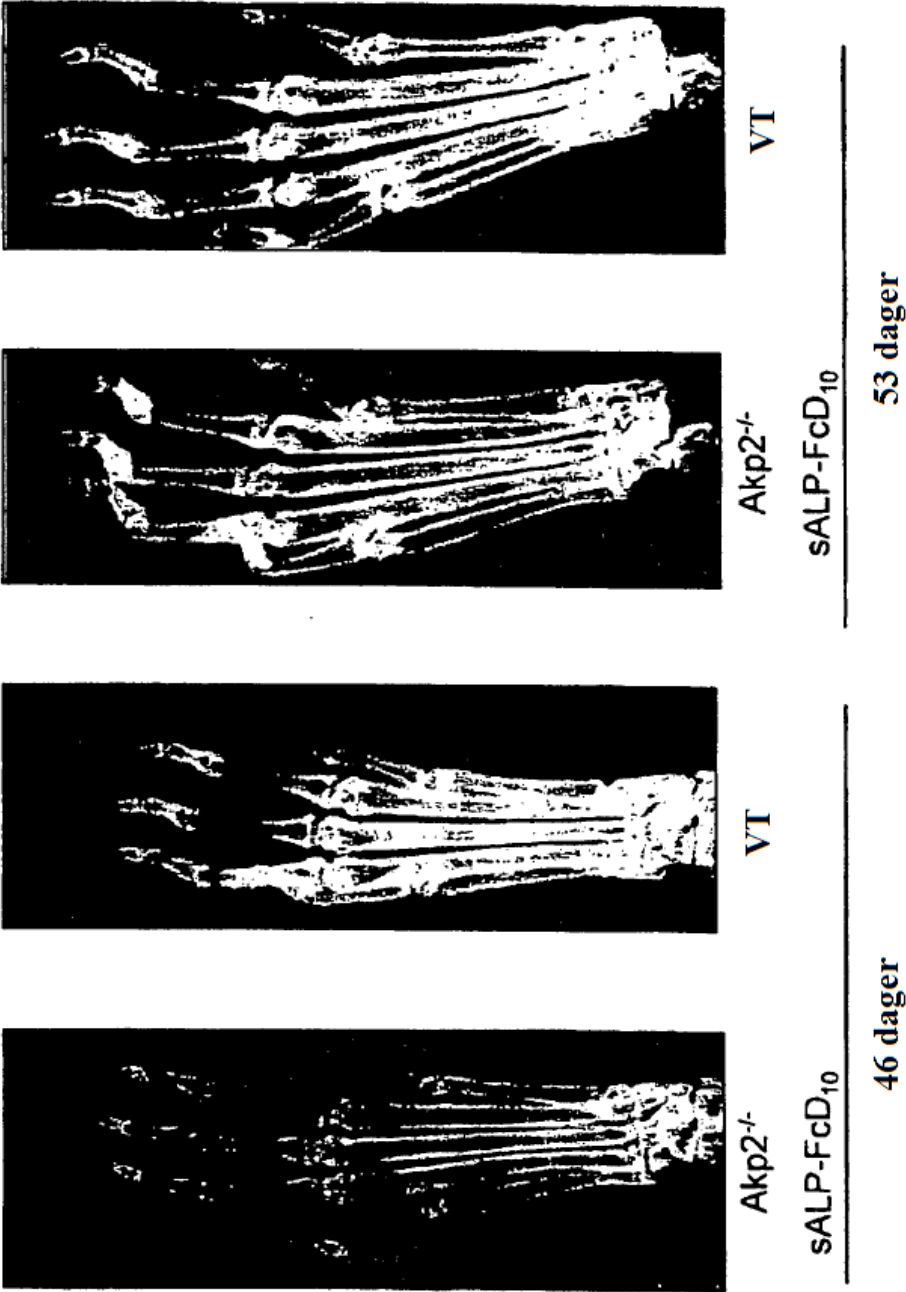
Figur 22



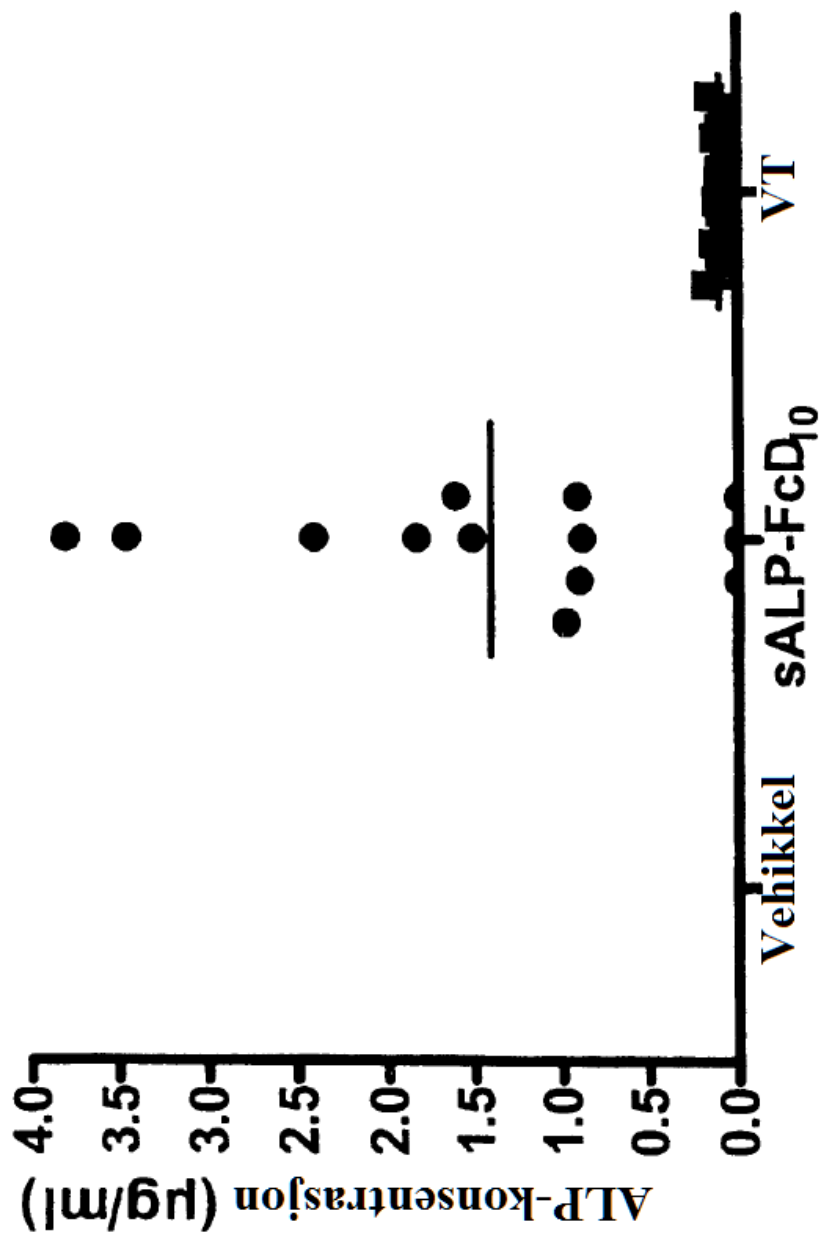
Figur 23



Figur 24

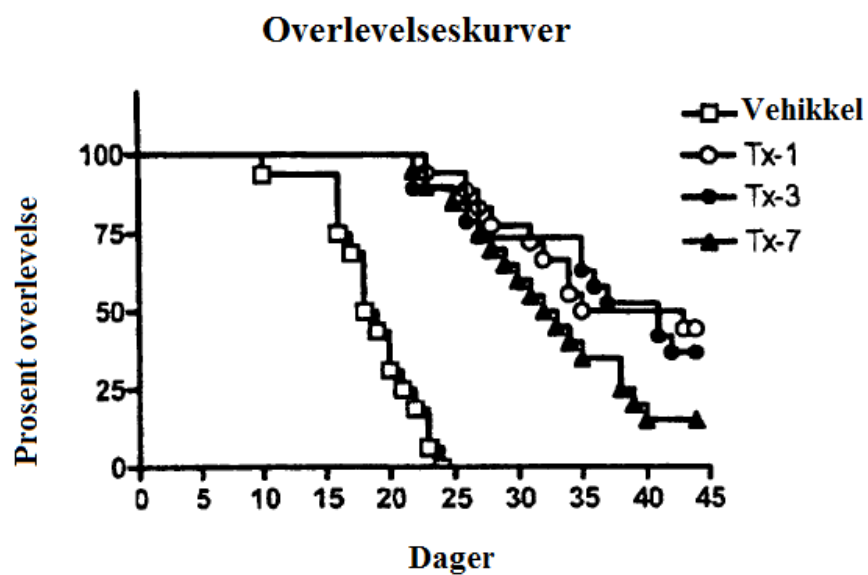


Figur 25



Figur 26

A

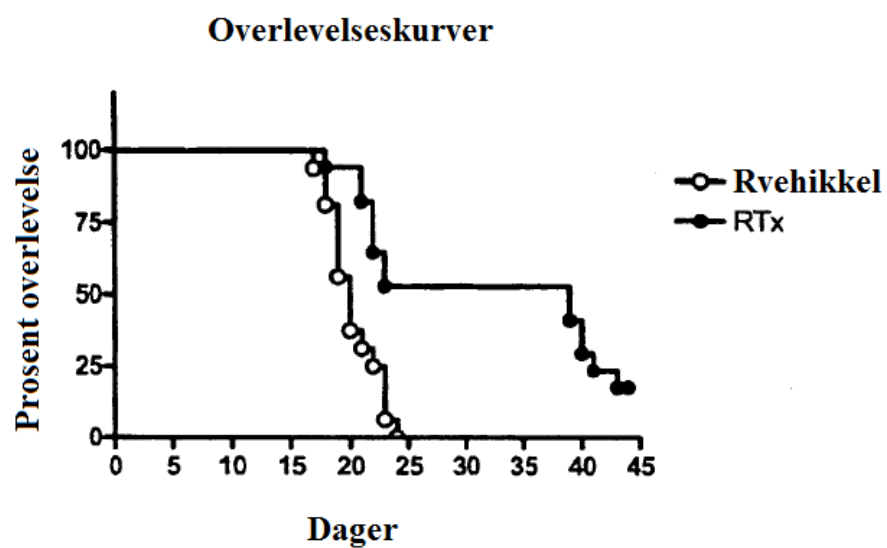


B

Gruppe	Gj. snittlig overlevelse (dag)
Vehikkel	18,5
Tx-1	39
Tx-3	41
Tx-7	32,5

Figur 27

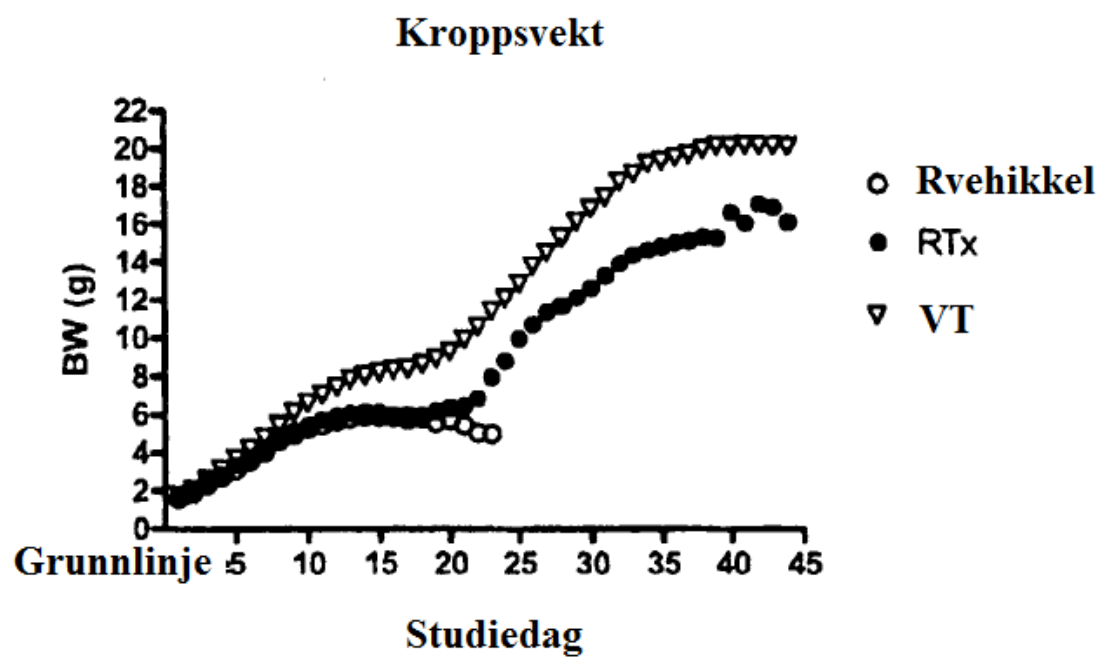
A



B

Gruppe	Gj. snittlig overlevelse (dag)
Rvehikkel	20
RTx	39

Figur 28



Figur 29

CLUSTAL 2.0.5 flersekvenssamstilling

```

TNALPrn      MILP-----FLVLAIGTCLTNSFVPEKEKDPSYWRQQAQETLKNALKLQKLNTNVAKNII 55
TNALPmm      MISP-----FLVLAIGTCLTNSFVPEKERDPSYWRQQAQETLKNALKLQKLNTNVAKNVI 55
TNALPhs      MISP-----FLVLAIGTCLTNSLVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYLELQKLNTNVAKNVI 55
TNALPcf      -----EKDPKYWRDQAQQTLYALRLQNLNTNVAKNVI 33
TNALPfc      MISP-----FLVLAIGTCLTNSLVPEKEKDPKYWRDQAQQTLYALRLQKLNTNVAKNVI 55
TNALPbt      MISP-----FLVLAIGTCLTNSLVPEKEKDPKYWRDQAQQTLYALRLQKLNTNVAKNVI 55
GALPhs      MQGPWV---LLLLGLRLQLSLGII PVVEENPDPFWRQAAEALGAACKLQPAQT-AAKNLI 56
PLALPhs      MLGPCMLLLLLLLGLRLQLSLGII PVVEENPDPFWRQAAEALGAACKLQPAQT-AAKNLI 59
IALPhs      MQGPWV---LLLLGLRLQLSLGVI PAEEENPDPFWRQAAEALDAACKLQPIQK-VAKNLI 56
              *.:* :. :* :.* * :. :. :*.:
Konsensus    XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXPXWXXAXXXLXXAXLQXXXXXXXXXNXI

TNALPrn      MFLGDGMGVSTVTAARILKGQLHHTGEETRLMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTAT 115
TNALPmm      MFLGDGMGVSTVTAARILKGQLHHTGEETRLMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTAT 115
TNALPhs      MFLGDGMGVSTVTAARILKGQLHHTNPGEETRLMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTAT 115
TNALPcf      MFLGDGMGVSTVTAARILKGQLHHTNPGEETRLMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTAT 93
TNALPfc      MFLGDGMGVSTVTAARILKGQLHHTNPGEETRLMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTAT 115
TNALPbt      MFLGDGMGVSTVTAARILKGQLHHTNPGEETRLMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTAT 115
GALPhs      IFLGDGMGVSTVTAARILKGQKDKLGPETFLAMDRFPYVALSKTYSVDKHVPDSGATAT 116
PLALPhs      IFLGDGMGVSTVTAARILKGQKDKLGPETFLAMDRFPYVALSKTYNVDKHVPDSGATAT 119
IALPhs      LFLGDGLGVPTVTATRIKQKQKGLGPETFLAMDRFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTAT 116
              :*****:* :*****:*****: * * * * * :*****:*****:*****:
Konsensus    XFLGDGXGVXTVTAXRILKGQXXXXXGXEXLXMDXFPXALSXTYXXXXXVPDSXXTAT

TNALPrn      AYLCGVKANEGTVGVSAATERTRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPS 175
TNALPmm      AYLCGVKANEGTVGVSAATERTRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPS 175
TNALPhs      AYLCGVKANEGTVGVSAATERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPS 175
TNALPcf      AYLCGVKANEGTVGVSAATORTHCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPS 153
TNALPfc      AYLCGVKANEGTVGVSAATQRTQCNNTTQGNEVTSILRWAKDSGKSVGIVTTTRVNHATPS 175
TNALPbt      AYLCGVKANEGTVGVSAATQRSQCNNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPS 175
GALPhs      AYLCGVKGNFQTI GLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVGVTTTRVQHASPA 176
PLALPhs      AYLCGVKGNFQTI GLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVGVTTTRVQHASPA 179
IALPhs      AYLCGVKANFQTI GLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVGVTTTRVQHASPA 176
              *****:* :*****:*****: *.:* :. :* :.* :*****:*****:
Konsensus    AYLCGVKXNXXTXGXSAAAXXXXCNTTXGNEVXSXXXXAKXGKSVGVTTTRVXHAXPX

TNALPrn      AAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC KD IAYQLMHN IKDIDVIMGGGRKYMYPKNRTDVE 235
TNALPmm      AAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC KD IAYQLMHN IKDIDVIMGGGRKYMYPKNRTDVE 235
TNALPhs      AAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC KD IAYQLMHN IRDIDVIMGGGRKYMYPKNRTDVE 235
TNALPcf      AAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC KD IAYQLMHN VKDIEVIMGGGRKYMFPKNRTDVE 213
TNALPfc      AAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC KD IAYQLMHN VRDIEVIMGGGRKYMFPKNRTDVE 235
TNALPbt      ASYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC KD IAYQLMHN IKDIEVIMGGGRKYMFPKNRTDVE 235
GALPhs      GAYAHTVNRNWYSDADVPASARQEGCQDIATQLI SNM-DIDVILGGGRKYMFPMGTPDPE 235
PLALPhs      GTYAHTVNRNWYSDADVPASARQEGCQDIATQLI SNM-DIDVILGGGRKYMFPMGTPDPE 238
IALPhs      GTYAHTVNRNWYSDADVPASARQEGCQDIATQLI SNM-DIDVILGGGRKYMFPMGTPDPE 235
              :*****:* :*****:*****: *.:* :. :* :.* :*****:*****:
Konsensus    XXYAHXXXRWYSDXXXPXXAXXGXCKD IAXQLXXNXDXIXVIXGGGRKYMXXXXXXDXE

TNALPrn      YELDEKARGTRLDGLDLISIWKSFKPRKHSHYVWNRTELLALDPS-RVDYLLGLFEPGD 294
TNALPmm      YELDEKARGTRLDGLDLISIWKSFKPRKHSHYVWNRTELLALDPS-RVDYLLGLFEPGD 294
TNALPhs      YESDEKARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYKSHFIWNRTELLTLDPH-NVDYLLGLFEPGD 294
TNALPcf      YEMDEKSTGARLDGLNLIDIWKNFKPRKHSHYVWNRTELLALDPY-TVDYLLGLFDPGD 272
TNALPfc      YEMDEKARGTRLDGLNLVDIWSFKPRKHSHYVWNRTELLTLDPY-GVDYLLGLFEPGD 294
TNALPbt      YELDEKARGTRLDGLNLIDIWKSFKPRKHSHYVWNRTELLALDPH-SVDYLLGLFEPGD 294
GALPhs      YPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWL---AKHQGARYVWNRTELLQASLDPSVTHLMGLFEPGD 292
PLALPhs      YPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWL---AKROGARYVWNRTELLMQASLDPSVTHLMGLFEPGD 295
IALPhs      YPADASQNGIRLDGKNLVQEWL---AKHQGAWYVWNRTELLMQASLDQSVTHLMGLFEPGD 292
              * * . * *****:*. * :. :. :. :*****:*. * :. :*****:
              YXXDXXXGXRLDGXXLXXXWXXXXXXXXXXXXXWNRTELLXXXXXXVXXLXGLFXPGD

```

Figur 30

Figur 30 (fortsettelse)

CLUSTAL W (1.82) flersekvenssamstilling : Ikke-vevsspesifikk alkalisk fosfatase

```

1
P09487|PPBT_BOVIN      MISPFLLLAI  GTCFASSLVP  EKEKDPKYWR  DOAQOTLKNA  LRLQTLNTNV  AKNVIMFLGD
Q29486|PPBT_FELCA      MISPFVLVLA  GTCLTNSLVP  EKEKDPKYWR  DOAQOTLKNA  LRLQKLNTNV  VKNVIMFLGD
P05186|PPBT_HUMAN      MISPFVLVLA  GTCLTNSLVP  EKEKDPKYWR  DOAQETLKYA  LELOKLNTNV  AKNVIMFLGD
P09242|PPBT_MOUSE      MISPFVLVLA  GTCLTNSFVP  EKERDPSYWR  QQAQETLKNA  LKLQKLNTNV  AKNVIMFLGD
P08289|PPBT_RAT        MILPFLVLAI  GTCLTNSFVP  EKEKDPKYWR  QQAQETLKNA  LKLQKLNTNV  AKNIIMFLGD
Q9N0V0|Q9N0V0_CANFA    -----  -----  --EKDPKYWR  DOAQOTLKYA  LRLQNLNTNV  AKNVIMFLGD
                        *.**.***  :***:***  *  *.**.***.*  .*:*****
Konsensus             XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXEXDPXYWR XQAQXTLKXA LXLQXLNTNV KKNXIMFLGD

61
P09487|PPBT_BOVIN      GMGVSTVTAA  RILKGQLHHS  PGEETKLEMD  KFPYVALSKT  YNTNAQVPDS  AGTATAYLGG
Q29486|PPBT_FELCA      GMGVSTVTAA  RILKGQLHHS  PGEETKLEMD  KFPYVALSKT  YNTNAQVPDS  AGTATAYLGG
P05186|PPBT_HUMAN      GMGVSTVTAA  RILKGQLHHS  PGEETKLEMD  KFPYVALSKT  YNTNAQVPDS  AGTATAYLGG
P09242|PPBT_MOUSE      GMGVSTVTAA  RILKGQLHHS  TGEETKLEMD  KFPYVALSKT  YNTNAQVPDS  AGTATAYLGG
P08289|PPBT_RAT        GMGVSTVTAA  RILKGQLHHS  TGEETKLEMD  KFPYVALSKT  YNTNAQVPDS  AGTATAYLGG
Q9N0V0|Q9N0V0_CANFA    GMGVSTVTAT  RILKGQLHHS  PGEETKLEMD  KFPYVALSKT  YNTNAQVPDS  AGTATAYLGG
                        *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****:
Konsensus             GMGVSTVTAX  RILKGQLHHX  XGEETXLEMD  KFPXVALSKT  YNTNAQVPDS  AGTATAYLGG

121
P09487|PPBT_BOVIN      VKANEGTVGV  SAATQRSQCN  TTQGNEVTSI  LRWAKDAGKS  VGIVTTTRVN  HATPSASYAH
Q29486|PPBT_FELCA      VKANEGTVGV  SAATQRTQCN  TTQGNEVTSI  LRWAKDSGKS  VGIVTTTRVN  HATPSAAYAH
P05186|PPBT_HUMAN      VKANEGTVGV  SAATERSRCN  TTQGNEVTSI  LRWAKDAGKS  VGIVTTTRVN  HATPSAAYAH
P09242|PPBT_MOUSE      VKANEGTVGV  SAATERTRCN  TTQGNEVTSI  LRWAKDAGKS  VGIVTTTRVN  HATPSAAYAH
P08289|PPBT_RAT        VKANEGTVGV  SAATERTRCN  TTQGNEVTSI  LRWAKDAGKS  VGIVTTTRVN  HATPSAAYAH
Q9N0V0|Q9N0V0_CANFA    VKANEGTVGV  SAATQRTHCN  TTQGNEVTSI  LRWAKDAGKS  VGIVTTTRVN  HATPSAAYAH
                        *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****:
Konsensus             VKANEGTVGV  SAATXRXHCN  TTQGNEVTSI  LRWAKDXGKS  VGIVTTTRVN  HATPSAXYAH

```

Figur 31

Konsensus

Konsensus

Konsensus

Figur 31 (fortsettelse)

```

1 atggtttcac cattcttagt actggccatt ggcacctgcc ttactaactc cttagtgcc
61 gagaaagaga aagaccccaa gtactggcga gaccaagcgc aagagacact gaaatatgcc
121 ctggagcttc agaagctcaa caccaacgtg gctaagaatg tcatcatgtt cctgggagat
181 gggatgggtg tctccacagt gaaggctgcc cgcatectca agggtcagct ccaccacaac
241 cctggggagg agaccaggct ggagatggac aagttccctt tcgtggccct ctccaagacg
301 tacaacacca atgcccaggt cctgacagc gccggcaccc ccaccgccta cctgtgtggg
361 gtgaaggcca atgagggcac cgtgggggta agcgcagcca ctgagcgttc ccggtgcaac
421 accacccagg ggaacgaggt cacctccatc ctgcgctggg ccaaggacgc tgggaaatct
481 gtgggcattg tgaccaccac gagagtgaac catgccaccc ccagcgccgc ctacgcccac
541 tcggctgacc gggactggta ctcagacaac gagatgcccc ctgaggcctt gagccagggc
601 tgtaaggaca tcgcctacca gctcatgcat aacatcaggg acattgacgt gatcatgggg
661 ggtggccgga aatacatgta cccaagaat aaaactgatg tggagtatga gagtgcagag
721 aaagccaggg gcacgaggct ggacggcctg gacctcgttg acacctggaa gagcttcaaa
781 ccgagataga agcactccca cttcatctgg aaccgcacgg aactcctgac ccttgacccc
841 cataatgttg actacctatt gggctctctc gagccagggg acatgcagta cgagctgaac
901 aggaacaacg tgacggaccc gtcactctcc gagatggtgg tgggtggccat ccagatcctg
961 cggaagaacc ccaaaggctt cttcttgctg gtggaaggag gcagaattga ccacgggcac
1021 catgaaggaa aagccaagca ggccctgcat gaggcgggtg agatggaccg ggccatcggg
1081 caggcaggca gcttgacctc ctcggaagac actctgaccg tggctactgc ggaccattcc
1141 cacgtcttca catttggtgg atacaccccc cgtggcaact ctatctttgg tctggcccc
1201 atgctgagtg acacagacaa gaagcccttc actgccatcc tgtatggcaa tgggcctggc
1261 tacaagggtg tgggcgggtg acgagagaat gtctccatgg tggactatgc tcacaacaac
1321 taccaggcgc agtctgctgt gcccctgcgc cacgagaccc acggcgggga ggacgtggcc
1381 gtcttctcca agggcccat ggcgacactg ctgcacggcg tccacgagca gaactacgtc
1441 cccacgtga tggcgtatgc agcctgcatc ggggccaacc tcggccactg tgctcctgcc
1501 agctcgCTTA AGgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg
1561 ggaccgtcag tcttctctct cccccaaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc
1621 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac
1681 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac
1741 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc
1801 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcgga gaaaaccatc
1861 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgagg
1921 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttgggtc aaggcttcta tcccagcgac
1981 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc
2041 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg
2101 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac
2161 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaGATATCG ATGACGATGA CGATGACGAT
2221 GACGATGACT AG

```

Figure 32